



## Ćwiczenie 9

### Temat: Metody ilościowe w mikrobiologicznych badaniach żywności Cz.1

#### Pobieranie prób do badań

Próbka pobrana do badań mikrobiologicznych powinna być „reprezentatywna” tzn. powinna odzwierciedlać stan całego badanego produktu. Najczęściej do badań ilościowych pobiera się 10g lub 10cm<sup>3</sup> produktu. Produkty płynne należy przed pobraniem próbki dokładnie wymieszać. Z produktów stałych i sypkich jałowym skalpelem, łyżeczką lub świdrem pobiera się 10g produktu, przenosi do jałowego woreczka, dodaje się do 90cm<sup>3</sup> płynu do rozcieńczeń i homogenizuje (np. w stomacherze) w celu ujednoczenia próby.

Żywność o spodziewanej dużej liczbie drobnoustrojów (w jednym mililitrze/gramie mogą się znajdować miliony (10<sup>6</sup>) lub nawet miliardy (10<sup>9</sup>) komórek) należy przed posiewem rozcieńczyć - zwykle stosuje się szeregi 10-krotnych rozcieńczeń w postępie geometrycznym.

#### Przygotowanie 10-krotnych rozcieńczeń badanego materiału

Po wymieszaniu próbki badanego materiału płynnego pobiera się jałową pipetą 10 cm<sup>3</sup>, przenosi do kolby zawierającej 90 cm<sup>3</sup> płynu rozcieńczającego (nie zanurzając pipety w płynie), dokładnie miesza. W ten sposób otrzymuje się rozcieńczenie 1:10, oznaczane jako 1. Z produktów stałych i sypkich rozcieńczenie 1:10 otrzymuje się na etapie ujednoczenia próby. (patrz pobieranie prób do badań)

Następnie z pierwszego (1:10) rozcieńczenia (dokładnie wymieszanego) przenosi się 1 cm<sup>3</sup> do próbki zawierającej 9 cm<sup>3</sup> płynu rozcieńczającego (nie zanurzając pipety w płynie). W ten sposób otrzymuje się rozcieńczenie 1:100, czyli 2.

Po dokładnym wymieszaniu i przeniesieniu nową pipetą szklaną (lub końcówką pipety automatycznej) 1 cm<sup>3</sup> rozcieńczenia 2 do 9 cm<sup>3</sup> płynu rozcieńczającego otrzymuje się rozcieńczenie 1:1000, czyli 3.

W analogiczny sposób wykonuje się kolejne rozcieńczenia w zależności od spodziewanego zanieczyszczenia mikrobiologicznego badanej próby.

Najczęściej stosowane w analizie mikrobiologicznej rozcieńczalniki to :

- płyn fizjologiczny – (0,85% roztwór wodny NaCl)
- płyn Ringera – (mieszanka: wody, chlorków: sodu, potasu, wapnia i dwuwęglanu sodu)
- płyn fizjologiczny z peptonem – (płyn fizjologiczny z dodatkiem 0,1% peptonu kazeinowego)
- płyn fizjologiczny z cytrynianem
- płyn fizjologiczny z buforem fosforanowym

#### Metody oznaczeń ilościowych

W badaniach mikrobiologicznych żywności przeprowadza się oznaczenie liczby m. in.

- bakterii tlenowych mezofilnych
- grzybów



- mikroorganizmów psychrotrofowych
- bakterii kwaszących
- bakterii proteolitycznych
- pałeczek z grupy coli lub całej rodziny *Enterobacteriaceae*
- paciorkowców kałowych z rodzaju *Enterococcus*

Do oznaczania liczby drobnoustrojów metodą hodowlaną stosuje się głównie dwie metody:

### 1) płytkową z użyciem pożywek stałych

- a) posiew wgłębnny
- b) posiew powierzchniowy,

### 2) oznaczania najbardziej prawdopodobnej liczby drobnoustrojów (NPL)

#### Ad. 1. Oznaczenie liczby drobnoustrojów metodą płytkową

Metoda oznaczania liczby drobnoustrojów przez posiew na podłoże stałe zakłada, że liczba powstających kolonii odpowiada liczbie żywych komórek w badanej próbce. Wynik podaje się w jednostkach tworzących kolonie - jtk ( ang. cfu - colony forming units) w 1g lub 1cm<sup>3</sup> produktu. .

#### 1 a. Posiewy wgłębne

- Posiew do płytki Petriego po 1 cm<sup>3</sup> wybranych kolejnych rozcieńczeń w dwóch powtórzeniach; *podłoża*: agar odżywczy przy oznaczaniu liczby mezofilnych bakterii tlenowych lub podłoże wybiórcze, wybiórczo-różnicujące lub różnicujące przy oznaczaniu liczby wybranych grup drobnoustrojów.
- Warunki inkubacji: przy oznaczaniu liczby mezofilnych bakterii tlenowych - 30°C przez 72 godz., lub optymalne temperatury przy oznaczaniu wybranych grup drobnoustrojów.
- *Zasada odczytania wyników*:

Do odczytu wybiera się płytki z 2 kolejnych rozcieńczeń, na których wyrosło od 30 do 300 kolonii. Liczbę drobnoustrojów (L) w 1 cm<sup>3</sup> lub w 1 g próbki oblicza się wg wzoru:

$$L = \frac{C}{(N_1 + 0,1N_2)} \cdot d, \text{ gdzie:}$$

C - suma kolonii na wszystkich płytkach wybranych do liczenia

N<sub>1</sub> - liczba płytek z pierwszego liczonego rozcieńczenia

N<sub>2</sub> - liczba płytek z drugiego liczonego rozcieńczenia

d - wskaźnik rozcieńczenia odpowiadający pierwszemu (najniższemu) liczonemu rozcieńczeniu



**przykład:**

rozcieńczenie :	2	3	4
liczba wyrosłych koloni na pierwszej płytce > 300	150	15	
liczba wyrosłych koloni na drugiej płytce > 300	156	16	

$$L = \frac{337}{2+0,1 \cdot 2} \cdot 1000 = 154181$$

Z uwagi na to, że liczbę drobnoustrojów wyraża się liczbą z jednym miejscem po przecinku należy dokonać zaokrąglenia zgodnie z regułami matematyki

$$L=1,5 \times 10^5 \text{ jtk/cm}^3 \text{ lub g}$$

Do odczytu wyników można wybrać jedno rozcieńczenie, policzyć kolonie na płytkach z równoległych powtórzeń, wyliczyć średnią liczbę kolonii w rozcieńczeniu i przeliczyć na 1 cm<sup>3</sup> lub 1 g próby, mnożąc przez odwrotność rozcieńczenia.

Wynik podaje się w jednostkach tworzących kolonie (jtk) w 1 cm<sup>3</sup> lub 1 g produktu

### 1 b. Posiewy powierzchniowe

*Posiewy wykonuje się nanosząc badany materiał na powierzchnię zestalonego podłoża.*

**UWAGA:** Przed posiewem, płytki z pożywką podsuszamy w celu usunięcia kondensatu wody z powierzchni pożywki. Płytki należy podsuszać w temp. 40°C przez 30-60 min. W tym celu umieszcza się płytki w termostacie, otwiera i układa tak, aby denko było oparte na wieczku płytki; zarówno wieczko jak i denko są odwrócone.

- Posiew do płytki Petriego z zestalonym podłożem po 0,1 cm<sup>3</sup> wybranych kolejnych rozcieńczeń próby w dwóch powtórzeniach.

Posiany materiał rozprowadza się jałową, zgiętą bagietką na powierzchni całego podłoża, aż do wsiąknięcia.

- *Podłoża:* przy oznaczaniu liczby mezofilnych bakterii tlenowych - agar odżywczy, przy oznaczaniu innych wybranych grup drobnoustrojów podłoże wybiórcze, różnicujące lub różnicująco-wybiórcze.

- *Warunki inkubacji:* przy oznaczaniu liczby mezofilnych bakterii tlenowych - 30°C przez 72 godz., przy oznaczaniu innych, wybranych grup drobnoustrojów optymalne temperatury i czas.

- *Zasada odczytania wyników:*

Do odczytu wybiera się płytki z 2 kolejnych rozcieńczeń, na których wyrosło od 15 do 150 kolonii. Liczbę drobnoustrojów (L) w 1 cm<sup>3</sup> lub w 1 g próbki oblicza się wg wzoru:

$$L = \frac{C}{(N_1 + 0,1N_2)} \cdot d \cdot a, \text{ gdzie:}$$

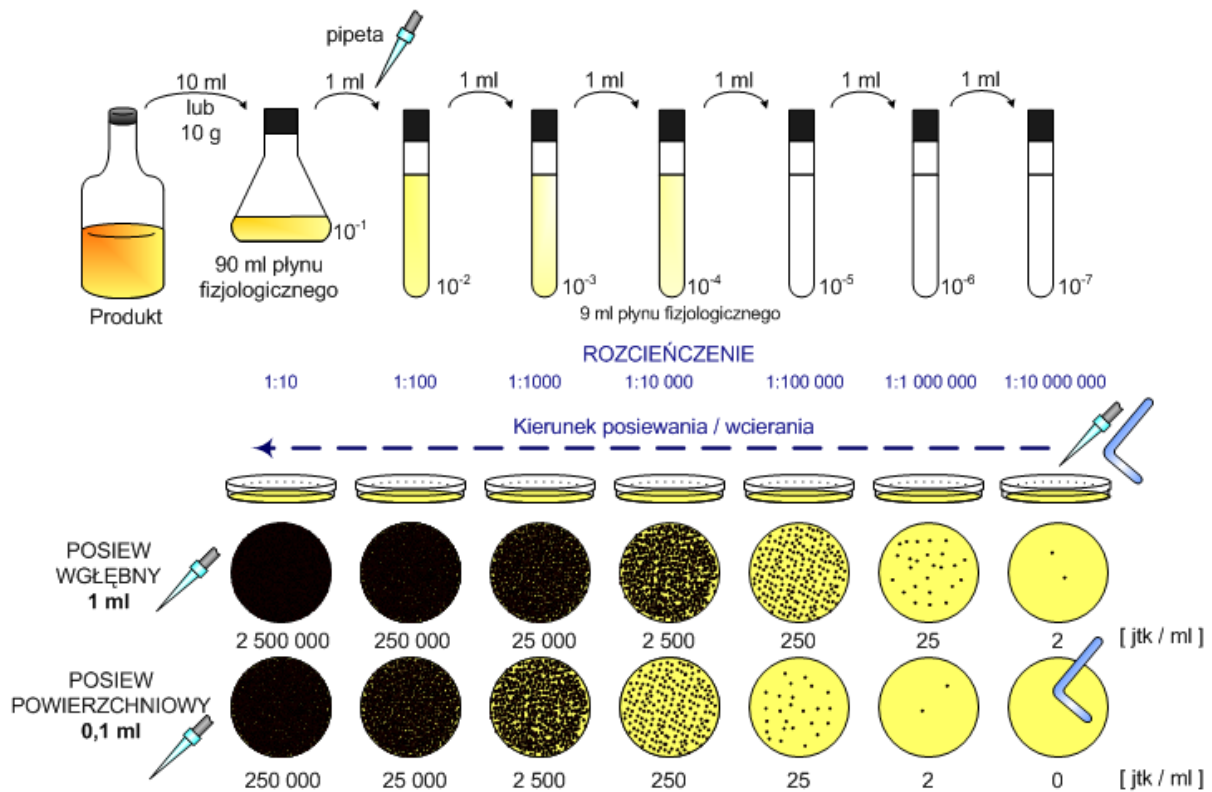


- C - suma kolonii na wszystkich płytkach wybranych do liczenia
- $N_1$  - liczba płytek z pierwszego liczonego rozcieńczenia
- $N_2$  - liczba płytek z drugiego liczonego rozcieńczenia
- d - wskaźnik rozcieńczenia odpowiadający pierwszemu (najniższemu) liczonemu rozcieńczeniu
- a - współczynnik posianej ilości materiału, przy posiewie  $0,1\text{ cm}^3$  a = 10

Do odczytu wyników można wybrać jedno rozcieńczenie, policzyć kolonie na płytkach z równoległych powtórzeń, wyliczyć średnią liczbę kolonii w rozcieńczeniu i przeliczyć na  $1\text{ cm}^3$  lub  $1\text{ g}$  próby, uwzględniając liczone rozcieńczenie i posiewaną objętość.

Wynik podaje się w jednostkach tworzących kolonie (jtk) w  $1\text{ cm}^3$  lub  $1\text{ g}$  produktu

Schemat wykonywania rozcieńczeń i posiewów metodą wglębną i powierzchniową



### Modyfikacje metody płytkowej oznaczania liczby drobnoustrojów

#### Oznaczanie liczby drobnoustrojów metodą sączenia przez filtr membranowy

Dla prób o niewielkiej liczbie drobnoustrojów (np. napoje, woda wodociągowa) można zastosować metodę polegającą na przesączeniu badanej próbki (np. objętości  $100\text{ cm}^3$ ) przez sączek membranowy, a następnie położeniu sączka na podłożu stałym i po okresie inkubacji policzeniu kolonii wyrosłych na powierzchni sączka.



### Petrifilmy

Petrifilm składa się z 2 części:

- papierowej podstawy, podzielonej na kwadraty i pokrytej warstwą polietylenu, na której jest naniesiona pożywka hodowlana (agar odżywczy, podłoże wybiórcze itp.),
- przezroczystej folii propylenowej; zawierającej czynnik żelujący i wskaźnik barwny.

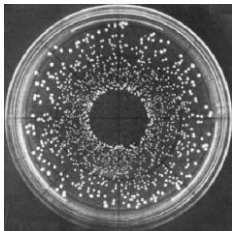
- Wykonanie posiewu:

na podstawę z wybranym podłożem nanosi się  $1 \text{ cm}^3$  produktu lub jego rozcieńczenia, przykrywa warstwą foliową i odciska folię specjalnym krążkiem (dyfuzorem).

- Warunki inkubacji: odpowiednie dla oznaczanej grupy drobnoustrojów.

Odczytanie wyników: po inkubacji liczy się wszystkie charakterystyczne kolonie dla oznaczanej grupy drobnoustrojów, następnie uwzględniając rozcieńczenie przelicza się liczbę kolonii na  $1 \text{ cm}^3$  lub  $1 \text{ g}$  próby, a wyniki podaje się w jtk w  $1 \text{ cm}^3$  lub  $1 \text{ g}$  produktu.

### System płytki spiralnej



W metodzie tej rozcieńczenie jest precyzyjnie rozprowadzane po powierzchni płytki, tworząc spiralę Archimedesesa. System ten znacznie ogranicza czas analizy i ilość materiałów, ponieważ na jednej płytce można wykryć mikroorganizmy występujące w liczbie 400-400000 komórek/g lub  $\text{cm}^3$ .

### Metoda „Droplet”

Rozcieńczoną próbę miesza się w stosunku 1:9 z upłynnionym podłożem agarowym. Następnie zaszczerpione podłoże nanosi się w postaci kropli, o objętości  $0,1 \text{ cm}^3$ , na plastikowe płytki i po skróconym czasie inkubacji liczy się mikrokolonie za pomocą lupy lub specjalnego czytnika.

### **Metody bezpośredniego liczenia drobnoustrojów**

Metody te polegają na bezpośrednim liczeniu drobnoustrojów pod mikroskopem.

#### Mikroskopia fluorescencyjna (DEFT)

Wykonanie oznaczenia obejmuje filtrowanie odpowiednio przygotowanej próby a następnie barwienie osiadłych na filtrze drobnoustrojów fluorescencyjnym barwnikiem np. oranżem akrydyny i policzenie liczby bakterii przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Technika ta pozwala na oznaczenie komórek martwych i żywych.

#### Liczenie drobnoustrojów przy użyciu komór

Komory do liczenia drobnoustrojów pod mikroskopem to najczęściej szklane płytki z wyciętym wgłębieniem, podzielonym na kwadraty lub prostokąty o znanej powierzchni. Po naniesieniu rozcieńczenia do komory dokonuje się liczenia komórek widocznych w obrazie mikroskopowym, a następnie przelicza się ich liczbę na  $1 \text{ cm}^3$  badanego materiału. Najczęściej stosuje się komory: Thoma, Howarda, Börkera, Fuch Rosenthala.



## Metody oznaczania liczby drobnoustrojów na podstawie ich aktywności metabolicznej

Testy reduktazowe – są oparte na obserwacjach zmian zachodzących w podłożach w wyniku aktywności metabolicznej drobnoustrojów. Enzymy bakterii przenoszą atomy wodoru na barwniki (najczęściej błękit metylenowy, resazuryna, chlorek tetrazoliowy) powodując zmianę ich barwy. Aktywność enzymów jest zależna od ilości mikroorganizmów, więc miernikiem ich liczby jest czas, w którym zajdzie zmiana zabarwienia stosowanego barwnika.

Metoda impedymetryczna – polega na pomiarze zmian parametrów elektrycznych środowiska w wyniku rozwoju drobnoustrojów. Mikroorganizmy podczas wzrostu powodują zmiany przewodności elektrycznej układu (pożywka wraz z mikroorganizmami), przekształcając polisacharydy, białka i tłuszcze do dobrze dysocjujących związków takich jak: kwasy organiczne, aminokwasy i kwasy tłuszczowe. W miarę gromadzenia produktów metabolizmu następuje obniżenie oporu w czasie przepływu prądu elektrycznego pomiędzy elektrodami zanurzonymi w hodowli mikroorganizmów, co zostaje zarejestrowane przez instrument pomiarowy.

Cytometria przepływowa – polega na pomiarze fizycznych oraz niekiedy chemicznych cech komórek, które są zawieszone w roztworze i pojedynczo przepływają przez sensory optyczne gdzie są oświetlane źródłem światła, co pozwala na rejestrację ich liczby.

## Oznaczanie najbardziej prawdopodobnej liczby (NPL) bakterii

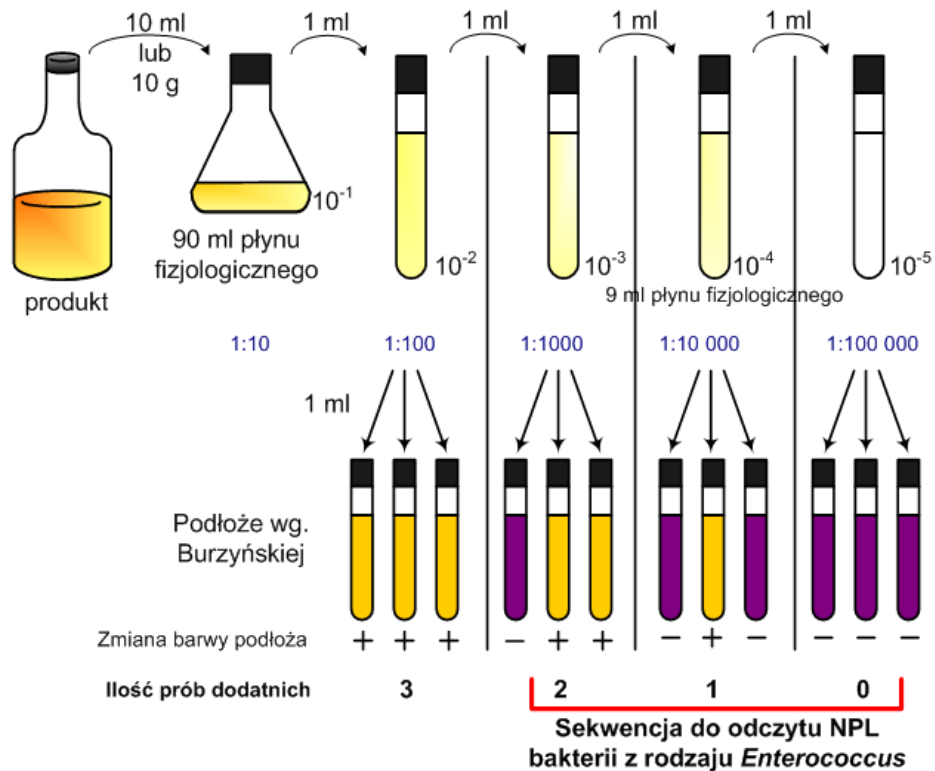
Metoda ta jest stosowana do oznaczania tylko nielicznych grup bakterii, które występują w badanej żywności w niewielkich ilościach lub takich drobnoustrojów, których hodowla metodą płytkową jest niemożliwa lub utrudniona. Najczęściej metodą tą wykonuje się oznaczenia pałeczek grupy coli, *E. coli* lub bakterii fermentacji masłowej i gnilnych beztlenowców przetrwalnikujących. W badaniach stosuje się albo pożywkę selektywną, albo specjalne warunki hodowli i pożywki, które zapewniają wykrycie konkretnej badanej grupy bakterii.

### Zasada oznaczenia:

- Posiew próbki i jej kilku (minimum trzech kolejnych) rozcieńczeń do pożywek selektywnych w próbkach, w trzech równoległych powtórzeniach.
- Warunki inkubacji odpowiednie dla badanej grupy bakterii.
- Po inkubacji dla każdego posianego rozcieńczenia zapisuje się liczbę prób dodatnich (w których stwierdzono objawy wzrostu badanej grupy drobnoustrojów); do odczytu wybiera się 3 kolejne rozcieńczenia; z zapisanych dla nich sekwencji trzech liczb (próby dodatnie) odczytuje się ze specjalnych tabel wskaźnik NPL, którego wartość mnoży się przez współczynnik pierwszego z 3 rozcieńczeń wybranych do odczytu – w ten sposób uzyskuje się wartość NPL w 1 cm<sup>3</sup> lub 1 g.



**PRZYKŁAD:**



rozcieńczenie próby:            2 (1:100)            3 (1:1000)            4(1:10000)            5(1:100000)  
ilość prób pozytywnych:            3                            2                            1                            0

Z tabel odczytujemy wskaźnik NPL dla sekwencji 210 – wynosi on 1,5. Mnożymy wskaźnik przez 1000 (odwrotność najniższego wybranego do odczytu rozcieńczenia). NPL wynosi 1500, tj.  $1,5 \cdot 10^3$  jtk/cm<sup>3</sup>.



Tabela 1. Wskaźniki NPL dla posiewów 3-probówkowych

Liczba wyników dodatnich w wybranych 3 rozcieńczeniach			Wskaźnik NPL	Kategorie prawdopodobieństwa przy różnej liczbie próbek z partii				
				1	2	3	5	10
0	0	0	<0,30					
0	0	1	0,30	3	2	2	2	1
0	1	0	0,30	2	1	1	1	1
0	1	1	0,61	0	3	3	3	3
0	2	0	0,62	3	2	2	2	1
0	3	0	0,94	0	0	0	0	3
1	0	0	0,36	1	1	1	1	1
1	0	1	0,72	2	2	1	1	1
1	0	2	1,1	0	0	0	3	3
1	1	0	0,74	1	1	1	1	1
1	1	1	1,1	3	3	2	2	2
1	2	0	1,1	2	2	1	1	1
1	2	1	1,5	3	3	3	3	2
1	3	0	1,6	3	3	3	3	2
2	0	0	0,92	1	1	1	1	1
2	0	1	1,4	2	1	1	1	1
2	0	2	2,0	0	3	3	3	3
2	1	0	1,5	1	1	1	1	1
2	1	1	2,0	2	2	1	1	1
2	1	2	2,7	0	3	3	3	3
2	2	0	2,1	1	1	1	1	1
2	2	1	2,8	3	2	2	2	1
2	2	2	3,5	0	0	0	0	3
2	3	0	2,9	3	2	2	2	1
2	3	1	3,6	0	3	3	3	3
3	0	0	2,3	1	1	1	1	1
3	0	1	3,8	1	1	1	1	1
3	0	2	6,4	3	3	2	2	2
3	1	0	4,3	1	1	1	1	1
3	1	1	7,5	1	1	1	1	1
3	1	2	12	3	2	2	2	1
3	1	3	16	0	0	0	3	3
3	2	0	9,3	1	1	1	1	1
3	2	1	15	1	1	1	1	1
3	2	2	21	2	1	1	1	1
3	2	3	29	3	3	3	2	2
3	3	0	24	1	1	1	1	1
3	3	1	46	1	1	1	1	1
3	3	2	110	1	1	1	1	1
3	3	3	>110					

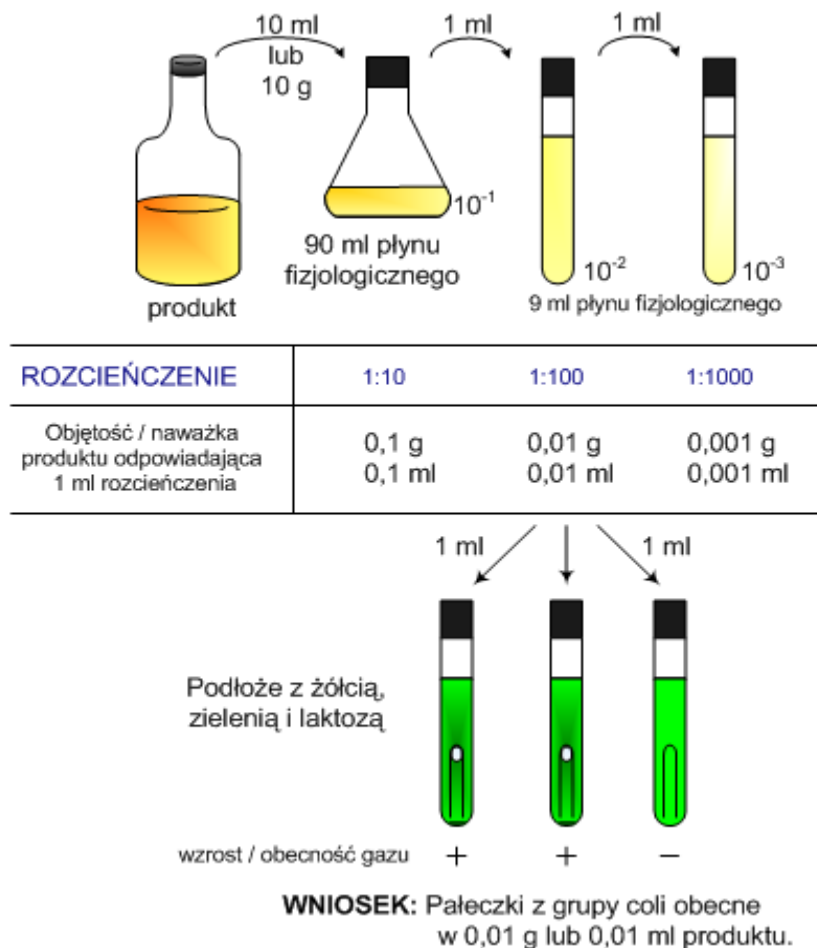




## Wykrywanie obecności drobnoustrojów

W mikrobiologicznej analizie żywności w określonych przypadkach nie oznaczamy liczby mikroorganizmów tylko stwierdzamy ich obecność w określonej objętości próby np. w 1; 0,1 g/cm<sup>3</sup> itd. Najczęściej wykrywa się obecność pałeczek grupy coli, *E. coli*, *Enterococcus* sp., beztlenowców przetrwalnikujących, i bakterii chorobotwórczych. Oznaczenie wykonuje się poprzez posiew 1cm<sup>3</sup> próby lub/i jej rozcieńczenia do odpowiedniej pożywki wybiórczej w trzech powtórzeniach. W żywności wykrywa się również obecność drobnoustrojów chorobotwórczych, najczęściej jednak w objętości 10; 25 g lub cm<sup>3</sup>. Oznaczenia te są wieloetapowe, zasady tych oznaczeń zostaną przedstawione na kolejnych ćwiczeniach.

### PRZYKŁAD:





## Część praktyczna

Z badanego materiału należy wykonać trzy rozcieńczenia i oznaczyć

### 1) Liczbę mezofilnych bakterii tlenowych:

- a) metodą wgłębną – posiew po  $1\text{cm}^3$  rozcieńczenia 1:1000 w dwóch powtórzeniach.
- b) metodą powierzchniową - posiew po  $0,1\text{cm}^3$  rozcieńczenia 1:100 w dwóch powtórzeniach.

2) Oznaczyć obecność paciorkowców *Enterococcus* sp. (pożywka wg Burzyńskiej) w 0,1 lub  $0,01\text{cm}^3$  badanego materiału.

3) Odczytać z tablic NPL pałeczek grupy coli z zestawów znajdujących się na stanowiskach.