



Ćwiczenie 10

Temat: Metody ilościowe w mikrobiologicznych badaniach żywności Cz.2

Według obowiązujących przepisów w żywności oznacza się grupy drobnoustrojów określone jako wskaźniki higieny procesu oraz wskaźniki bezpieczeństwa produktu.

Producenci żywności mając na uwadze zapewnienie właściwej jakości produktów oraz ich trwałość mimo braku wymagań prawnych poszerzają zakres analiz o oznaczanie grup drobnoustrojów mogących ze względu na swój metabolizm powodować wady produktów lub znacznie skracać jego termin przydatności do spożycia.

Przed podjęciem decyzji o zakresie wykonywanych analiz mikrobiologicznych żywności trzeba dobrze poznać specyfikę produktu (rodzaj i jakość surowców używanych do jego produkcji, proces technologiczny, sposoby przechowywania).

W produktach fermentowanych nie oznacza się liczby mezofilnych bakterii tlenowych, ponieważ na agarze odżywczym może wyrosnąć obok drobnoustrojów zanieczyszczających produkt część mikroflory technologicznej (mikroflora szczepionek lub zakwasów). Natomiast bardzo często oznacza się w tej żywności liczbę drobnoustrojów dodanych jako szczepionki, np. w jogurcie oznacza się liczbę *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. W ostatnim dniu trwałości jogurtu, liczba tych bakterii nie powinna być mniejsza niż 10^7 kom/cm³.

Z kolei w produktach przechowywanych chłodniczo znacznie więcej informacji dostarcza poziom zanieczyszczenia drobnoustrojami psychrotrofowymi niż liczba mezofilnych bakterii tlenowych, np. przy przechowywaniu mięsa drobiowego w temperaturze 2°C bakterie psychrotrofowe i psychrofilne stopniowo opanowują to środowisko i mogą stanowić nawet 96% ogólnej liczby drobnoustrojów.

W produktach o znacznie obniżonej aktywności wody, np. w przyprawach najczęściej główną mikroflorę stanowią przetrwalniki *Bacillus* sp. i *Clostridium* sp. oraz zarodniki grzybów.



Wybrane grupy drobnoustrojów najczęściej oznaczanych w żywności

1. Liczba mezofilnych bakterii tlenowych

Posiew wgłębnny; podłoże - agar odżywczy, inkubacja w 30°C przez 72 godz..

2. Liczba grzybów (drożdży i pleśni)

Posiew wgłębnny - podłoże wybiórcze agar z chloramfenikolem (YGC-agar), inkubacja w 25°C przez 5 dni. Zazwyczaj po inkubacji osobno liczy się kolonie drożdży i pleśni.

3. Liczba drobnoustrojów psychrotrofowych

Posiew wgłębnny – podłoże agar odżywczy, inkubacja:
w 6,5°C przez 10 dni (metoda standardowa),
w 21°C przez 25 godz. (metoda szybka).

4. Liczba bakterii kwaszących

Oznaczenie to stosuje się w zasadzie tylko przy oznaczaniu liczby paciorkowców fermentacji mlekowej w fermentowanych produktach mleczarskich i zakwasach.

Posiew wgłębnny lub powierzchniowy - podłoże różnicujące z laktozą i błękitem chińskim (podłoże wg Demetera), inkubacja w 30°C przez 72 godz.

Bakterie kwaszące tworzą na tym podłożu ciemnogrnatowe kolonie otoczone granatową strefą zakwaszenia (kolonie paciorkowców są małe, okrągłe i regularne, inne laktozo-dodatnie bakterie np. pałeczki grupy coli tworzą na tym podłożu znacznie większe kolonie), kolonie bakterii laktozo-ujemnych (niekwaszących) są zwykle białe, szare lub kremowe.

5. Liczba pałeczek fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus*

Posiew wgłębnny lub powierzchniowy - podłoże MRS-agar, inkubacja w warunkach beztlenowych w 37°C przez 72 godziny.

Kolonie pałeczek *Lactobacillus* sp. mają barwę białą, kremową lub szarą, są okrągłe najczęściej z równym brzegiem, lekko wypukłe z połyskiem.



6. Oznaczanie drobnoustrojów przetrwalnikujących

Liczbę przetrwalników bakterii tlenowych i beztlenowych oraz ich obecność i NPL oznacza się w próbach badanej żywności po procesie pasteryzacji w temperaturze 80°C przez 15 minut. Proces ten niszczy komórki wegetatywne, a pozostają tylko przetrwalniki.

6a. Oznaczanie liczby przetrwalników *Bacillus* sp.

Posiew metodą powierzchniową – podłoże agar odżywczy, inkubacja w 30°C przez 48 godz. Na podłożu wyrastają tylko kolonie *Bacillus* sp., najczęściej białe lub kremowe, różniące się wielkością i morfologią.

6b. Oznaczanie beztlenowych laseczek przetrwalnikujących redukujących siarczany (IV) [siarczyny]

Wykrywanie obecności w 1 cm³ lub w 0,1 cm³ badanego materiału:

Posiewy w próbkach należy zalać upłynnionym i ostudzonym do temp. ok. 45°C podłożem różnicującym, zawierającym siarczan (IV) sodu, cytrynian żelazowo-amonowy i nadmanganian potasu (do 100 cm³ podłoża dodaje się po 1 cm³ roztworów każdego odczynnika). Wymieszać i po zestaleniu zalać warstwą agaru wodnego (2-3 cm), inkubacja w 37°C przez 1-4 dni. Kontrola wzrostu co 24 godziny (zaznacza się próbki, w których pojawiły się czarne kolonie). Wzrost w 2 lub 3 powtórzeniach pozwala na stwierdzenie obecności przetrwalników beztlenowców redukujących siarczany (IV) w badanej ilości materiału.

6c. Oznaczanie beztlenowych laseczek przetrwalnikujących sacharolitycznych (gazotwórczych)

Posiew do probówek zawierających upłynniony i ostudzony do 45°C agar odżywczy z glukozą. Probówki należy wymieszać w dłoniach (nie należy w tym celu używać vortexu lub innego mieszadła aby uniknąć nadmiernego natlenienia pożywki), - inkubacja w 37°C przez 48 godz.

Porozrywanie słupka podłoża w 2 lub 3 probówkach świadczy o obecności beztlenowców gazotwórczych w badanej ilości materiału.

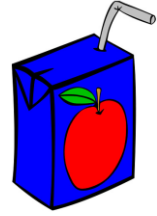


Część praktyczna

1. Odczyt i interpretacja posiewów wykonanych na ćwiczeniu 9.

2. Analiza pasteryzowanego soku owocowego lub warzywnego – ½ grupy

Sok dokładnie wymieszać poprzez 25-krotne odwrócenie opakowania. Opakowanie otworzyć z zachowaniem warunków jałowości i przelać do jałowej kolbki oraz ok. 5 cm³ do jałowej probówki. Sok w probówce spasteryzować w temp. 80°C przez 15 minut i schłodzić pod bieżącą wodą.



Oznaczenia:

Wszystkie posiewy wykonuje się bezpośrednio z soku.

- > Liczba bakterii tlenowych mezofilnych
- > Liczba drożdży i pleśni
- > Obecność beztlenowców przetrwalnikujących sacharolitycznych w 1 cm³

3. Analiza sera dojrzewającego



Z przygotowanej naważki sera przygotować rozcieńczenie 1:10, część spasteryzować.

Oznaczenia:

- > Liczba drożdży i pleśni
- > Obecność beztlenowców przetrwalnikujących sacharolitycznych w 0,1g.