

MIKROBIOLOGIA OGÓLNA I ŻYWNOŚCI

PRZEWODNIK DO ĆWICZEŃ DLA STUDENTÓW II ROKU

KIERUNKU DIETETYKA

(opracowanie: dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska)

KATEDRA MIKROBIOLOGII PRZEMYSŁOWEJ I ŻYWNOŚCI

WYDZIAŁ NAUKI O ŻYWNOŚCI

OLSZTYN 2017

Ćwiczenie 1.

Zasady organizacji laboratorium mikrobiologicznego. Sterylizacja i dezynfekcja podstawą prawidłowej i bezpiecznej pracy w laboratorium mikrobiologicznym. Zasady mikroskopowania, cz. I.

1. Regulamin dotyczący pracowni mikrobiologicznej- podpisują.
2. Zasady zaliczenia zajęć- sylabus.
3. Omówienie zasad sterylizacji i dezynfekcji.
4. Omówienie wyposażenia.

Część praktyczna:

1. Mikroskopowanie
2. Posiewy rąk.

Ćwiczenie 2

Morfologia kolonii bakterii. Morfologia komórek bakterii. Metody barwienia. Mikroskopowanie – cz. II. Podłoża stosowana do hodowli drobnoustrojów. Metody hodowli drobnoustrojów.

KOLOKWIMUM I

Zakres materiału: Sterylizacja, dezynfekcja. Budowa komórki bakteryjnej. Metody barwienia.

Część praktyczna:

1. Opis wyrosłych kolonii.
2. Preparat barwiony fioletem.
3. Preparat barwiony nigrozyną – wymaz z zęba.
4. Preparat barwiony Gramem - mieszanina: *E. coli*, *Serratia*, *Enterococcus*,

POSIEWY:

- Powierzchniowy – izolacyjny mieszaniny na podłoża:
 - agar odżywczy
 - Endo
 - Słanetz
- Posiew na skos z kolonii wyrosłej z ręki
- Posiew do bulionu kolonii wyrosłej z ręki
- Hodowle beztlenowe- omówić

Morfologia koloni bakterii - podłoże stałe:

Kształt, wielkość, brzeg, wyniosłość, kolor, zawieszalność

Morfologia komórki – podłoże stałe:

Kształt, wielkość, układ, omówić morfologię, G +, G-

Barwienie – przygotowanie preparatu do barwienia

Barwienie negatywne - nigrozyna – wymaz z zęba

Barwienie pozytywne - proste i złożone

PROSTE: fiolet - wyrosła kolonia

ZŁOŻONE: mieszanina – metoda Grama

Podłoża –wymagania stawiane podłożom

Skład podłoż, podział podłoż

Metody hodowli – omówić - warunki tlenowe i beztlenowa

Posiewy – podłoże płynne – bulion

Podłoża stałe - skos, słupek agarowy

- płytki: posiew powierzchniowy, posiew wgłębny

Pokój przygotowawczy

Na grupę

1. Pełna szafa – sala ćwiczeń
-szkiełka, szmatki, bibuła
2. Ezy na każdym stanowisku
3. Końcówki do pipet
4. Pipety automatyczne na każdym stanowisku
5. Słój do hodowli beztlenowców + saszetka - tylko do pokazania

Pożywkarnia

Na grupę

1. Barwniki do met. Grama + nigrozyna
2. Podłoża: Słanetz – 14.szt
Endo- 14.szt.
Agar odżywczy- 14 szt.
Bulion w małych probówkach po 3 ml- 14.szt.
Płyn fizjologiczny po 3 ml w małych probówkach - **po jednej probówce**

na stanowisku na wszystkie grupy

Skos agarowy- 14.szt

Pokój posiewów

Na grupę

1. Zawiesina z mieszaniny: *E.coli* + *Serratia* + *Enterococcus* – na każdym stanowisku
- zmiana po grupie.

Ćwiczenie 3

Metody ilościowego oznaczania drobnoustrojów cz. I

Przygotowanie dziesięciokrotnych rozcieńczeń – omówić

Grzyby .

Morfologia kolonii i komórek drożdży.

Morfologia kolonii pleśni. Budowa strzępek zarodnikonośnych.

POPRAWA KOŁOKWIUM 1

Część praktyczna:

Zawiesina *E. coli* 10^4 jtk / ml

1. Przygotowanie rozcieńczeń
2. Posiewy po 1 i 0.1 ml. – posiewy na agarze odżywczym
 - powierzchniowy - 0.1 ml na płytkę
 - wgłębny – 1.0 ml

Obecność i NPL –omówić - rysując na tablicy.

3. Opis kolonii pleśni i strzępek zarodnikonośnych
4. Opis kolonii drożdży i sposobów rozmnażania wegetatywnego

Wykonanie

1. przygotowanie dziesięciokrotnych rozcieńczeń - omówić
2. metody posiewów- wgłębny i powierzchniowy- omówić

Grzyby

Saccharomyces, *Schizosaccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*

1. kształt komórki drożdży
2. rozmnażanie wegetatywne

Pleśnie

Aspergillus, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor*

1. budowa strzępki zarodnikonośnej

Pokój posiewów

Na salę

1. Zawiesina *E.coli* – 10⁴ jtk / ml
2. Posiane szczepy: Penicillium – 2 pł.
Mucor- 2 pł.
Aspergillus – 2 pł.
Geotrichum - 2pł.
Saccharomyces – 2 pł.
Schizosaccharomyces – 2 pł.
- Candida – 2 pł
- Rhodotorula – 2 pł

Pokój przygotowawczy

Na grupę

1. Pełna szafa – sala ćwiczeń
 - szkiełka, szmatki, bibuła
 - bagietki – 14 szt.
 - pipety a'1ml – 14 szt
 - pipety automatyczne,
 - końcówki do pipet

Pożywkarnia

Na grupę

1. płyn fizjologiczny po 9 ml – duży koszyk
2. agar odżywczy po 250 ml – 1 kolbka
3. agar odżywczy płytki – 14 szt.

Na salę

1. płyn fizjologiczny po 3 ml – po 1 probówce na stanowisko

Ćwiczenie 4

Metody ilościowego oznaczania drobnoustrojów cz. II

Wpływ czynników fizycznych i chemicznych na drobnoustroje występujące w żywności. Cz. I

Pokój przygotowawczy

1. Pełna szafa – sala ćwiczeń
 - szkiełka, szmatki, bibuła
 - pipety automatyczne,
 - końcówki do pipet

- pipety a 1 ml -13 szt. na grupę
- ezy

Pożywkarnia

Na grupę

1. bulion odżywczy - po 5 ml 60 szt.
2. Łącznie 80 i 63.5°

Pokój posiewów

Na salę

1. Hodowla po 3 ml (w małych probówkach)
(posiać na bulion odżywczy do kolbki i rozlać po 3 ml)

Bacillus - 5

Enterococcus-5

E.coli -5

Każdy ze studentów „bada” jeden szczep (posiew pipeta automatyczną) w temp. 63.5 i 80° - próba kontrola (3 probówki z bulionem)

3. Oddziaływanie zw. chemicznych na drobnoustroje – demonstracja – płytki na każdym stanowisku

Szczepy: Pseudomonas -14

E.coli-14

Serratia marcescens -14

Ćwiczenie 5

Wpływ czynników fizycznych i chemicznych na drobnoustroje występujące w żywności. Cz. II

Stan higieniczno-sanitarny zakładu żywienia zbiorowego.

Ocena mikrobiologiczna powietrza, wody, powierzchni. Badanie czystości rąk

Pokój przygotowawczy

1. Pełna szafa – sala ćwiczeń

-szkiełka, szmatki, bibuła

-pipety automatyczne,

-końcówki do pipet

- ezy

- tampony do rąk - po 4 w płytce 12,12, (8.00-11.15) 14 (11.30-13-45)

- tampony do sztućców - duże – 12,12,14 (j.w)

- płytki – 3 tubusy na grupę

Pożywkarnia

1. aparat do sączenia wody + sączki
2. podłoże z tergitołem - 2 płytki na grupę
3. podłoże Slanetz'a - 1 płytki na grupę
4. podłoże YGC – 13 płytek na grupę
5. podłoże agar odżywczy – 13 płytek na grupę
6. podłoże agar odżywczy – 2x 250 na grupę
7. podłoże z żółcią, zielenią, laktozą – 90 probówek – na grupę
8. podłoże G-C- 45 probówek na grupę
9. płyn Ringera po 40 ml – 13 szt na grupę.
10. płyn fizjologiczny po 20 ml – 13 szt. na Grupę

Ćwiczenie 6

Żywność fermentowana. Cz. I

Ocena jogurtów i soków z warzyw fermentowanych w kierunku obecności pałeczek *Lactobacillus* spp.

W parach oceniają jogurt, sok z warzyw (kapusty lub ogórków), posiewa każdy

Posiew po 0.1 ml z rozcieńczenia 1:1000 (3)(1:10.000 (4) na podłoże MRS

- posiew jogurtu

- sok z warzyw (kapusty lub ogórków) j.w.

Pokój posiewów

Sok z kapusty – 6 kolbek po 30 ml – na salę

Sok z ogórków – 7 kolbek po 30 ml na salę

Pojemniki do beztlenowców + saszetki – 2 szt. na salę

Pokój przygotowawczy

1. Pełna szafa – sala ćwiczeń

-szkiełka, szmatki, bibuła

-pipety automatyczne,

- końcówki do pipet

- ezy
 - bagietki – 26 na grupę
 - pipety 1 ml – 26 na grupę
2. jogurty z probiotykami – 7 szt na grupę (różne)

Pożywkarnia

1. płytki z MRS- 26 na grupę
2. PF po 9 ml – 2 koszyki na grupę

Alternatywne metody oznaczania drobnoustrojów chorobotwórczych w żywności

1. *Listeria monocytogenes* - charakterystyka

Rodzaj *Listeria* należy do typu *Firmicutes*. Do 1961 roku *L.monocytogenes* była jedynym przedstawicielem *Listeria* sp., który do tego czasu uważany był za rodzaj monotypowy. W kolejnych latach do *L. monocytogenes* dołączały kolejne gatunki i obecnie wśród rodzaju *Listeria* wyróżnić można sześć gatunków: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri* oraz *L. grayi*.

Wśród wyżej wymienionych gatunków tylko dwa są patogenne i są to: *L. monocytogenes* będący patogenem zarówno ludzi jak i zwierząt oraz *L. ivanovii* infekująca zwierzęta, głównie owce i bydło. Pojawiają się również nieliczne raporty, w których opisywane są przypadki listeriozy u ludzi wywołanej przez *L. ivanovii* i *L. seeligeri*.

Wszystkie mikroorganizmy zaklasyfikowane do rodzaju *Listeria* to Gram-dodatnie krótkie pałeczki o długości 1,2 μm i szerokości 0,5 występujące pojedynczo lub w krótkich łańcuszkach. Mogą również organizować się w skupiska i przyjmować kształt liter V i Y. *Listeria* spp. nie wytwarzają spor ani otoczki. Są to mikroorganizmy względnie beztlenowe oraz psychrotrofowe. Cechą identyfikacyjną wszystkich gatunków *Listeria* jest zdolność do ruchu przy pomocy rzęsek w zakresie temperatur 20-25⁰C. Jednak w temperaturze 37⁰C produkcja flageliny (białka budującego rzęskę) jest ograniczona, co powoduje brak zdolności poruszania się. Wszystkie gatunki są katalazo-dodatnie oraz oksydazo-ujemne. Różnią się natomiast zdolnością do fermentacji cukrów oraz właściwościami litycznymi w stosunku do erytrocytów, co stanowi podstawę do odróżniania gatunków hemolitycznych od pozostałych niehemolitycznych.

Wszystkie bakterie z rodzaju *Listeria* a w szczególności *L. monocytogenes* tolerują ekstremalne warunki, rosną w szerokim zakresie temp. 0–45⁰C oraz przy pH 6–9. Te właściwości powodują, że są one szeroko rozpowszechnione w wielu środowiskach. Najlepiej rozwinięte zdolności adaptacyjne posiada *L. monocytogenes*, która wzrasta również w temperaturze –2⁰C oraz przy pH sięgającym do 4,4. Natomiast całkowita inaktywacja bakterii tego gatunku obserwowana jest dopiero w temperaturze powyżej 75⁰C. Wszystkie te właściwości sprawiają, że są to mikroorganizmy powszechnie występujące zarówno w

produktach zwierzęcych jak i roślinnych. Szacuje się, że 99% przypadków listeriozy u ludzi jest spowodowanych spożyciem żywności zanieczyszczonej tym drobnoustrojem. Częsta obecność *L. monocytogenes* w żywności w połączeniu z wysoką śmiertelnością w wyniku infekcji wywołanej przez ten patogen (sięgającą od 20 do 30%) zdecydowanie wyróżnia listeriozę spośród innych zatruc pokarmowych i stanowi poważny publiczny problem zdrowotny.

2. Klasyczna metoda oznaczania pałeczek *Listeria monocytogenes* w żywności

Oznaczanie obecności pałeczek *Listeria monocytogenes* zgodnie z obowiązującym Rozporządzeniem Komisji Europejskiej 1441/2007 przeprowadza się zgodnie z normą ISO 11290. Oznaczanie obecności prowadzi się wg poniższego schematu:

Rodzaj żywności	Plan poboru próbek		Limity		Referencyjna metoda badania	Etap stosowania kryterium
	n	c	m	M		
Żywność gotowa do spożycia przeznaczona dla niemowląt oraz gotowa do spożycia żywność specjalnego medycznego przeznaczenia ⁽⁴⁾	10	0	Nieobecne w 25 g		EN/ISO 11290-1	Produkty wprowadzane do obrotu w ciągu okresu przydatności do spożycia
Żywność gotowa do spożycia, w której możliwy jest wzrost <i>L. monocytogenes</i> , niebędąca żywnością przeznaczoną dla niemowląt ani żywnością specjalnego medycznego przeznaczenia	5	0	100 jtk/g		EN/ISO 11290-2	Produkty wprowadzane do obrotu w ciągu okresu przydatności do spożycia
	5	0	Nieobecne w 25 g		EN/ISO 11290-1	Przed wyjściem żywności spod bezpośredniej kontroli przedsiębiorstwa sektora spożywczego, które jest jego producentem
Gotowa do spożycia żywność, w której niemożliwy jest wzrost <i>L. monocytogenes</i> , niebędąca żywnością przeznaczoną dla niemowląt ani żywnością specjalnego medycznego przeznaczenia ^{(4) (8)}	5	0	100 jtk/g		EN/ISO 11290-2	Produkty wprowadzane do obrotu w ciągu okresu przydatności do spożycia

⁽⁴⁾ Regularne badanie zgodności z tym kryterium **nie jest wymagane** w normalnych warunkach dla następujących rodzajów żywności gotowej do spożycia:

- żywność poddana obróbce cieplnej lub innej obróbce skutecznie eliminującej *L. monocytogenes*, o ile po takiej obróbce nie jest możliwe wtórne zanieczyszczenie (na przykład produkty poddane obróbce cieplnej w końcowym opakowaniu),
- świeże, niekrojone i nieprzetworzone warzywa i owoce, z wyłączeniem kielzków,
- pieczywo, herbatniki i podobne produkty,
- woda, napoje bezalkoholowe, piwo, jabłecznik, wino, napoje spirytusowe i podobne produkty, w butelkach lub innych opakowaniach,
- cukier, miód i wyroby cukiernicze, w tym wyroby kakaowe i czekoladowe,
- żywe małże

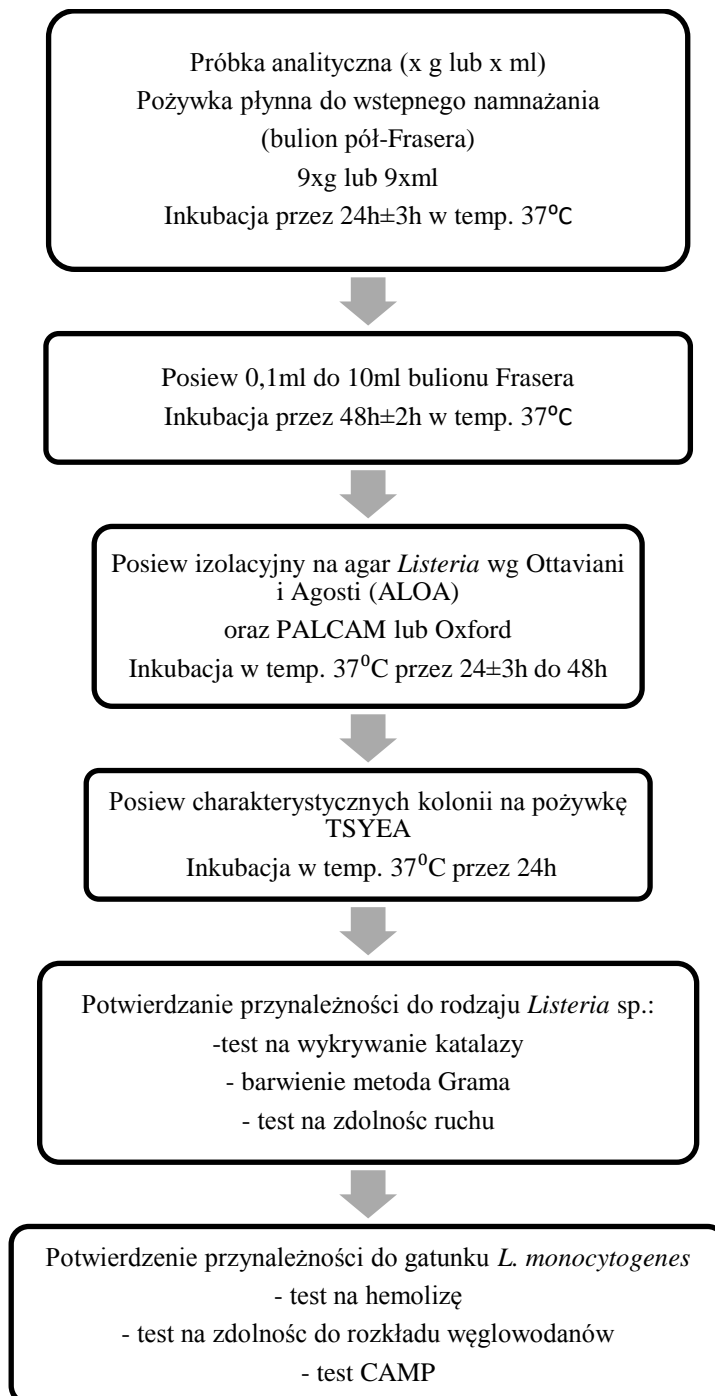
⁽⁸⁾ Produkty o $\text{pH} \leq 4,4$ lub $\text{aw} \leq 0,92$, produkty o $\text{pH} \leq 5,0$ i $\text{aw} \leq 0,94$, produkty o okresie przydatności do spożycia krótszym niż 5 dni będą automatycznie uznawane za należące do tej kategorii. Inne kategorie produktów mogą również należeć do tej kategorii pod warunkiem naukowego uzasadnienia

n = liczba próbek;

c = liczba próbek dających wartości między m a M

Oznaczanie obecności *Listeria monocytogenes* w próbkach żywności obejmuje kilka etapów:

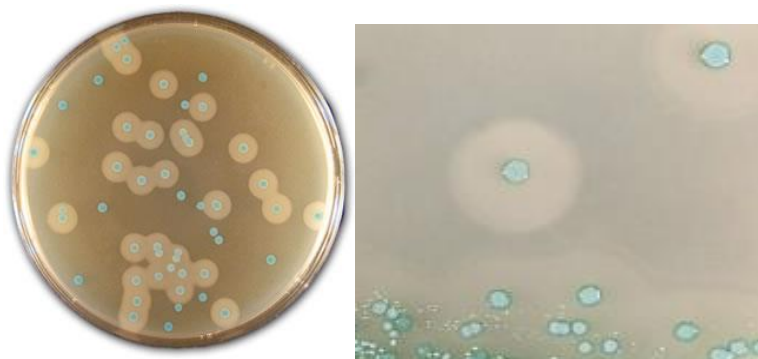
- I. Wstępne namnażanie na płynnej pożywce „pół-selektywnej”
- II. Namnażanie wtórne na płynnej pożywce selektywnej
- III. Różnicowanie na podłożach agarowych
- IV. Identyfikacja w oparciu o testy biochemiczne



Rys. 1 Schemat oznaczania obecności *Listeria monocytogenes* w żywności wg ISO 11290.

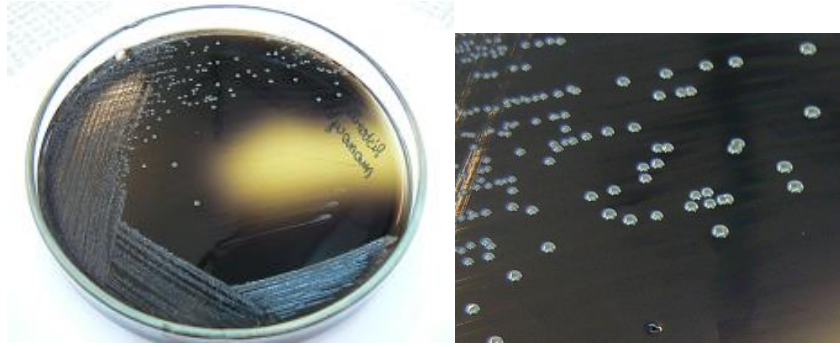
W pierwszym etapie, w celu regeneracji komórek potencjalnie uszkodzonych prowadzi się hodowlę na podłożu bulionowym pół-Frasera z dodatkiem ½ dawki suplementu selektywnego w temperaturze 37°C przez 24±3godz. Z hodowli pobiera się 0,1cm³ i posiewa do 10cm³ bulionu Frasera. **Bulion pół-Frasera i Frasera** to podłoża, które oprócz składników odżywczych (peptony, ekstrakty) zawierają eskulinę i chlorek litu. Do podłoża po sterylizacji wprowadzany jest roztwór cytrynianu amonowo-żelazowego i dodatek selektywny w postaci roztworu antybiotyków: akryflawiny i kwasu nalidyksowego (w bulionie pół-Frasera jest go połowę mniej). Antybiotyki i chlorek litu silnie hamują wzrost bakterii Gram-ujemnych i większość Gram-dodatnich. Dodatkowo chlorek litu jest czynnikiem wybiórczym, ze względu na tolerancję wyższych stężeń tej soli przez *Listeria monocytogenes*. Szczepy *Listeria monocytogenes* hydrolizują eskulinę do eskuletiny i glukozy. Eskuletina tworzy czarny kompleks z żelazem (III) pochodzącym z cytrynianu. Hodowla na tym podłożu po namnożeniu pałeczek *Listeria* sp. przybiera czarnoszarą lub czarną barwę.

Po inkubacji w temperaturze 37°C przez 48±2godz. namnożoną hodowlę posiewa się izolacyjnie na pożywki selektywne. Pierwszą z nich jest pożywka wg Ottaviani i Agosti (ALOA). Druga pozostaje do wyboru przez laboratorium i może to być Oxford lub PALCAM agar. **Pożywka ALOA** zawiera składniki wybiórcze (kwas nalidyksowy, polimyskynę B, cykloheksymidynę), który jest rozkładany przez enzymy pałeczek *Listeria* sp., a także substrat chromogenny. Wyrosłe kolonie mają barwę zielononiebieską i otoczone są mętną strefą podłoża (rozkład fosfatydyloinozytolu przez fosfolipazę C). Jeżeli po 24±3h inkubacji wzrost bakterii jest słaby lub nie obserwuje się obecności typowych kolonii lub nie obserwuje się żadnych kolonii płytki należy inkubować kolejne 24±3h.



Rys. Kolonie *Listeria monocytogenes* na podłożu ALOA.

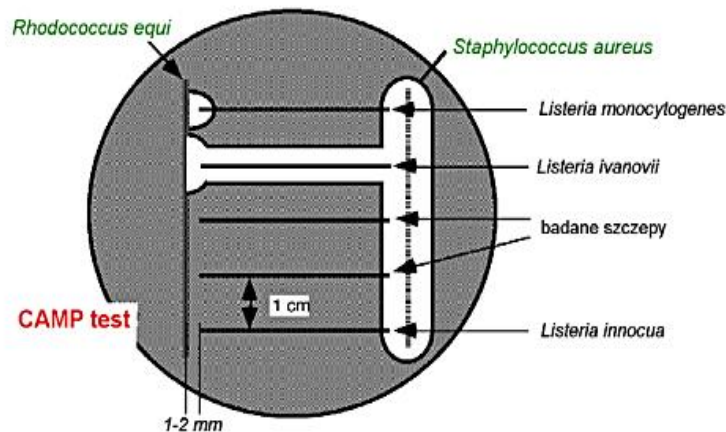
Pożywka Oxford-agar to pożywka selektywno-różnicująca zawierająca w swoim składzie mieszaninę antybiotyków, skrobię, eskulinę, chlorek litu i cytrynian amonowo-żelazowy(III). Kolonie pałeczek *Listeria* sp. mają na tym podłożu barwę ciemnoszarą z zielonkawym odcieniem i są otoczone strefą czarnego podłoża. Zabarwienie to jest wynikiem rozkładu eskuliny i wytrącenia powstałego w reakcji z żelazem kompleksu o barwie czarnej.



Rys. Kolonie *Listeria monocytogenes* na podłożu Oxford.

Pożywka PALCAM-agar- pożywka wybiórczo-roznicująca. Zawiera w swoim składzie mannitol, czerwień fenolową, glukozę, eskulinę, chlorek litu, cytrynian amonowo-żelazowy(III), a także zestaw antybiotyków: siarczan polimyksyny, ceftacydynę i akryflawinę. Podłoże po wylaniu na płytki ma barwę czerwoną i jest klarowne. Pałeczki *Listeria* sp. wyrastają na tym podłożu w postaci małych lub bardzo małych szarych kolonii z zielonym odcieniem, czasami z czarnym środkiem i zawsze otoczone są strefą czarnego podłoża. Po 48 godz. zielone kolonie, średnicy od 1.5 mm do 2 mm z charakterystycznym wgłębieniem w środku

Po 48godz. inkubacji w 37°C dokonuje się wstępnej identyfikacji na podstawie wyglądu kolonii wyrosłych na podłożach selektywnych. Z każdej płytki wybiera się 5 charakterystycznych kolonii i przesiewa izolacyjnie na podłoże agarowe z soją i ekstraktem drożdżowym (TSYEA) celem wykonania testów biochemicznych. Zastosowanie podłoża TSYEA eliminuje ewentualne interakcje między składnikami podłoży selektywnych a reagentami testów biochemicznych. Wykonuje się również test CAMP celem określenia zdolności do hemolizy. Wykonuje się posiew paskowy na podłoże agar z krwią.



Rys. Ilustracja testu CAMP, widoczna strefa hemolizyny.

Potwierdzenie przynależności do rodzaju *Listeria* sp.:

- **test na wykrywanie katalazy** - na szkiełko podstawowe należy nanieść kroplę 3% roztworu H_2O_2 i zawiesić w niej pobraną kolonię, pęcherzyki gazu wskazują na obecność katalazy. *Listeria monocytogenes* ma zdolność do wytwarzania katalazy. Kontrola dodatnia - *Staphylococcus aureus*. Kontrola ujemna – *Enterococcus faecalis*. katalaza jest enzymem, który rozkłada toksyczny dla komórki H_2O_2 do H_2O i tlenu.
- **barwienie metodą Grama** - w obrazie mikroskopowym powinny być widoczne cienkie Gram-dodatnie pałeczki.
- **test na zdolność ruchu** - posiew kluty, za pomocą igły inokulacyjnej do agaru półpłynnego materiałem pobranym z pożywki TSYEA. Posiewy inkubować w cieplarni w temperaturze 25°C przez 48 godz.

Potwierdzenie przynależności do gatunku *L. monocytogenes*:

- **test na hemolizę** - badany szczep posiewa się na pożywkę z krwią owczą w celu określenia właściwości hemolitycznych. Równocześnie wykonuje się posiew kluty w jednym miejscu, posiewa się w ten sposób także szczepy testowe *L. monocytogenes* (kontrola dodatnia) i *L. innocua* (kontrola ujemna). Po inkubacji w temperaturze 37 °C przez 24 h ± 2 h wykonuje się badanie posiewów szczepów badanych i kontrolnych:
 - *L. monocytogenes* wytwarza wokół kolonii wąską, przezroczystą strefę przejaśnienia (β -hemolizy)
 - *L. innocua* nie wytwarza strefy przejaśnienia wokół linii wklucia
 - *L. seeligeri* wytwarza mało wyraźną strefę hemolizy
 - *L. ivanovii* zwykle wytwarza szeroką strefę wyraźnie odgraniczonej β -hemolizy.
- **test na zdolność do rozkładu węglowodanów** - wytwarzanie kwasów z cukrów - posiew do pożywek z ramnozą, ksylozą i purpurą bromokrezolową. Wynik dodatni to zmiana barwy wskaźnika z purpurowej na żółtą, świadczący o zdolności do rozkładu danego cukru. *Listeria monocytogenes* nie fermentuje ksylozy, fermentuje ramnozę.
- **test CAMP** - polegający na posiewie testowych szczepów: *Staphylococcus aureus* i *Rhodooccus equi* oraz szczepu badanego na podłożu agarowe z krwią. Szczep badany posiewa się na powierzchni podłoża w postaci wąskiej linii prostopadle do szczepów testowych. Jeżeli po inkubacji wystąpiło wzmocnienie strefy hemolizy w miejscu linii posiewu *Staphylococcus aureus*, a nie odnotowano takiej reakcji w pobliżu szczepu *Rhodooccus equi* świadczy to o obecności *Listeria monocytogenes*.

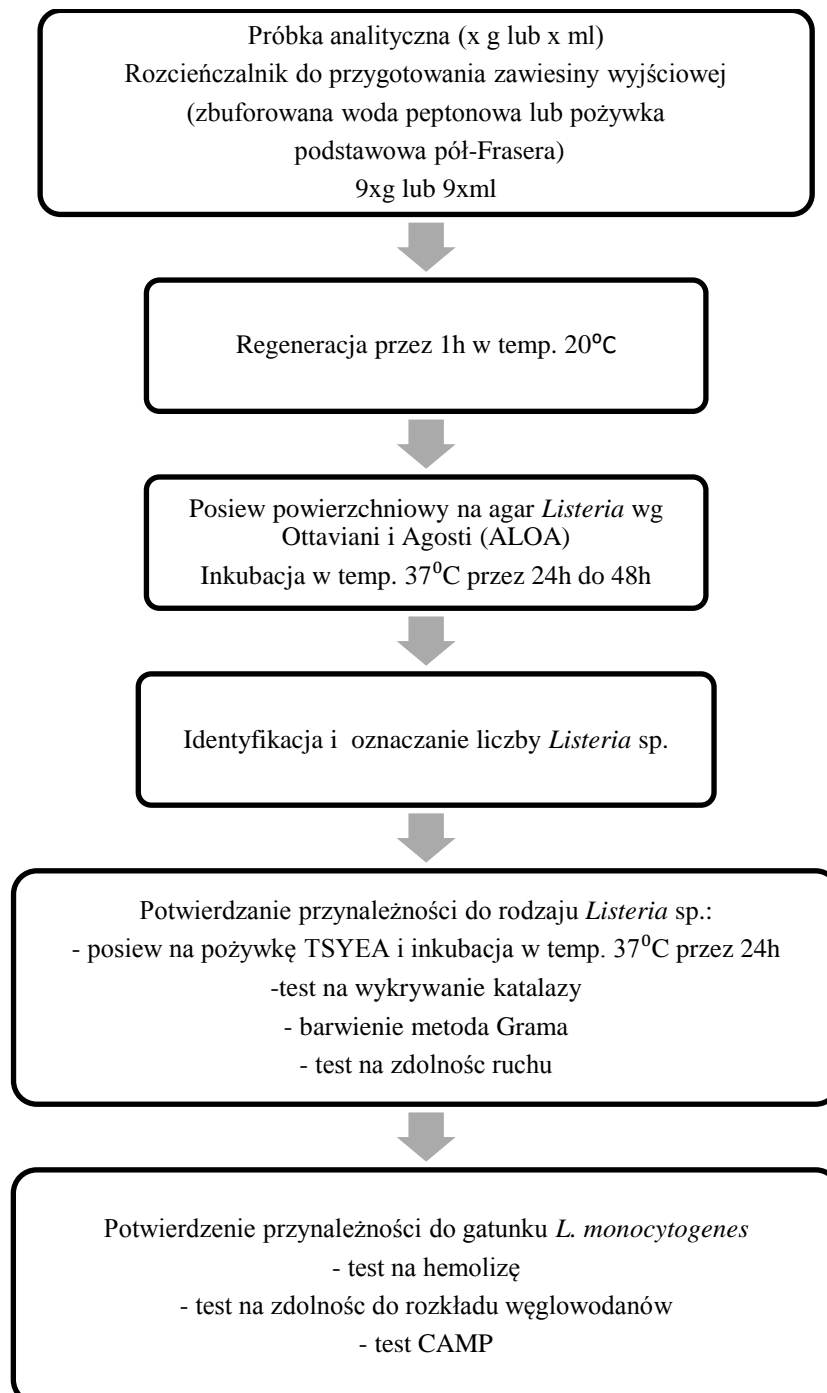
Cechy identyfikacyjne *Listeria* sp.

Gatunek	Hemoliza	Wytwarzanie kwasu		Test CAMP	
		ramnoza	ksyloza	<i>R. equi</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	v	-	-	-
<i>L. ivanovii</i> ,	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	v	+	-	-
<i>L. grayi</i> .	-	-	-	-	-

V – reakcja zmienna; (+) – reakcja słabo wyrażona

a. Oznaczanie liczby *Listeria monocytogenes* w żywności

Należy wykonać posiew powierzchniowy po 0,1 cm³ badanego materiału lub jego rozcieńczenia na podłoże ALOA. Po inkubacji w temp. 37°C przez 24h±3godz. liczy się charakterystyczne, zielononiebieskie kolonie otoczone nieprzezroczystą strefą.



Rys. 1 Schemat oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* w żywności wg ISO 11290.

3. Alternatywne metody oznaczania *Listeria monocytogenes* w żywności

Klasyczne metody oznaczania pałeczek *L. monocytogenes* w żywności są czasochłonne. Całkowity czas analizy może wynosić nawet 8 dni. Często jest to nie do przyjęcia ze względu na krótką trwałość niektórych produktów z grupy szczególnie narażonej na kontaminację *L. monocytogenes* (np. surowe mięso, ryby czy mleko). Dlatego możliwe jest stosowanie metod zmodyfikowanych lub alternatywnych pod warunkiem ich zwalidowania w stosunku do metod referencyjnych. Modyfikacje klasycznych metod hodowlanych mogą dotyczyć każdego ich etapu łącznie z techniką posiewu. Metody alternatywne są natomiast stosowane głównie do potwierdzania obecności *L. monocytogenes* i ich identyfikacji. W tym celu najczęściej są wykorzystywane testy immunologiczne, molekularne oraz fagotypowanie.

Nowoczesnym metodom stosowanym w analizie żywności stawia się wiele wymagań, np.: □ uzyskanie szybkiego wyniku, wysoką czułość, możliwość wykrycia niewielkiej ilości mikroorganizmów lub ich toksyn, niskie koszty, możliwość dokonania obiektywnego odczytu wyniku za pomocą odpowiedniej aparatury, łatwość procedury, możliwość zautomatyzowania badań, minimalizacja liczby wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych.

Pożywki chromogenne

Zalecaną pożywką selektywno-różnicującą stosowaną podczas wykrywania i określania liczby *L. monocytogenes* jest pożywka agarowa Listeria wg Ottaviani Agosti (ALOA) – opisana powyżej. Wykrywanie patogennych szczepów *L. monocytogenes* jest oparte w tej metodzie na detekcji fosfolipazy C zależnej od fosfatydyloinozytolu. Ottaviani zmodyfikował pożywkę stosując dodatkowo składnik chromogenny 5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-glukopiranozyd. Alternatywną metodę opatentowali w 1998 r. Facon i Simon. Zastosowali oni do detekcji aktywności fosfolipazy C zależnej od fosfatydyloinozytolu składnik chromogenny 5-bromo-4-chloro-3-indolilo-myo-inozytol-1-fosforan. Ta zasada metody została wykorzystana m.in. w pożywce RAPID'L.mono. Zawiera ona, oprócz X-IP, ksylozę i czerwień fenolową jako indykator pH. Dzięki temu jest możliwe zróżnicowanie *L. monocytogenes* i *L. ivanovii*. Bakterie *L. ivanovii* fermentują ksylozę, co powoduje zakwaszenie pożywki wokół kolonii i zmianę barwy na żółtą.

Metody immunoenzymatyczne

Spośród różnych metod immunologicznych służących do wykrywania patogenów w żywności najczęściej stosowane są modyfikacje testów immunoenzymatycznych ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) typu kanapkowego. Jedną z metod alternatywnych stosowanych do wykrywania bakterii *L. monocytogenes* jest test immunoenzymatyczny Transia Plate Listeria monocytogenes, który przeprowadza się po etapie namnożenia. Test ten zawiera przeciwciała specyficzne dla białka P60 *L. monocytogenes* znakowane peroksydazą chrzanową. W przypadku uzyskania wyników wątpliwych, wymagane jest przeprowadzenie badań potwierdzających. Dużą zaletą testu jest znaczne skrócenie czasu analizy, gdyż wynik uzyskuje się 1,5 h po namnożeniu badanych bakterii. W pełni zautomatyzowaną metodą, wykorzystującą technikę enzymoimmunofluorescencyjną (Enzyme Linked Fluorescent Assay) jest system VIDAS. Badanie jest przeprowadzane automatycznie przez

immunoanalyzer VIDAS z wykorzystaniem pipetki SPR (Solid Phase Receptacle) i pasków testowych. Wewnętrzna powierzchnia pipetki SPR jest pokryta monoklonalnymi przeciwciałami anty *L. monocytogenes*, natomiast paski testowe zawierają odpowiednie odczynniki, koniugat (monoklonalne przeciwciała znakowane alkaliczną fosfatazą) i substrat fosforan 4-metyloumbeliferylu. Enzym koniugatu katalizuje hydrolizę substratu do fluorescencyjnego produktu 4-metylo-umbelliferonu, którego fluorescencja jest mierzona automatycznie przy długości fali 450 nm. Do wykrywania *L. monocytogenes* we wszystkich produktach spożywczych i próbkach środowiskowych mogą być stosowane testy Vidas *Listeria monocytogenes* 2 (VIDAS LMO2), Vidas *Listeria* DUO (VIDAS LDUO) i Vidas *Listeria monocytogenes* Xpress (VIDAS LMX). W opracowanych metodach zastosowano różne pożywki namnażające (bulion Frasera, bulion LX) i różny czas inkubacji. Etap namnażania bakterii w metodzie VIDAS LMO2 i VIDAS LDUO jest dwustopniowy (48 h), natomiast w metodzie VIDAS LMX dzięki optymalizacji pożywki LX przez dodatek selektywnych czynników został skrócony do 26 h. Po namnożeniu bakterii czas oznaczenia za pomocą analizatora VIDAS wynosi od 70 do 127 min w zależności od stosowanego testu. Metoda zastosowana w teście VIDAS LDUO umożliwia w jednym badaniu jednoczesne wykrycie i różnicowanie *L. monocytogenes* i *Listeria* ssp. ze względu na użycie kombinacji przeciwciał i fragmentów przeciwciał dla antygenów tych bakterii.

Metody wykorzystujące technikę PCR

Wykrywanie drobnoustrojów chorobotwórczych w badanej próbce żywności metodą PCR odbywa się w trzech etapach:

- namnażanie bakterii w odpowiednich pożywkach w celu zwiększenia liczby komórek i eliminacji wyników fałszywie dodatnich, wynikających z obecności komórek martwych,
- liza komórek w celu wyodrębnienia DNA pełniącego funkcję matrycy w reakcji amplifikacji,
- reakcja PCR w urządzeniu zwanym termocyklerem i wykrywanie obecność specyficznego produktu reakcji, świadczącego o obecności analizowanych drobnoustrojów w badanej próbce.

Produkty PCR można wykrywać metodą tradycyjną stosując elektroforezę w żelu agarozowym lub nowoczesną dzięki technologii Real-Time PCR. Do wykrywania obecności *L. monocytogenes* w próbkach żywności za pomocą techniki PCR najczęściej wykorzystuje się gen specyficzny *hly* listeriolizyny O, a także geny internalin *inlA*, *inlB* oraz gen *iap* białka P60 związanego z procesem inwazji (invasion associated protein).

BAX System *Listeria monocytogenes* 24E jest automatycznym systemem do wykrywania patogenów w próbkach żywności i próbkach środowiskowych. Protokół oznaczenia składa się z trzech etapów: przygotowania DNA, amplifikacji specyficznego fragmentu DNA i detekcji fragmentu DNA. Zestaw zawiera również fragment DNA „kontroli wewnętrznej” pozwalający na wyeliminowanie fałszywie ujemnych wyników wynikających z obecności potencjalnych inhibitorów reakcji PCR. Zaletą systemu jest zastosowanie wszystkich składników reakcji PCR (polimerazy DNA, mieszaniny trinukleotydów dNTP, starterów, matrycy kontroli wewnętrznej i barwnika fluorescencyjnego) w formie tabletki umieszczonej w probówce PCR, którą rozpuszcza się w lizacie otrzymanym z próbki

żywności. Po procesie amplifikacji system mierzy zmiany fluorescencji próbki w funkcji temperatury wyznaczając tzw. krzywe topnienia DNA, charakteryzujące amplifikowany fragment. Na podstawie interpretacji uzyskanych krzywych podawane są wyniki testu.

Metody hybrydyzacji kwasów nukleinowych

Technologia hybrydyzacji RNA/DNA i DNA/DNA wykorzystuje zazwyczaj oligonukleotydowe sondy genetyczne specyficznie hybrydujące z unikalnym dla danego gatunku bakterii regionem 16S rRNA. W jednej komórce bakterii może się znajdować 10 000 kopii rybosomalnego RNA i dlatego technologia ta nie wymaga etapu amplifikacji RNA/DNA, aby wykryć poszukiwane bakterie. Metoda polega na wyodrębnieniu rybosomalnego RNA bakterii metodą lizy komórek. Otrzymany lizat jest wykorzystywany do hybrydyzacji typu RNA/DNA z oligonukleotydową sondą znakowaną barwnikiem fluorescencyjnym lub enzymem. Wykrywanie specyficznych produktów hybrydyzacji odbywa się przez pomiar zmiany barwy lub luminescencji. Do odczytu wyniku stosuje się luminometrię lub czytniki mikropłytek. Przed wykonaniem testu metodą hybrydyzacji należy przeprowadzić etap namnażania bakterii w pożywkach opisanych w protokole walidacji. Testy oparte na metodach hybrydyzacji charakteryzują się krótkim czasem wykonania, wysoką czułością dzięki wykorzystaniu wysoce specyficznego fragmentu rRNA jako sekwencji docelowej. Do metod tych zaliczana jest też fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* FISH opisana w przewodniku do ćwiczenia 3.

Część praktyczna

1. Omówienie poszczególnych etapów oznaczania obecności i liczby *Listeria monocytogenes* w żywności
2. Posiewy potwierdzające przynależność do rodzaju *Listeria* sp.:
 - test na wykrywanie katalazy
 - posiew kłuty na zdolność ruchu
3. Posiewy potwierdzające przynależność do gatunku *L. monocytogenes*:
 - test na zdolność do rozkładu węglowodanów
4. Posiewy sprawdzające zdolności manualne w laboratorium mikrobiologicznym (na zaliczenie)
 - posiew izolacyjny przygotowanej mieszaniny
 - posiew na skos agarowy