

Ćwiczenie 11

Temat: Wskaźniki higieniczne żywności.

Wskaźniki higieniczne żywności są to grupy bakterii dostające się do żywności w wyniku niewłaściwej higieny produkcji i braku higieny osobistej pracowników.

Przez wiele lat podstawowymi wskaźnikami higienicznymi w produkcji żywności były **bakterie pochodzenia kałowego** (często obok nowych wymagań są one nadal stosowane jako wymagania norm zakładowych):

- a) pałeczki grupy coli
- b) paciorkowce z rodzaju *Enterococcus*

Obecnie w wyniku zmian zachodzących w prawie żywnościowym, które mają na celu ujednolicenie przepisów wszystkich państw członkowskich Unii Europejskiej wprowadzono pojęcia:

- a. **Kryterium higieny procesu** – wymagania (dozwolona liczba określonych drobnoustrojów lub objętość produktu, w którym mogą być one obecne), których spełnienie pozwala na akceptację funkcjonującego procesu produkcji. Kryterium to stosuje się do oceny procesu produkcyjnego (w trakcie trwania procesu produkcyjnego), a nie do oceny produktów wprowadzanych na rynek

Kryteria higieny	Żywność w której należy oznaczać dane kryterium
Liczba bakterii tlenowych	Mięso i produkty mięsne
Pałeczki <i>Enterobacteriaceae</i> i <i>E. coli</i>	Mięso, pasteryzowane mleko i inne pasteryzowane płynne produkty mleczarskie, serwatka, mleko w proszku, lody, żywność dla niemowląt i produkty jajeczne
Gronkowce koagulazo-dodatnie,	Sery, produkty ze skorupiaków i mięczaków, mleko w proszku i serwatka w proszku
<i>Salmonella</i> sp.	Tusze wołowe, baranie, końskie, wieprzowe drobiowe – sprawdza się je bezpośrednio po wypatroszeniu (kontrola higieny uboju i wytrzewiania)
<i>Bacillus cereus</i>	Preparaty dla niemowląt wytworzone z mleka w proszku

- b. **Kryterium bezpieczeństwa** – określa dopuszczalne poziomy zanieczyszczeń mikrobiologicznych, których przestrzeganie pozwala na akceptację produktu przeznaczonego do obrotu lub znajdującego się w obrocie. (W kryteriach tych uwzględniono wyłącznie bakterie chorobotwórcze lub metabolity, które będą omawiane na następnych ćwiczeniach)

Oznaczanie wskaźników higienicznych w żywności

1. Rodzina *Enterobacteriaceae*

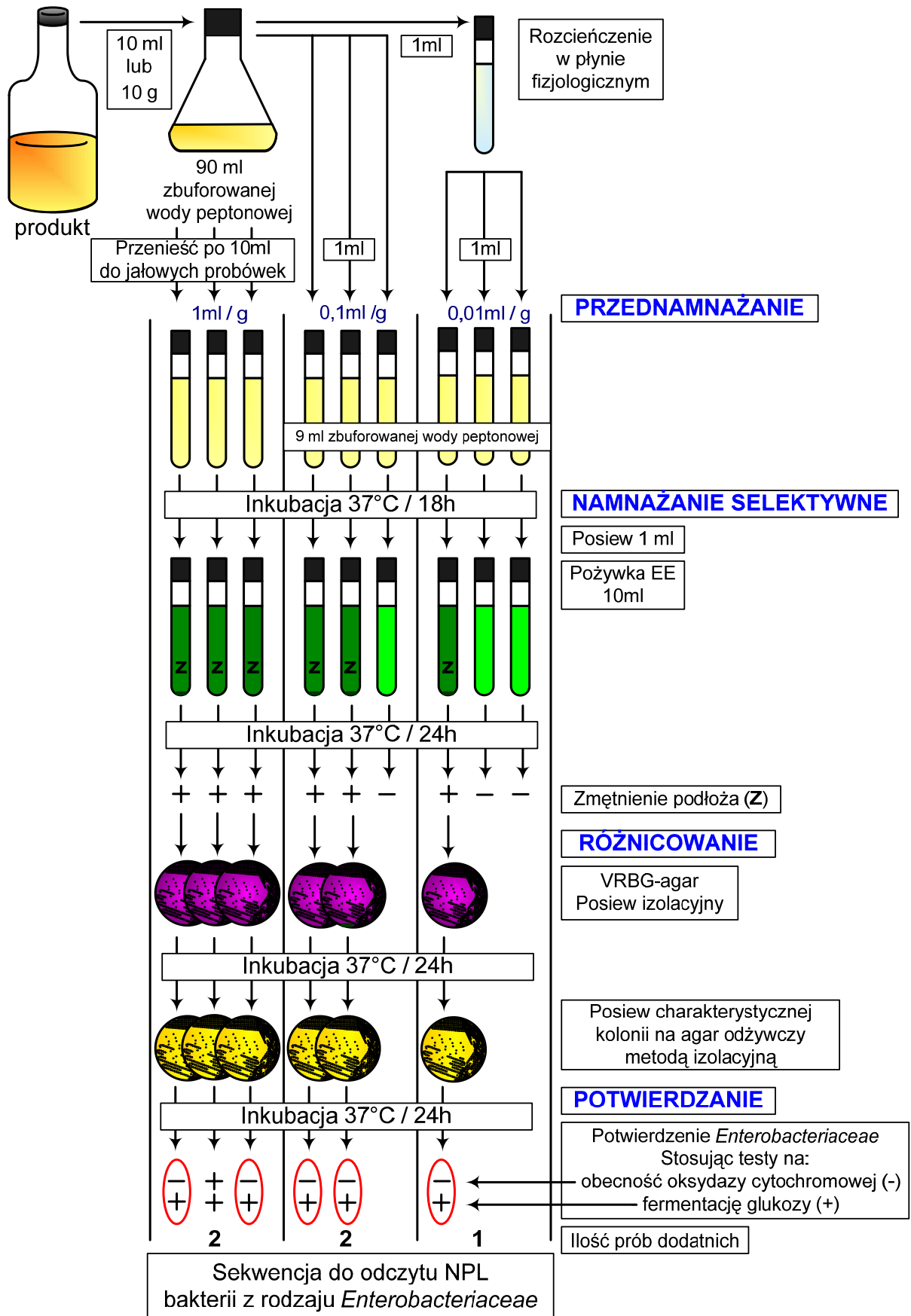
a. Oznaczanie NPL

Oznaczenie to przeprowadza się w następujących etapach:

- **Przednamnażanie** (etap, który pozwala na odbudowanie się komórkom uszkodzonym lub/i namnożenie komórek jeśli w produkcie występują one w bardzo niewielkiej ilości). Wykonuje się dla każdego dziesięciokrotnego rozcieńczenia badanej próbki w trzech powtórzeniach. Stosowane podłoże - zbuforowana woda peptonowa, warunki inkubacji 37°C/18 godz.
- **Selektywne namnażanie** (pozwalające na zahamowanie rozwoju mikroflory towarzyszącej przy jednoczesnym namnażaniu pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*). Podłoże płynne EE (podłoże z żółcią, zielenią brylantową i glukozą), warunki inkubacji: 37°C/24 godz.
- **Różnicowanie:** z każdej hodowli na bulionie EE z objawami wzrostu (zmętnienie) wykonuje się posiew metodą izolacyjną na podłoże VRBG-agar (podłoże o bardzo zbliżonym składzie do podłoża VRBL-agar; laktoza zastąpiona jest glukozą). Warunki inkubacji: 37°C/24 godz. Wszystkie pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* rosną na tym podłożu w postaci kolonii o ciemno-czerwonej barwie. Na podłożu VRBG-agar podobne kolonie mogą również tworzyć inne bakterie (np. *Aeromonas hydrophila*) należy więc wykonać badania potwierdzające. W tym celu charakterystyczne kolonie przesiewa się na agar odżywczy, a następnie wykonuje **testy potwierdzające**:
- **badanie aktywności oksydazy cytochromowej** – można sprawdzić stosując gotowe testy, lub z zastosowaniem odczynnika do badania oksydazy, którym należy nasączyć ułożoną na płaskiej powierzchni bibułę filtracyjną. Następnie pobiera się fragment badanej kolonii (bagietką lub plastikową eżą) i rozciera na przygotowanej bibule lub polu testowym. Jeśli w ciągu 10 sekund barwa się nie zmienia wynik uznaje się za ujemny (charakterystyczny dla pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*)
- **badanie zdolności do fermentacji glukozy** (tzw. test fermentacyjny) – kolonie oksydazo-ujemne należy posiać metodą kłutą do podłoża w próbówce - agar z glukozą i purpurą bromokrezolową, inkubacja 37°C/24 godz., gdy barwa zmieni się na żółtą (w wyniku fermentacji glukozy do kwasów) wynik uznaje się za dodatni (charakterystyczny dla pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*)

Końcowa interpretacja wyników

Jeżeli jakakolwiek kolonia wybrana do testów potwierdzających jest oksydazo-ujemna i glukozo-dodatnia, wynik uznaje się za dodatni. NPL pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* odczytuje się wg zasad podanych na ćwiczeniu 9.



b. Oznaczanie liczby

Posiew materiału lub jego rozcieńczeń na podłoże VRBG-agar, warunki inkubacji: 37°C/24 godz. Po inkubacji losowo wybiera się pięć charakterystycznych koloni, przesiewa na agar odżywczy, a następnie wykonuje testy na oksydazę i test fermentacyjny (patrz oznaczanie NPL). Wszystkie charakterystyczne kolonie należy policzyć i uwzględniając rozcieńczenie podać liczbę w jtk/g lub cm³.

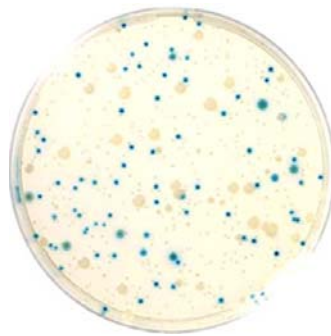
c. Oznaczanie obecności

- **Przednamnażanie** z użyciem zbuforowanej wody peptonowej.
- **Namnażanie selektywne** – posiew po 1 cm³ z każdej hodowli na zbuforowanej wodzie peptonowej do bulionu EE.
- **Różnicowanie** - posiew metodą izolacyjną na podłoże VRBG-agar z hodowli z objawami wzrostu na bulionie EE. (Etap ten wykonuje się jedynie w przypadku min. dwóch pozytywnych wyników, jeśli wynik pozytywny odnotowano w jednej próbówce uznaje się, że pałeczki *Enterobacteriaceae* są nieobecne w badanej ilości materiału).
Po inkubacji losowo wybiera się pięć charakterystycznych koloni i przesiewa na agar odżywczy, a następnie wykonuje testy na oksydazę i test fermentacyjny (patrz oznaczanie NPL).

2. *Escherichia coli*

a. Oznaczanie liczby

- Posiew wgłębnny na podłoże chromogenne TBX-agar. Podłoże to zawiera żółć, enzymatyczny hydrolizat kazeiny, substrat chromogeny, który pozwala wykryć (poprzez reakcję barwną) enzym charakterystyczny dla pałeczek *E. coli* - β -glukuronidazę. Warunki inkubacji: 44°C/24 godz.. Kolonie *E. coli* mają barwę niebiesko-turkusową.



Rys. Kolonie *Escherichia coli* na podłożu TBX-agar.

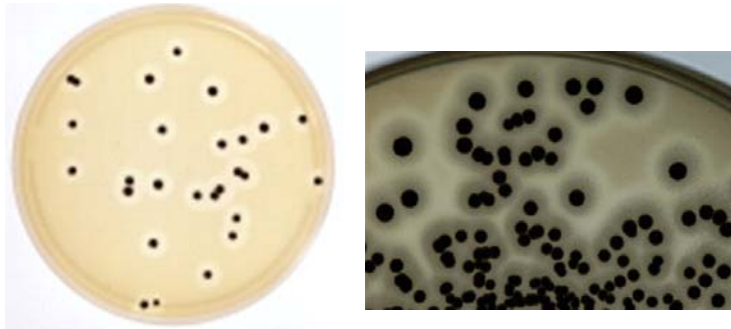
3. Gronkowce koagulazododatnie – *Staphylococcus aureus*

a. Oznaczenie liczby

Badany materiał posiewa się metodą wgłębną i zalewa podłożem z plazmą krwi i fibrynogenem (RPF). Warunki inkubacji: 37°C/24-48 godzin.

Po inkubacji liczy się charakterystyczne małe kolonie (czarne lub szare na skutek redukcji zawartego w podłożu tellurynu potasu) otoczone strefą zmętnienia. Zmętnienie podłoża wokół kolonii jest wynikiem reakcji wytwarzanej przez gronkowca koagulazy z zawartą w plazmie

krwi protrombiną. Powstają cząsteczki stafylotrombiny, które tworzą z fibrynogenem polimery wytrącające się wokół kolonii.



Rys. Kolonie *Staphylococcus aureus* koagulazododatnie na podłożu RPF.

b. Oznaczanie obecności lub NPL

- **Namnażanie:** posiew wybranego rozcieńczenia (obecność) lub rozcieńczeń (NPL) w 3 powtórzeniach do pożywki płynnej Giolitti-Cantoni. Przy posiewach większej ilości materiału, np. 10 cm³ stosować pożywkę podwójnie skoncentrowaną. Warunki inkubacji: 37°C/24-48 godzin w warunkach beztlenowych. Z każdej próbówki, w której wystąpi po inkubacji zaczernienie pożywki (wynik dodatni) wykonać posiewy potwierdzające.
- **Potwierdzanie:** posiew z prób po namnożeniu metodą izolacyjną na podłoże RPF lub Baird-Parkera. Warunki inkubacji: 37°C/24-48 godzin.

Wyniki dodatnie:

podłoże RPF – obecność przynajmniej jednej charakterystycznej koloni potwierdza obecność gronkowców koagulazododatnich w próbce, z której dokonano posiewu. To podłoże nie wymaga dodatkowego potwierdzania.

podłoże Baird-Parkera - pobrać typowe (szare lub czarne otoczone strefą przejrzystą lub opalizującą) oraz nietypowe kolonie (szare lub czarne bez strefy) i przesiać na płynną pożywkę mózgowo-sercową. Warunki inkubacji: 37°C przez 24 godziny. Po inkubacji wykonać **próbę na obecność koagulazy**; do jałowej próbówki przenieść 0,1 cm³ hodowli i dodać 0,3 cm³ plazmy krwi króliczej. Po 4-6 godzinach inkubacji w temp. 37°C obserwować ścinanie się plazmy. Jeżeli wynik jest ujemny inkubację wydłużyć o kolejne 24 godziny. **Za końcowy wynik dodatni** uznaje się próbę, z której co najmniej jedna kolonia została potwierdzona jako koagulazododatnia.

4. *Bacillus cereus*

a. Oznaczanie liczby

- Posiew metodą powierzchniową na podłoże MYP z mannitolem, czerwienią fenolową, polimyksyną i emulsją żółtka jaja. Warunki inkubacji: 37-55°C/18-24 godzin, lub przez 48 godzin, jeśli po pierwszej dobie kolonie nie są wyraźnie widoczne.

Kolonie *B. cereus* są duże, różowe (brak fermentacji mannitolu) i zwykle, ale nie zawsze, są otoczone strefą zmętnienia w wyniku lecytyny z emulsji żółtka jaja z lecytynazą – enzymem wytwarzanym przez *B. cereus*.



Rys. Kolonie *Bacillus cereus* na podłożu MYP-agar.

- **Badania potwierdzające:** z każdej płytki wziętej do liczenia wybiera się po 5 charakterystycznych kolonii (ze strefą zmętnienia lub bez strefy) do potwierdzenia. Każdą z nich posiewa się za pomocą jałowego drucika na zestalone w płytkach podłoże agarowe z odwłóknioną krwią baranią punktowo na powierzchnię podłoża lub przez wkłucie.

Warunki inkubacji: 30°C/24 godz., po czym sprawdza się czy wokół kolonii nastąpiła hemoliza krwi, czyli strefa odbarwienia podłoża. Wystąpienie takiej strefy jest reakcją dodatnią, potwierdzającą prawdopodobieństwo *B. cereus*.

Pałeczki Salmonella, stanowią kryteria higieniczne ale są również oznaczane w produktach gotowych wprowadzanych do obrotu i głównie stanowią kryterium bezpieczeństwa produktu. W związku z tym metodyka ich oznaczania zostanie przedstawiona na kolejnych ćwiczeniach.

5. Kryteria dodatkowe

Kryteria te nie wynikają z przepisów prawnych ale są często oznaczane przez producentów żywności:

a. Wykrywanie obecności pałeczek grupy coli w określonej ilości materiału

- **Posiew namnażający** po 1 cm³ wybranego rozcieńczenia w 3 powtórzeniach do probówek z wybiórczą pożywką z siarczanem sodowo-laurylowym i rurką Dürhama. Warunki inkubacji: 30°C/48 godz. Wynik dodatni – zmętnienie lub zmętnienie i gaz w 2 lub w 3 probówkach.

- **Posiewy potwierdzające:** z każdej pozytywnej próby należy wykonać posiew eż do pożywki z laktozą, żółcią i zielenią brylantową. Warunki inkubacji: 30°C/24-48 godz. **Wynik dodatni** – zmętnienie i gaz w co najmniej 2 probówkach.

b. Oznaczanie NPL pałeczek grupy coli metodą 3-probówkową

- **Posiew namnażający** do pożywki z siarczanem sodowo-laurylowym min. trzech kolejnych rozcieńczeń. Warunki inkubacji: 30°C/48 godz. Wynik dodatni – zmętnienie lub zmętnienie i gaz.
- **Posiewy potwierdzające:** z każdej pozytywnej próby posiew eż do pożywki z żółcią, laktozą i zielenią brylantową. Warunki inkubacji: 30°C/24-48 godz. Po inkubacji odczytuje się wynik NPL wg zasad omówionych na ćwiczeniu 9.

c. Oznaczanie liczby pałeczek grupy coli

Posiew na podłoże VRBL-agar (agar z fioletem krystalicznym, czerwienią obojętną, żółcią i laktozą). Warunki inkubacji: 37°C/24 godz. Liczy się charakterystyczne ciemnopurpurowo-czerwone kolonie otoczone czerwoną strefą.

d. Oznaczanie liczby *Enterococcus* sp.

Posiew metodą powierzchniową na podłoże Slanetz'a (z azydkiem sodu i TTC). Warunki inkubacji: 37°C/48 godz. Liczy się charakterystyczne, drobne kolonie barwy różowej, o różnej intensywności zabarwienia.

Część praktyczna:

1. Odczyt posiewów i interpretacja wyników z ćwiczenia 10.
2. Oznaczanie obecności w 1 cm³ materiału pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* – cała grupa (etapy: przednamnażania i namnażania selektywnego przygotowane – oznaczenie rozpocząć od etapu różnicowania)
3. Oznaczanie liczby *Escherichia coli* – ½ grupy
Wykonać posiew (bez powtórzeń) bezpośrednio z **materiału A**.
4. Oznaczanie obecności gronkowców koagulazododatnich – ½ grupy
Obecność oznaczyć w 1 cm³ **materiału B**. Posiewy na pożywce Giolitti-Cantoni inkubować w anaerostacie.