

Latvijas Lauksaimniecības universitāte
Latvia University of Agriculture

Veterinārmēdicīnas fakultāte
Faculty of Veterinary Medicine



Inga Eizenberga

**PSIHRROTROFO PATOGĒNU UN HIGIĒNAS
INDIKATORMIKROORGANISMU IZPLATĪBA ZIVĪS
EITROFOS EZEROS UN MAZUMTIRDZNIECĪBĀ
LATVIJĀ**

***PREVALENCE OF PSYCHROTROPHIC PATHOGENS AND
HYGIENE INDICATORS IN FISH IN EUTROPHIC LAKES
AND RETAIL IN LATVIA***

Promocijas darba KOPSAVILKUMS

Dr. med. vet. zinātniskā grāda iegūšanai

SUMMARY

Of the Doctoral Thesis for the scientific degree of Dr. med. vet.

Jelgava
2018



Promocijas darbs izstrādāts:

- Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā “BIOR”;
- Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Pārtikas un vides higiēnas institūtā.

Research has been carried out at:

- Institute of Food Safety, Animal Health and Environment “BIOR”;
- Latvia University of Agriculture, Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Food and Environmental Hygiene.

Promocijas darba zinātniskais vadītājs/ Scientific supervisor

Dr. med. vet. Ph.D., profesors Aivars Bērziņš

Promocijas darba zinātniskā konsultante/ Scientific advisor

Dr. med. vet., asociētā profesore Margarita Terentjeva

Oficiālie recenzenti/ Official reviewers

Dr. sc. ing., profesore Inga Ciproviča, Latvijas Lauksaimniecības universitāte

Dr. biol., asociētā profesore Vizma Nikolajeva, Latvijas Universitāte

Dr. med. vet., profesors Ilmārs Dūrītis, Latvijas Lauksaimniecības universitāte

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2018. gada 21. maijā plkst. 11.00 LLU Veterinārmedicīnas fakultātē, Jelgavā, K. Helmaņa ielā 8, A 300. auditorijā

The defence of thesis will take place at the LUA Faculty of Veterinary Medicine, A 300 auditorium, on the May 21, 2018 at 11.00 o'clock

Ar promocijas darbu var iepazīties Latvijas Lauksaimniecības universitātes Fundamentālajā bibliotēkā, Jelgavā, Lielā ielā 2 un <http://llub.llu.lv/llu-theses.htm>

The thesis is available at the Fundamental Library of the Latvia University of Agriculture, Lielā iela 2, Jelgava and <http://llub.llu.lv/llu-theses.htm>

Promocijas darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda projekta Nr. 2013/0016/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/055 „Iekšējo ūdeņu zivju resursu ķīmiskā un bioloģiskā piesārņojuma pētniecības grupas izveide” atbalstu.



IEGULDĪJUMS TĀVĀ NĀKOTNĒ

DOI: 10.22616/lluthesis/2018.005

SATURA RĀDĪTĀJS

IEVADS	4
Darba aktualitāte	5
Promocijas darba uzdevumi	6
Darba zinātniskā novitāte	6
Pētījumu rezultātu aprobācija	6
MATERIĀLS UN METODES	9
Žaunu, ādas, zarnu un kopparauga noņemšana no zivīm	10
Vispārējā mikrobioloģiskā piesārņojuma noteikšana	11
Pārtikas infekciju ierosinātāju noteikšana	12
<i>L. monocytogenes</i> serogrupu noteikšana ar multiplex polimerāzes ķēdes reakciju.....	14
Datu statistiskā apstrāde	14
PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA	15
Higiēnas indikatormikroorganismu daudzums ezeru zivīs	15
Higiēnas indikatormikroorganismu daudzums zivīs Ķīšezerā, Usmas ezerā un Sīvera ezerā	19
Higiēnas indikatormikroorganismi zivīs mazumtirdzniecībā	24
Pārtikas infekciju ierosinātāju <i>Salmonella</i> spp., <i>Listeria</i> spp. un <i>Yersinia</i> spp. sastopamība zivīs mazumtirdzniecībā	27
SECINĀJUMI	34
PRIEKŠLIKUMI	35

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	36
Topicality of the study.....	36
Objectives of the study	36
Scientific novelty of the study	37
Approbation of the results of research.....	37
MATERIAL AND METHODS	39
Collection of fish samples	39
The preparation of the samples of fish gills, skin, gut and pooled samples	40
Detection of hygiene indicators of fish	41
Detection of <i>Salmonella</i> spp., <i>Listeria</i> spp. and <i>Yersinia</i> spp.	42
Detection of <i>L. monocytogenes</i> serogroups by multiplex PCR	43
RESULTS AND DISCUSSION.....	44
Hygiene indicators of fish from lakes.....	44
Hygiene indicators of fish from Lake Kīšezers, Lake Usmas and Lake Sīvers	46
Hygiene indicators of fish at retail	50
Prevalence of foodborne pathogens <i>Salmonella</i> spp., <i>Listeria</i> spp. and <i>Yersinia</i> spp. in fish	52
CONCLUSIONS	54
RECOMMENDATIONS FOR PRACTICE.....	55

IEVADS

Darba aktualitāte

Psihrotrofiem mikroorganismiem piemīt spēja augt 0 °C temperatūrā, un tie ir izplatīti apkārtējā vidē, kā arī var būt sastopami pārtikā. Psihrotrofās patogēnās baktērijas *Listeria monocytogenes* un *Yersinia enterocolitica* nokļuvušas pārtikas produktos spēj savairoties ledusskapja temperatūras apstāklos, kas var radīt apdraudējumu patērētāju veselībai, izraisot tādas pārtikas infekcijas kā listeriozi un jersiniozi. *Salmonella* ģints patogēno baktēriju klātbūtne pārtikā var izraisīt salmonelozi cilvēkiem. Salmoneloze ir otra biežāk konstatētā pārtikas infekcija aiz kampilobakteriozes cilvēkiem Eiropas Savienībā 2015. gadā. Nākamā biežāk sastopamā pārtikas infekcija ir jersinioze, bet listerioze ir piektā biežākā (EFSA, 2016).

Epidemioloģiskos pētījumos tika konstatēts, ka dažādu bakteriālu pārtikas infekciju pārnesēji galvenokārt ir dzīvnieku izcelsmes produkti, tostarp zivis un zivju produkti (EFSA, 2016; EFSA, 2013).

Zivis tiek uzskatītas par veselīgu pārtikas produktu, jo tās cilvēka uzturu nodrošina ar polinepiesātinātajām taukskābēm, augstas kvalitātes proteīnu, vitamīniem un minerālvielām. Apvienoto Nāciju Pārtikas un lauksaimniecības organizācija (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations) ir prognozējusi zivju patēriņa pieaugumu uz vienu Eiropas Savienības valstu iedzīvotāju laikā no 2015. līdz 2030. gadam (Failler, 2007).

Cilvēku veselību un labklājību neapdraudošas pārtikas nodrošināšana pastāvīgi pieaugošam patērētāju skaitam ir aktuāla problēma gan Eiropas Savienībā, gan pasaulē. Mikroorganismi ir plaši sastopami apkārtējā vidē, tostarp pārtikas produktos. Dzīvnieku un augu izcelsmes produkti var radīt pārtikas produktu nekaitīguma apdraudējumu mikrobioloģiskā piesārnojum dēļ. Tādēļ ir svarīgi novērtēt mikroorganismu izplatību izejvielās un produktos, kas tiek lietoti cilvēku uzturā. Mikrobioloģiskie rādītāji var kalpot kā papildu instruments pārtikas drošuma un kvalitātes novērtēšanā. Svaigu zivju patēriņš pēdējos gados ir būtiski palielinājies gan Latvijā, gan pasaulē. Viens no ceļiem, kā svāigas zivis nokļūst pie patērētājiem, ir mazumtirdzniecības uzņēmumi. Lai novērtētu pārtikas produktu mikrobioloģisko drošumu un kvalitāti, ir svarīgi noteikt mikroorganismu klātbūtni, īpaši patogēno baktēriju sastopamību svāigās zivīs, kas tālāk tiek izmantotas cilvēku uzturā.

Mūsu darba **mērķis** bija izanalizēt higiēnas indikatoru mikroorganismu un psihirofrofā patogēnu izplatību zivīs eitrofos ezeros dažādos Latvijas reģionos un svāigās zivīs mazumtirdzniecībā.

Promocijas darba uzdevumi

1. Izpētīt higiēnas indikatormikroorganismu daudzumu ūjās, ūz ūadas un ūarnās zivīs Ķīšezerā, Usmas ezerā un Sīvera ezerā.
2. Izanalizēt higiēnas indikatormikroorganismu daudzumu zivīs mazumtirdzniecībā.
3. Izanalizēt pārtikas infekciju ierosinātāju *Salmonella* spp., *Listeria* spp. un *Yersinia* spp. sastopamību zivīs mazumtirdzniecībā.
4. Izpētīt *Listeria monocytogenes* serogrūpu un *Yersinia enterocolitica* biotipu izplatību zivīs Latvijā.

Darba zinātniskā novitāte

1. Pirmo reizi Latvijā veikta visaptveroša higiēnas indikatormikroorganismu un pārtikas infekciju ierosinātāju noteikšana svaigās zivīs ezeros un mazumtirdzniecībā.
2. Noteiktas zivīs sastopamo pārtikas infekciju ierosinātāju *Listeria monocytogenes* serogrupas un *Yersinia enterocolitica* biotipi.
3. Pētījums papildina pārtikas mikrobioloģiskā drošuma pētījumu bāzi Latvijā.

Pētījumu rezultātu aprobācija

Pētījuma rezultāti publicēti sešās publikācijās starptautiskos zinātniskos izdevumos, t.sk. četras publikācijas indeksētas ISI Web of Science datubāzē.

1. Novoslavskij A., Terentjeva M., Eizenberga I., Valciņa O., Bartkevičs V., Bērziņš A. (2016) Major foodborne pathogens in fish and fish products: a review. *Annals of Microbiology*, Vol. 66, No. 1, p. 1-15
2. Terentjeva M., Eizenberga I., Novoslavskij A., Strazdiņa V., Valciņa O., Ošmjana J., Bērziņš A. (2015) Prevalence of foodborne pathogens in freshwater fish in Latvia. *Journal of Food Protection*, Vol. 78, No. 11, p. 2093-2098
3. Terentjeva M., Eizenberga I., Novoslavskij A., Strazdiņa V., Valciņa O., Ošmjana J., Bērziņš A. (2015) Bacterial microflora of freshwater fish originated from Usmas lake in Latvia. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, Vol. 4, No. 1, p. 74-77

4. Eizenberga I., Terentjeva M., Valciņa O., Novoslavskij A., Strazdiņa V., Ošmjana J., Bērziņš A. (2015) Evaluation of microbiological quality of freshwater fish in Usma lake. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*, Vol. 15, No. 1, p. 65-73
5. Eizenberga I., Terentjeva M., Valciņa O., Novoslavskij A., Strazdiņa V., Ošmjana J., Bērziņš A. (2015) Microbiological quality of raw fish at retail market in Latvia. In: *25th Congress of the Nordic Association of Agricultural Scientists „Nordic View to Susatainable Rural Development”*: proceedings, Riga, Latvia, p. 324-328
6. Strazdina V., Terentjeva M., Valcina O., Eizenberga I., Novoslavskij A., Osmjana J., Berzins A. (2015) The Microflora of Gills, Gut and Skin of European Eels (*Anguilla anguilla*) in Lakes of Latvia. *Journal of Food Science and Engineering*, Vol. 5, p. 130-136

Pētījumu rezultāti aprobēti sekojošās starptautiskās zinātniskās konferencēs:

1. Eizenberga I., Terentjeva M., Valciņa O., Novoslavskij A., Strazdiņa V., Ošmjana J., Bērziņš A. A comparison of *Listeria* spp. prevalence between the raw freshwater fish from lake and retail market in Latvia. In: *6th Congress of European Microbiologists FEMS 2015*: proceedings, Maastricht, The Netherlands, 7-11 June, 2015
2. Terentjeva M., Eizenberga I., Valciņa O., Novoslavskij A., Strazdiņa V., Ošmjana J., Bērziņš A. 2015. Microbiological quality of freshly caught freshwater fish from lakes in Latvia. In: *6th Congress of European Microbiologists FEMS 2015*: proceedings, Maastricht, The Netherlands, 7-11 June, 2015
3. Eizenberga I., Terentjeva M., Valciņa O., Novoslavskij A., Strazdiņa V., Ošmjana J., Bērziņš A. Evaluation of microbiological quality of freshwater fish in Usma lake. In: *8th International Conference on Biodiversity Research*: Proceedings of the International Scientific Conference, Daugavpils, Latvia, 28-30th April, 2015
4. Novoslavskij A., Terentjeva M., Eizenberga I., Ošmjana J., Valciņa O., Bērziņš A. Bacterial microflora of European eel (*Anguilla Anguilla*) originated from Daugavpils lake in Latvia. In: *10th Baltic Conference on Food Science and Technology “FoodBalt 2015”*: Proceedings of the International Scientific Conference, Kaunas, Lithuania, 21-22 May, 2015
5. Terentjeva M., Eizenberga I., Valciņa O., Novoslavskij A., Ošmjana J., Bērziņš A.. Evaluation of bacterial microflora of European eel (*Anguilla*

anguilla) skin samples from lakes in Latvia. In: *Conference “Research and Practice in Veterinary Medicine 2014”*: Proceedings of the International Scientific Conference, Jelgava, Latvia, 27-28 November, 2014

6. Terentjeva M., Eizenberga I., Novoslavskij A., Strazdiņa V., Valciņa O., Ošmjana J., Bērziņš A. 2015. Bacterial microflora of freshwater fish originated from Usmas lake in Latvia. In: *10th International Scientific Conference „Biotechnology and Quality of Raw Materials and Foodstuffs“*, Stará Lesná, Slovakia, 28-30 January, 2015
7. Strazdiņa V., Terentjeva M., Valciņa O., Eizenberga I., Novoslavskij A., Ošmjana J., Bērziņš A. 2015. The microflora of gills, gut and skin of European eels (*Anguilla anguilla*) in lakes in Latvia. In: *6th International Conference Biosystems Engineering „BSE 2015“*, Tartu, Estonia, 7-8 May, 2015

Citi ar mikrobioloģiskā piesārņojuma noteikšanu vidē saistīti pētījumi prezentēti divās starptautiskās zinātniskās konferencēs:

1. Eizenberga I., Derman Y., Lindström M., Korkeala H., Bērziņš A. Prevalence of *Clostridium botulinum* in the Gulf of Riga. In: *9th Baltic Conference Food Science and Technology „Food for Consumer Well-Being FoodBalt 2014“*: Proceedings of the International Scientific Conference, Jelgava, Latvia, 8 – 9th May, 2014
2. Eizenberga I., Derman Y., Lindström M., Korkeala H., Bērziņš A. *Clostridium botulinum* detection in the sediments from the Gulf of Riga. In: *Laboratory diagnostics in Veterinary Medicine, Food and Environmental Safety*: Proceedings of the International Scientific Conference , Riga, Latvia, 5-6th September, 2013

Pētījums izstrādāts Eiropas Sociālā fonda projekta Nr. 2013/0016/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/055 „Iekšējo ūdeņu zivju resursu kīmiskā un bioloģiskā piesārņojuma pētniecības grupas izveide” ietvaros.

Darba apjoms: promocijas darbs noformēts 95 lappusēs, un tas sastāv no anotācijas, ievada, literatūras apskata, darba metodikas, pētījumu rezultātiem, diskusijas, secinājumiem, ieteikumiem praksei un izmantotās literatūras saraksta.

MATERIĀLS UN METODES

Pētījumā dažādu sugu svaigām zivīm tika veiktas mikrobioloģiskās analīzes no 2014. gada jūnijam līdz 2015. gada februārim. Zivju paraugi tika izmeklēti Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskā institūta „BIOR” Pārtikas un vides izmeklējumu laboratorijas Mikrobioloģijas un parazitoloģijas nodaļā un Dzīvnieku slimību diagnostikas laboratorijas Molekulārās bioloģijas nodaļā. Kopumā tika analizēti 194 zivju paraugi.

Zivju paraugu iegūšana

Zivju paraugi, kas izmantoti šajā pētījumā, tika svaigi iegūti no Latvijas ezeriem vai no dažādām mazumtirdzniecības vietām zivju pāviljonā Rīgas Centrāltirgū. Visi analizētie paraugi pārstāv zivju sugars, kas tiek lietotas cilvēku uzturā. Izbraukumi zivju paraugu iegūšanai tika organizēti attiecīgo zivju sugu ķeršanas sezonā. Zivis tika iegūtas vairākos izbraukumos ezeros un tirdzniecības vietās.

Zivju parauguņemšanai tika izvēlēti ezeri, kas pēc virsmas platības ir vieni no lielākajiem Latvijā, atrodas lauku teritorijā vai pilsētā, tiek izmantoti makšķerēšanai vai zvejai, un kuros bez citām zivju sugām ir sastopams arī zutis (*Anguilla anguilla*). Zivju paraugi tika ņemti no trīs ezeriem dažādos Latvijas reģionos – Kurzemē no Usmas ezera, Latgalē no Sīvera ezera un no Ķīšezerā Rīgā.

Laika periodā no 2014. gada jūnijam līdz oktobrim no Ķīšezerā, Usmas un Sīvera ezeriem kopumā nozvējotas 59 zivis, tajā skaitā 30 zuši (*Anguilla anguilla*), 21 asaris (*Perca fluviatilis*) un 8 pliči (*Blicca bjoerkna*).

No dažādām mazumtirdzniecības vietām zivju paviljonā Rīgas Centrāltirgū, kur visu gadu patēriņtājiem pieejamas dažādu veidu zivis, no 2014. gada oktobrim līdz decembrim kopumā tika iegūti 135 svaigu zivju paraugi. Iegūtie paraugi piederēja deviņām zivju sugām - rauda (*Rutilus rutilus* (n=28)), breksis (*Abramis brama* (n=26)), plīcis (*Blicca bjoerkna* (n=25)), vimba (*Vimba vimba* (n=24)), asaris (*Perca fluviatilis* (n=11)), karūsa (*Carassius carassius* (n=10)), rudulis (*Scardinius erythrophthalmus* (n=6)), līnis (*Tinca tinca* (n=3)) un karpa (*Cyprinus carpio* (n=2)). Ņemot vērā līnu un karpu nelielo daudzumu mūsu pētījumā, abas sugars tika apvienotas vienā grupā, kam tika dots nosaukums „citas zivju sugars” (n=5).

No 2014. gada oktobrim līdz 2015. gada februārim iegūtajiem *Listeria monocytogenes* izolātiem tika noteiktas serogrupas, bet *Yersinia enterocolitica* izolātiem bioķīmiskās reakcijas.

Pētījumā analizētie pliči un asari no ezeriem tika iegūti ar zvejas tikliem. Pēc nokēršanas zivis tika ievietotas sterilā plastikāta maisā, ievietotas aukstuma kamerā un nogādātas laboratorijā. Zuši no ezeriem tika kerti ar mурdiem. Tad zuši tika ievietoti ūdenī no attiecīgā ezera un plastikāta konteineros dzīvi nogādāti Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskā institūta „BIOR” Pārtikas un vides izmeklējumu laboratorijā tajā pašā dienā. Laboratorijā pirms audu paraugu noņemšanas zuši tika apdullināti un nogalināti, atdalot galvu. Katra no tirdzniecības vietām iegūtā zivs tika ievietota tīrā pārtikas produktu iesaiņošanai paredzētā plastikāta maisā. Pēc tam plastikāta maiss tika ievietots aukstumsomā, un paraugi nogādāti Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskā institūta „BIOR” Pārtikas un vides izmeklējumu laboratorijā vienas stundas laikā.

Žaunu, ādas, zarnu paraugu un kopparauga sagatavošana

Lai veiktu mikrobioloģiskos izmeklējumus, Institūta „BIOR” laboratorijā no katras zivs tika noņemti dažādu audu paraugi. No zivīm audu paraugi tikaņemti no tām ķermeņa vietām, kurās visbiežāk tiek konstatēts mikrobioloģiskais piesārņojums (Cahill, 1990). Zivīm no ezeriem tika noņemti dažādu audu paraugi – žaunas, āda un zarnas, kā arī no katras zivs tika sagatavots kopparaugs, kas sastāvēja no ādas, muskulatūras un zarnu audiem.

Asariem un pličiem no ezeriem žaunas ar žaunu lokiem tika aseptiski atdalītas, izmantojot sterilu pinceti un skalpeli vai grieznes. Izmeklējumiem tika noņemti ne mazāk kā 1 g žaunu paraugi. Zušiem žaunu paraugi tika noņemti ar 0.1% peptona ūdenī (Biolife Italiana S.r.l, Milāna, Itālija) samitrinātu vates tamponu, apstrādājot žaunu un žaunu loku virsmu.

Zivīm no ezeriem ādas paraugi tika noņemti ar 0.1% peptona ūdenī samitrinātu abrazīvo sūkli, apstrādājot 25 cm² lielu ādas laukumu

Asariem un pličiem no ezeriem zarnas tika iegūtas, atverot zivs vēdera dobumu ar skalpeli un aseptiski atdalot zarnas no apkārtējiem audiem, izmantojot sterilas grieznes un pinceti. Izmeklējumiem tika noņemti ne mazāk kā 1 g zarnu paraugi. Zušiem aseptiski tika atvērts vēdera dobums un zarnas lūmens, un ar 0.1% peptona ūdenī samitrinātu vates tamponu apstrādāta zarnu iekšējā virsma.

Zivju paraugiem no tirgus tika noņemti ādas paraugi. Ādas paraugi tika iegūti, apstrādājot 25 cm² lielu ādas laukumu ar 0.1% peptona ūdenī samitrinātu abrazīvo sūkli. Ar sterilu pinceti un grieznēm katram zivju paraugam no ezeriem un tirgus tika noņemts kopparaugs, kas sastāvēja no ādas, muskulatūras un zarnu audiem. Audi tika ievietoti sterilā Stomahera maisiņā. Katra noņemtā kopparauga svars sasniedza 25±1 g.

Paraugiem pēc noņemšanas un sagatavošanas tika veiktas mikrobioloģiskās analīzes atbilstoši Starptautiskās Standartizācijas organizācijas (ISO) standartiem. Izmeklējumi tika veikti Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskā institūta „BIOR” Pārtikas un vides izmeklējumu laboratorijā un dzīvnieku slimību diagnostikas laboratorijā. Katrā no žaunu, zarnu un ādas paraugiem tika noteikts baktēriju kopskaita, *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju, fekālo koliformu un psihrotrofo baktēriju skaits. Kopparaugs tika izmantots *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Yersinia* spp. un *Escherichia coli* noteikšanai zivīs mazumtirdzniecībā.

No katras sākotnējā žaunu, ādas un zarnu parauga tika pagatavota 10-kārtīga atšķaidījumu sērija (no 1:10 līdz 10^{-7}), un no katras atšķaidījuma viens mililitrs tika izmantots mikrobioloģiskām analīzēm.

Vispārējā mikrobioloģiskā piesārņojuma noteikšana

Zivju vispārējai mikrobioloģiskai novērtēšanai izmantojām vairākus mikrobioloģiskos rādītājus. No ezeriem iegūtajām zivīm analizējām baktēriju kopskaitu, *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaitu, fekālo koliformu skaitu un psihrotrofo baktēriju skaitu. Savukārt mazumtirdzniecībā iegūtajām zivīm noteicām baktēriju kopskaitu, *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaitu un *E. coli* prevalenci.

Baktēriju kopskaita noteikšanai izmantota ISO 4332 metode „Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija-Mikroorganismu skaitīšanas horizontālā metode. Koloniju skaitīšanas metode pie 30°C ” (Anonymous, 2004b). No katras izmeklējamā materiāla atšķaidījuma 1 ml tika pārnests Petri platē, pēc tam tika pievienota 12 līdz 15 ml agarizēta barotne aerobo baktēriju kopskaita noteikšanai (PCA, Biolife Italiana S.r.l, Milāna, Itālija). Pēc uzsēšanas Petri plates tika ievietotas termostatā $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ temperatūrā 72 ± 3 h. Pēc kultivēšanas tika saskaitītas mikroorganismu koloniju veidojošās vienības.

Enterobacteriaceae dzimtas baktēriju skaita noteikšanai izmantota ISO 21528-2 metode “Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija – *Enterobacteriaceae* skaita noteikšanas horizontālā metode. Koloniju skaitīšanas metode” (Anonymous, 2004a). No katras pagatavotā atšķaidījuma 1 ml tika pārnests uz Petri plates, pēc tam tika pievienota 15 ml violeta glikozes agara (*Violet Red Bile Glucose Agar*, VRBGA) barotne (Biolife). Sagatavotās plates tika ievietotas termostatā un inkubētas 37°C temperatūrā 24 h. Pēc inkubācijas tika skaitītas VRBGA platēs izaugušās raksturīgās *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju kolonijas.

Fekālo koliformu diagnosticēšanai izmantota ISO 4832 metode “Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija. Koliformu noteikšana un

skaitīšanas horizontālā metode. Koloniju skaitīšanas metode” (Anonymous, 1991). Atšķaidījumu uzsējumi tika veikti izmantojot violetsarkanā žults laktezes agara (*Violet Red Bile Agar*, VRBLA) barotni (Biolife) un plates inkubējot 24 h 44 ± 1 °C temperatūrā. Pēc inkubācijas tika veikta raksturīgo fekālo koliformu baktēriju koloniju identificēšana un skaitīšana.

Psihrotrofo mikroorganismu noteikšanai izmantota ISO 17410 metode “Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija. Horizontālā psihrotrofo mikroorganismu koloniju skaitīšanas metode” (Anonymous, 2001). Psihrotrofo baktēriju noteikšanai 1 ml no katru izmeklējamā materiāla atšķaidījuma tika pārnests uz agarizētas barotnes aerobo baktēriju kopskaita noteikšanai (PCA). Petri plates inkubētas 21 °C temperatūrā trīs līdz piecas dienas. PCA barotnēs pēc kultivēšanas tika noteikts psihrotrofo mikroorganismu daudzums, saskaitot mikroorganismu koloniju veidojošās vienības.

Escherichia coli noteikšanai izmantota ISO 7251 metode „Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija. Horizontālais paņēmiens varbūtējas *Escherichia coli* konstatēšanai un skaitīšanai. Varbūtīgākā skaita metode” (Anonymous, 2005). No katras sākotnējā parauga atšķaidījuma 1 ml tika pārnests mēģenē, un tam pievienota 10 ml laurila sulfāta buljona (*Lauryl Sulphate Broth*, Biolife) barotne. Inokulētās barotnes tika inkubētas termostataā 37 °C temperatūrā. Pēc 24 ± 2 h kultivēšanas barotnē tika pārbaudīta gāzu veidošanās. No barotnēm, kur tika novērota gāzu veidošanās, ar bakterioloģisko cilpiņu 0.01 ml materiāla tika pārnests mēģenē, kur atradās 10 ml *Escherichia coli* (EC) buljona barotne (Biolife). Barotnes tika kultivētas 44 °C temperatūrā 24 līdz 48 h, bet pēc tam pārbaudīta gāzu veidošanās reakcija. No barotnēm, kur gāzu veidošanās reakcija bija pozitīva, ar bakterioloģisko cilpiņu 0.01 ml materiāla tika pārnests triptona ūdens barotnē (*Triptone Water TW*, Biolife). Barotnes tika kultivētas 44 °C temperatūrā 48 ± 2 h. Lai apstiprinātu *E. coli* klātbūtni, tika veikts indola tests.

Pārtikas infekciju ierosinātāju noteikšana

Pētījumā iegūtajos zivju paraugos no ezeriem un tirgus noteicām trīs zootožu ierosinātāju *Salmonella*, *Listeria* un *Yersinia* ģinšu sastopamību. Konstatētās baktērijas identificējām līdz sugas līmenim. No zivīm izolētajiem *Listeria monocytogenes* celmiem analizējām piederību serogrupām, savukārt *Yersinia enterocolitica* izolātiem noteicām biotipus.

Salmonella spp. noteikšana veikta saskaņā ar ISO 6559 metodi “Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija. Horizontālā metode *Salmonella* spp. noteikšanai” (Anonymous, 2002). No katras zivs parauga tika iesvērts 25 g kopparaugs Stomahera maisiņā, tam pievienots 225 ml peptona bufersķīdums

(Biolife). Tad paraugs tika 60 s homogenizēts stomaherā. Pēc tam sekoja homogenizētā parauga inkubēšana 18 h 37 °C temperatūrā. No sākotnējās bagātināšanas barotnes 0.1 ml inkulāta tika pārnests 10 ml Rappaport-Vassiliadis buljonā (RV, Biolife) un 10 ml Millera Kaufmana tetraktionātnovobiocīna buljonā (*Muller-Kaufmann tetrathionate novobiocin*, MKTTn, Biolife). RV buljons tika inkubēts 41.5 °C temperatūrā 24 h, bet MKTTn buljons 37 °C 24 h. No abām barotnēm 0.1 ml inkulāta tika uzsēts uz divām selektīvām cietajām barotnēm: ksilozes-lizīna-dezoksiholāta (*Xylose-lysine-desoxycholate*, XLD, Biolife) agara un briljantzaļā agara (*Brilliant green*, BGA, Biolife). Pēc uzsēšanas barotnes tika ievietotas termostatā un inkubētas 37 °C temperatūrā 24 h. Pēc inkubācijas noteikta raksturīgo *Salmonella* spp. koloniju klātbūtne.

Yersinia spp. noteikšanai izmantota ISO 10273 metode "Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija - Iespējami patogēnās baktērijas *Yersinia enterocolitica* konstatēšanas horizontālā metode" (Anonymous, 2003). No katra parauga 25 g tika pārnests peptona 225 ml sorbitola žults sālu buljonā un inkubēts 24 h 22 °C temperatūrā. Pēc inkubēšanas 0.1 ml buljona tika uzsēts uz cefsulodīna-irgasāna-novobiocīna (*Cefaclor-irgasan-novobiocin*, CIN) agara (Biolife) ar un bez 0.5% kālija hidroksīda (KOH). CIN agara plates tika inkubētas 30 °C 24-48 h. *Yersinia* CIN agara barotnē veido kolonijas ar sarkanu centru un caurspīdīgu malu ap kolonijām. Aizdomīgās kolonijas tika apstiprinātas ar API 20E testu (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francija). *Y. enterocolitica* biotipi tika noteikti ar bioķīmiskajām reakcijām pēc Wauters et al. (1987) aprakstītās metodes.

Listeria spp. noteikšanai izmantota ISO 11290-1 metode "Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija. Horizontālā metode *Listeria monocytogenes* klātbūtnes un skaita noteikšanai. 1. daļa - Noteikšanas metode" (Anonymous, 1996). Tika izmantots 25 g parauga, kam pievienots 225 ml pus-Frāzera buljons (*Half-Fraser*, HF, Biolife), pēc tam sekoja 60 s homogenizēšana stomaherā un inkubēšana 24 h 30 °C temperatūrā. Pēc inkubēšanas 0.1 ml inkulāts no HF buljona tika pārnests 10 ml Frāzera buljonā (*Fraser*, Biolife) un inkubēts 37 °C 48 h. Pēc inkubēšanas 0.1 ml inkulāta no pus-Frāzera un Frāzera bagātināšanas barotnēm uzsēts uz selektīvām barotnēm - ALOA (*Agar Listeria Ottaviani & Agosti*, Biolife) un Oxford agariem (Biolife). Pēc 24-48 h inkubēšanas perioda 37 °C temperatūrā, uz selektīvā agara barotnēm tika noteikta raksturīgo *L. monocytogenes* koloniju klātbūtne. *L. monocytogenes* ALOA agara barotnē veido zilgani zaļas kolonijas ar necaurspīdīgu zonu ap tām. Savukārt Oxford agara barotnē *Listeria* spp. pēc 24 h, kultivējot 37 °C veido 1 mm diametrā kolonijas pelēkā krāsā ar melnu zonu ap tām. Pēc 48 h kultivēšanas, *Listeria* spp. kolonijas Oxford agara barotnē kļūst lielākas, ap 2 mm diametrā, tumšākas krāsas, ar melnu zonu, un tām var parādīties zaļgans spīdums. Aizdomīgās *L. monocytogenes* kolonijas uz ALOA agara tika krāsotas

pēc Gram, noteikta baktēriju spēja veidot hemolīzi, katalāzes aktivitāte un kustīgums. *Listeria* spp. biokīmiskā identifikācija veikta, izmantojot API *Listeria* testu (BioMérieux, Mancy l'Etoile, Francija).

***L. monocytogenes* serogrupu noteikšana ar multiplex polimerāzes ķēdes reakciju**

No zivīm izolētajām *L. monocytogenes* kultūrām tika noteikta piederība serogrupai. Pētījumā tika analizēta septiņu *L. monocytogenes* gēnu (*prfA*, *prs*, *Lmo0737*, *Lmo1118*, *Orf2819*, *Orf2110*, *flaA*) sastopamība, izmantojot multiplex polimerāzes ķēdes reakciju (PCR). *L. monocytogenes* serogrupu noteikšanai pielietota Kérouanton et al. (2010) un Doumith et al. (2004) aprakstīta metode. Tika izmantotas multiplex PCR un PCR flagellu proteīna kodējošā *flaA* gēna noteikšanai.

Lai veiktu multiplex PCR, tika pagatavots 25 µl amplifikācijas mikss, kas sastāvēja no 1 µl parauga DNS, 15.6 µl RNāžu brīva ūdens (Qiagen, Vācija), 2.5 µl 1x bufera (magnija hlorīdu ($MgCl_2$) nesaturošs), 2 mM $MgCl_2$ (Thermo Scientific, Lietuva), 0.2 mM dezoksiribonukleotīdu trifosfātu miksa (dNTP, Qiagen, Vācija), 1 U rekombinantās *Taq* polimerāzes (Thermo Scientific, Lietuva), 0.4 µM praimera *lmo0737-F*, *lmo0737-R*, *lmo1118-F*, *lmo1118-R*, ORF2110-F, ORF2110-R, ORF2819-F, ORF2819-R, 0.1 µM praimera *prs-1*, *prs-2*, un 0.2 µM praimera LIP 1 un LIP 2.

Mikss *flaA* gēna noteikšanai sastāvēja no 2 µl parauga DNS, 12.1 µl RNāžu brīva ūdens, 2.5 µl 1x bufera (magnija hlorīdu ($MgCl_2$) nesaturošs), 4 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP miksa, 1 U rekombinantās *Taq* polimerāzes un 0.8 µM katru praimera: *flaA-F* un *flaA-R*. Multiplex PCR un PCR *flaA* gēna noteikšanai tika veikta amplifikatorā (Applied Biosystems, Lielbritānija). PCR programmā DNS sākuma denaturācijai tika izmantota 94 °C temperatūra 3 min, kas turpinājās ar 40 cikliem 94 °C temperatūrā 30 s, 61 °C temperatūrā 40 s un 72 °C temperatūrā 60 s, bet DNS beigu sintēzes laiks bija 7 min 72 °C temperatūrā. Polimerāzes ķēdes reakcijā iegūto DNS fragmentu analīze tika veikta kapilārajā elektroforēzē (Qiaxcel Advanced System, Qiagen, Vācija).

Datu statistiskā apstrāde

Pētījuma rezultātu aprēķināšanai un iegūto datu statistiskai apstrādei izmantojām Microsoft Excel 2010 programmatūru. Piesārņojuma ar *Enterobacteriaceae* dzimtas baktērijām, fekālajām koliformām, psihrotrofajiem mikroorganismiem, kā arī baktēriju kopskaita atšķirību aprēķināšanai zivīs izmantojām vienfaktora dispersiju analīzes rīku Anova un Tukey-Kramer testu.

Listeria monocytogenes un *Yersinia enterocolitica* sastopamības atšķirību aprēķināšanai izmantojām *H*-kvadrāta testu.

PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Higiēnas indikatormikroorganismu daudzums ezeru zivīs

Vispārējam ezeru zivju mikrobioloģiskās kvalitātes novērtējumam pētījumā analizējām baktēriju kopskaitu, *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju, fekālo koliformu un psihrotrofo mikroorganismu daudzumu trīs dažādos audos (žaunās, uz ādas un zarnās) katram zivs paraugam.

Baktēriju kopskaits žaunās, uz ādas un zarnās asaros (*Perca fluviatilis*), pličos (*Blicca bjoerkna*) un zušos (*Anguilla anguilla*) Ķīšezerā, Usmas ezerā un Sīvera ezerā svārstījās no $0.00 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$ līdz $8.71 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$. Baktēriju kopskaits žaunās, uz ādas un zarnās asaros, pličos un zušos parādīts 1. tabulā.

1. tabula/ *Table 1*

Baktēriju kopskaits ezeru zivju žaunās, uz ādas un zarnās

Total bacterial count of gills, skin and gut of fish from lakes

Zivs suga/ <i>Fish species</i>	Paraugu skaits/ <i>No. of samples</i>	Parauga veids/ <i>Type of sample</i>	Vidējā vērtība \pm SD $\log_{10} \text{KVV g}^{-1}$ / Mean \pm SD $\log_{10} \text{CFU g}^{-1}$	Diapazons (min-max) $\log_{10} \text{KVV g}^{-1}$ / Range (min-max) $\log_{10} \text{CFU g}^{-1}$
Asaris/ <i>Perch</i> (<i>Perca fluviatilis</i>)	21	žaunas/ <i>gills</i>	6.12 ± 1.20	3.78-8.00
		āda/ <i>skin</i>	7.23 ± 0.94	5.34-8.51
		zarnas/ <i>gut</i>	6.55 ± 1.13	4.38-7.96
Plicis/ <i>Silver bream</i> (<i>Blicca bjoerkna</i>)	8	žaunas/ <i>gills</i>	7.21 ± 1.20	5.41-8.40
		āda/ <i>skin</i>	7.72 ± 0.81	6.69-8.71
		zarnas/ <i>gut</i>	7.31 ± 0.58	6.58-8.28
Zutis/ <i>Eel</i> (<i>Anguilla anguilla</i>)	30	žaunas/ <i>gills</i>	4.04 ± 2.24^a	0.60-6.88
		āda/ <i>skin</i>	4.14 ± 1.85^a	1.04-7.38
		zarnas/ <i>gut</i>	3.38 ± 1.74^a	0.00-6.84

^a Baktēriju kopskaits žaunās, uz ādas un zarnās zušos bija būtiski mazāks ($p<0.05$) nekā žaunās, uz ādas un zarnās asaros un pličos/ *total bacterial count of gills, skin and gut of eel was significantly lower ($p<0.05$) than of gills, skin and gut of perch and silver bream*

Baktēriju kopskaits žaunās asaros, pličos un zušos svārstījās no $0.60 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$ līdz $8.40 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$. Vislielākā baktēriju kopskaita vidējā vērtība žaunās bija pličos ($7.21 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$), bet vismazākā zušos ($4.04 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$). Baktēriju kopskaits uz ādas svārstījās no 1.04 līdz $8.71 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$. Lielākā vidējā vērtība konstatēta pličos ($7.72 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$),

bet mazākā zušos ($4.14 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$). Zarnās asaros, pličos un zušos baktēriju kopskaita diapazons bija no 0.00 līdz $8.28 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$. Vislielākā baktēriju kopskaita vidējā vērtība zarnās bija pličos ($7.31 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$), bet zemākā zušos ($3.38 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$). Mikrobioloģiskā piesārņojuma atšķirības dažādām zivju sugām var būt saistītas ar zivju ekologiju, zivju barošanās veidu, migrāciju un ūdens mikrobioloģisko piesārņojumu.

Baktēriju kopskaitu zivīs ir aprakstījuši arī Mudarris un Austin (1988) un Al-Harbi un Uddin (2005). Zemāku baktēriju kopskaitu zivīs atraduši Mudarris un Austin (1988), kuri savā pētījumā konstatēja, ka baktēriju kopskaits nepārsniedz $5.84 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$ žaunās akmenplekstei (*Scophthalmus maximus*) no zivju audzētavas. Savukārt Al-Harbi un Uddin (2005) pētījumā baktēriju kopskaits svārstās no $7.44 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$ tilapijas (*Oreochromis niloticus*) zarnās un no $5.93 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$ žaunās, un šie rezultāti ir līdzīgi mūsu pētījumā iegūtajiem rezultātiem asariem un pličiem. Autori arī uzskatīja, ka mikrobioloģisko piesārņojumu zivīs ietekmē vides apstākļi un zivju audzēšanas veids.

Piesārņojums ar *Enterobacteriaceae* dzimtas baktērijām žaunās, uz ādas un zarnās asaros, pličos un zušos Ķīšezerā, Usmas ezerā un Sīvera ezerā svārstījās no 0.00 līdz $7.67 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$ (2. tabula).

2. tabula/ *Table 2*

Enterobacteriaceae daudzums ezeru zivju žaunās, uz ādas un zarnās

Enterobacteriaceae count of gills, skin and gut of fish from lakes

Zivs suga/ <i>Fish species</i>	Paraugu skaits/ <i>No. of samples</i>	Parauga veids/ <i>Type of sample</i>	Vidējā vērtība \pm SD $\log_{10} \text{KVV g}^{-1}$ / Mean \pm SD $\log_{10} \text{CFU g}^{-1}$	Diapazons (min-max) $\log_{10} \text{KVV g}^{-1}$ / Range (min- max) $\log_{10} \text{CFU g}^{-1}$
Asaris/ <i>Perch</i> (<i>Perca fluviatilis</i>)	21	žaunas/ <i>gills</i>	4.14 ± 1.95	0.30-7.36
		āda/ <i>skin</i>	5.81 ± 1.91^a	1.00-7.30
		zarnas/ <i>gut</i>	4.86 ± 2.05	0.85-7.52
Plicis/ <i>Silver bream</i> (<i>Blicca bjoerkna</i>)	8	žaunas/ <i>gills</i>	4.76 ± 1.63	2.46-7.67
		āda/ <i>skin</i>	5.39 ± 0.84	3.90-6.17
		zarnas/ <i>gut</i>	5.92 ± 0.96	4.74-6.97
Zutis/ <i>Eel</i> (<i>Anguilla anguilla</i>)	30	žaunas/ <i>gills</i>	2.71 ± 1.85	0.00-6.00
		āda/ <i>skin</i>	1.87 ± 1.74^b	0.00-4.86
		zarnas/ <i>gut</i>	1.57 ± 1.22^b	0.00-4.20

^a *Enterobacteriaceae* daudzums uz ādas asariem bija būtiski ($p<0.05$) lielāks nekā žaunās/ *Enterobacteriaceae count on skin and gut of perch was significantly higher (p<0.05) than of gills*

^b *Enterobacteriaceae* daudzums uz ādas un zarnās zušos bija būtiski ($p<0.05$) mazāks nekā uz ādas un zarnās asaros un pličos/ *Enterobacteriaceae count on skin and gut of eel was significantly lower (p<0.05) than of gut and skin of perch and silver bream*

Fekālo koliformu skaits žaunās, uz ādas un zarnās asaros, pličos un zušos no ezeriem parādīts 3. tabulā.

3. tabula/ *Table 3*

Fekālo koliformu daudzums ezeru zivju žaunās, uz ādas un zarnās
Fecal coliform bacteria count of gills, skin and gut of fish from lakes

Zivs suga/ <i>Fish species</i>	Paraugu skaits/ <i>No. of samples</i>	Parauga veids/ <i>Type of sample</i>	Vidējā vērtība±SD \log_{10} KVV g ⁻¹ / Mean±SD \log_{10} CFU g ⁻¹	Diapazons (min-max) \log_{10} KVV g ⁻¹ / Range (min- max) \log_{10} CFU g ⁻¹
Asaris/ <i>Perch</i> (<i>Perca fluviatilis</i>)	21	žaunas/ <i>gills</i>	3.51±1.26	0.00-5.11
		āda/ <i>skin</i>	5.16±1.17 ^a	4.00-6.74
		zarnas/ <i>gut</i>	4.07±1.70	0.00-6.80
Plicis/ <i>Silver bream</i> (<i>Blicca bjoerkna</i>)	8	žaunas/ <i>gills</i>	3.32±0.67	2.43-4.20
		āda/ <i>skin</i>	5.29±0.52 ^b	4.76-6.04
		zarnas/ <i>gut</i>	3.96±0.91	3.04-5.20
Zutis/ <i>Eel</i> (<i>Anguilla anguilla</i>)	25	žaunas/ <i>gills</i>	1.26±1.30 ^{c,d}	0.00-3.68
		āda/ <i>skin</i>	0.64±0.79 ^c	0.00-2.96
		zarnas/ <i>gut</i>	0.25±0.75 ^c	0.00-3.23

^a Fekālo koliformu daudzums uz ādas asariem bija būtiski ($p<0.05$) lielāks nekā žaunās un zarnās/ *fecal coliform bacteria count count on skin of perch was significantly higher (p<0.05) than of gills and gut*

^b Fekālo koliformu daudzums uz ādas pličiem bija būtiski ($p<0.05$) lielāks nekā žaunās/ *fecal coliform bacteria count on skin of silver bream was significantly higher (p<0.05) than of gills*

^c Fekālo koliformu daudzums žaunās, uz ādas un zarnās zušos bija būtiski ($p<0.05$) mazāks nekā žaunās, uz ādas un zarnās asaros un pličos/ *fecal coliform count of gills, skin and gut of eel was significantly lower (p<0.05) than of perch and silver bream*

^d Fekālo koliformu daudzums žaunās zušiem bija būtiski ($p<0.05$) lielāks nekā zarnās/ *fecal coliform bacteria count of gills of eel was significantly higher (p<0.05) than of gut*

Fekālo koliformu skaits žaunās asaros, pličos un zušos svārstījās no 0.00-5.11 \log_{10} KVV g⁻¹. Lielākais fekālo koliformu vidējais skaits žaunās tika konstatēts asaros, bet zemākais zušos (3.51 un 1.26 \log_{10} KVV g⁻¹). Uz ādas piesārnojums ar fekālajām koliformām svārstījās no 0.00-6.74 \log_{10} KVV g⁻¹. Fekālo koliformu vidējais skaits uz ādas vislielākais bija pličos (5.29 \log_{10} KVV g⁻¹), kamēr vismazākais zušos (0.64 \log_{10} KVV g⁻¹). Tīkmēr zarnās fekālo koliformu skaits svārstījās no 0.00-6.80 \log_{10} KVV g⁻¹, bet vidējā kontaminācija vislielākā konstatēta asaros (4.07 \log_{10} KVV g⁻¹), bet mazākā zušos (0.25 \log_{10} KVV g⁻¹). Būtiskas ($p<0.05$) atšķirības tika konstatētas fekālo koliformu daudzumā uz ādas, žaunās un zarnās asaros, tāpat arī žaunās un uz ādas pličos, un zarnās un žaunās zušos.

Fekālo koliformu piesārņojums zivīs var būt saistīts ar ūdens vides, kurā zivis dzīvo, kontamināciju. Arī citos pētījumos bija konstatēts piesārņojums ar fekālajām koliformām žaunās, uz ādas un zarnās zivīm (Geldreich, Clark, 1966; El-Shafai et al., 2004). El-Shafai ar līdzautoriem (2004) pētījumā noteica lielāku fekālo koliformu daudzumu žaunās nekā uz ādas Nīlas tilapijai (*Oreochromis niloticus*) zivjaudzētavas dīķos, un saistīja to ar žaunu virsmas īpatnējo uzbūvi, kā arī lielo ūdens tilpumu, kas plūst caur žaunām. Geldreich un Clark (1966) konstatēja, ka fekālo koliformu daudzums zarnās svārstās no $1.37 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$ zilžaunu sauleszivīs (*Lepomis macrochirus*) līdz $6.04 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$ samveidīgajās zivīs (*Ictalurus lacustris punctatus*) ūdens temperatūras diapazonā 13-18 °C, vidēji piesārņotā ūdenī Little Miami upē Ohaio, ASV. Autori secināja, ka kontaminācija ar fekālajām koliformām zivīs atkarīga no uzņemtā barības apjoma un piesārņojuma.

Psihrotrofo mikroorganismu daudzums žaunās asaros, pliņos un zušos svārstījās no $1.15 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$ līdz $7.64 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$ (4. tabula).

4. tabula/ *Table 4*

**Psihrotrofo mikroorganismu daudzums ezeru zivju
žaunās, uz ādas un zarnās**

Zivs suga/ <i>Fish species</i>	Paraugu skaits/ <i>No. of samples</i>	Parauga veids/ <i>Type of sample</i>	Vidējā vērtība±SD $\log_{10} \text{KVV g}^{-1}$ Mean±SD $\log_{10} \text{CFU g}^{-1}$	Diapazons (min-max) $\log_{10} \text{KVV g}^{-1}$ Range (min- max) $\log_{10} \text{CFU g}^{-1}$
Asaris/ <i>Perch</i> (<i>Perca fluviatilis</i>)	21	žaunas/ <i>gills</i>	5.60 ± 0.99^a	3.30-7.64
		āda/ <i>skin</i>	6.57 ± 0.80	4.98-7.61
		zarnas/ <i>gut</i>	5.56 ± 1.00	4.28-7.43
Plicis/ <i>Silver bream</i> (<i>Blicca bjoerkna</i>)	8	žaunas/ <i>gills</i>	5.48 ± 0.80	4.58-6.79
		āda/ <i>skin</i>	6.16 ± 0.57	5.40-6.90
		zarnas/ <i>gut</i>	6.03 ± 0.60	5.16-6.81
Zutis/ <i>Eel</i> (<i>Anguilla anguilla</i>)	25	žaunas/ <i>gills</i>	3.97 ± 1.67	1.15-6.15
		āda/ <i>skin</i>	5.58 ± 0.70^b	4.34-6.91
		zarnas/ <i>gut</i>	4.14 ± 1.81^c	1.00-6.88

^a Psihrotrofo mikroorganismu daudzums žaunās asaros bija būtiski ($p<0.05$) lielāks nekā žaunās zušos/ *psychrotrophic count of gills of perch was significantly higher (p<0.05) than of gills of eel*

^b Psihrotrofo mikroorganismu daudzums uz ādas zušos bija būtiski ($p<0.05$) lielāks nekā žaunās un zarnās zušos/ *psychrotrophic count on skin of eel was significantly higher (p<0.05) than of gut of eel*

^c Psihrotrofo mikroorganismu daudzums zarnās zušos bija būtiski ($p<0.05$) mazāks nekā zarnās asaros un pliņos/ *psychrotrophic count of gut of eel was significantly lower (p<0.05) than of gut of perch and silver bream*

Vislielākā psihrotrofo mikroorganismu vidējā vērtība žaunās bija asaros ($5.60 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$), bet vismazākā zušos ($3.97 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$). Piesārņojums

uz ādas svārstījās no 4.34 līdz 5.40 \log_{10} KVV g⁻¹. Vislielākā psihrotrofo mikroorganismu vidējā vērtība konstatēta uz ādas asaros, bet vismazākā zušos, attiecīgi 6.57 un 5.58 \log_{10} KVV g⁻¹. Zarnās piesārņojums ar psihrotrofajiem mikroorganismiem svārstījās no 1.00 līdz 7.43 \log_{10} KVV g⁻¹, bet vislielākā psihrotrofo mikroorganismu vidējā vērtība bija pliņos (6.03 \log_{10} KVV g⁻¹), kamēr vismazākā zušos (4.14 \log_{10} KVV g⁻¹).

Pretstatā mūsu pētījumā iegūtajiem rezultātiem, Scherer ar līdzautoriem (2006) konstatēja nedaudz zemāku psihrotrofo baktēriju skaitu (3.0 \log_{10} KVV g⁻¹) ādā baltajam amūram (*Ctenopharyngodon idella*) zivjaudzētavā. Mūsu pētījumā bija augsts piesārņojums ar psihrotrofajiem mikroorganismiem zīvīs. Lielis psihrotrofo mikroorganismu daudzums zīvīs var būt saistīts ar zemu apkārtējās vides temperatūru, kas veicina psihrotrofo baktēriju augšanu (Dalggaard, 2003). Citi autori pētīja vairākus mikrobioloģiskos rādītājus zeltainajā karūsā (*Sparus aurata*), kas nozvejota mērenajos ūdeņos Kanāriju salās (Carrascosa et al., 2015). Autori norādīja, ka no analizētajiem zīvs audiem mikrobioloģiskais piesārņojums vislielākais bija žaunās, kam sekoja āda, bet muskuļos piesārņojums bija vismazākais.

Arī citi autori ir pētījuši mikrobioloģisko piesārņojumu dažādos audos un zarnu saturā svaigās zīvīs (Mandal et al., 2009; Balasubramanian et al., 1992). Mandal ar līdzautoriem (2009) pētīja mikrobioloģisko piesārņojumu zīvju žaunās, zarnās un muskuļos. Autori konstatēja vislielāko baktēriju kopskaitu (4.95 \log_{10} KVV g⁻¹) zarnās Nīlas tilapijai (*Oreochromis niloticus*), kamēr fekālo koliformu skaits vislielākais tika atrasts žaunās (2.48 \log_{10} KVV g⁻¹). Parasti koliformas zarnās zīvīs nav sastopamas, bet fekālo koliformu izolēšana no šo dzīvnieku gremošanas kanāla var liecināt par neatbilstošu ūdens mikrobioloģisko kvalitāti (Huss, 1994). Balasubramanian ar līdzautoriem. (1992) pētījumā noteica, ka sešās dažādās zīvju sugās no zivjaudzētavas bakteriālais piesārņojums bija augstāks zarnās nekā uz ādas, žaunās un muskuļos. Autori arī norādīja, ka bakteriālā piesārņojuma līmenis bija augstāks zīvīs detritēdājās, kas barojas ar augu vai dzīvnieku izcelsmes nedzīvu materiālu parasti ūdenstilpes gultnē. Tikmēr zīvīs planktonēdājās, kas barojas ar mikroskopiskiem augiem, dzīvniekiem un baktērijām, kas parasti atrodas ūdens slānī, piesārņojums ar baktērijām bija zemāks.

Higiēnas indikatormikroorganismu daudzums zīvīs **Kīšezerā, Usmas ezerā un Sīvera ezerā**

Baktēriju kopskaits žaunās, uz ādas un zarnās asaros, pliņos un zušos Usmas un Sīvera ezerā un asaros un zušos Kīšezerā bija atšķirīgs (5. tabula). Lielākā baktēriju kopskaita vidējā vērtība žaunās tika konstatēta pliņos Sīvera ezerā (8.15 \log_{10} KVV g⁻¹), bet mazākā zušos Usmas ezerā (2.40 \log_{10} KVV g⁻¹).

¹⁾). Uz ādas baktēriju kopskaits svārstījās no 1.04-8.71 \log_{10} KVV cm^{-2} . Baktēriju kopskaita vidējā vērtība vislielākā bija pličos ($7.87 \log_{10}$ KVV cm^{-2}) Usmas ezerā, bet vismazākā zušos ($2.51 \log_{10}$ KVV cm^{-2}) Usmas ezerā. Tikmēr zarnās baktēriju kopskaits bija no 0.00-8.28 \log_{10} KVV g^{-1} . Savukārt vidējais baktēriju kopskaita zarnās vislielākais tika konstatēts pličos no Sīvera ezera, bet mazākais zušos no Usmas ezera, attiecīgi 7.47 un $2.16 \log_{10}$ KVV g^{-1} .

5. tabula

Baktēriju kopskaits asaros (*Perca fluviatilis*), pličos (*Blicca bjoerkna*) un zušos (*Anguilla anguilla*) Ķīšezerā, Usmas ezerā un Sīvera ezerā

Ezers	Zīvs suga	Paraugu skaitis	Žaunas		Āda		Zarnas	
			vidējā vērtība \pm SD \log_{10} KVV g^{-1}	diapazons (min.-max) \log_{10} KVV g^{-1}	vidējā vērtība \pm SD \log_{10} KVV cm^{-2}	diapazons (min.-max) \log_{10} KVV cm^{-2}	vidējā vērtība \pm SD \log_{10} KVV g^{-1}	diapazons (min.-max) \log_{10} KVV g^{-1}
Ķīsezers	asaris	4	5.08 \pm 0.90	4.11-6.28	5.61 \pm 0.21	5.34-5.84	6.31 \pm 1.53	4.38-7.84
	zutis	10	3.86 \pm 2.69 ^a	0.60-6.65	4.88 \pm 2.17 ^c	2.20-7.38	3.22 \pm 1.82 ^f	0.00-5.90
Usmas	asaris	13	6.32 \pm 1.18	3.78-8.00	7.80 \pm 0.43	7.04-8.51	6.67 \pm 1.04	4.62-7.96
	plicis	5	6.64 \pm 1.18	5.41-8.08	7.87 \pm 0.69	6.89-8.61	7.21 \pm 0.53	6.58-8.28
	zutis	11	2.40 \pm 0.67 ^b	1.26-3.76	2.51 \pm 0.85 ^d	1.04-3.93	2.16 \pm 0.44 ^f	1.45-2.78
Sīvers	asaris	4	6.51 \pm 1.19	5.46-7.68	6.99 \pm 0.21	6.81-7.30	6.39 \pm 1.28	4.48-7.15
	plicis	3	8.15 \pm 0.32	7.79-8.40	7.47 \pm 1.09	6.69-8.71	7.47 \pm 0.74	4.95-5.83
	zutis	9	6.25 \pm 0.43	5.53-6.88	5.32 \pm 0.53 ^e	4.32-6.04	5.05 \pm 1.32	3.30-6.84

^a Baktēriju kopskaita žaunās zušos Ķīšezerā bija būtiski mazāks ($p<0.05$) nekā žaunās asaros un zušos Sīvera ezerā un asaros un pličos Usmas ezerā

^b Baktēriju kopskaita žaunās zušos Usmas ezerā bija būtiski mazāks ($p<0.05$) nekā žaunās asaros un pličos Usmas ezerā, asaros un zušos Sīvera ezerā un zušos Ķīšezerā

^c Baktēriju kopskaita uz ādas zušos Ķīšezerā bija būtiski mazāks ($p<0.05$) nekā uz ādas pličos Sīvera ezerā un zušos un pličos Usmas ezerā

^d Baktēriju kopskaita uz ādas zušos Usmas ezerā bija būtiski mazāks ($p<0.05$) nekā asaros, pličos un zušos Sīvera ezerā, asaros un pličos Usmas ezerā un asaros un zušos Ķīšezerā

^e Baktēriju kopskaita uz ādas zušos Sīvera ezerā bija būtiski mazāks ($p<0.05$) nekā asaros un pličos Usmas ezerā

^f Baktēriju kopskaita zarnās zušos Usmas ezerā un Ķīšezerā bija būtiski mazāks ($p<0.05$) nekā asaros, pličos un zušos Sīvera ezerā, asaros un pličos Usmas ezerā un asaros Ķīšezerā

Lielākais *Enterobacteriaceae* vidējais daudzums žaunās ($5.26 \log_{10}$ KVV g^{-1}) un zarnās ($6.32 \log_{10}$ KVV g^{-1}) tika konstatēts pličos Sīvera ezerā, bet uz ādas asaros ($6.85 \log_{10}$ KVV cm^{-2}) Usmas ezerā. Tikmēr mazākā *Enterobacteriaceae* vidējā vērtība žaunās, uz ādas un zarnās bija zušos Usmas ezerā, attiecīgi 1.32, 0.41 un $1.21 \log_{10}$ KVV cm^{-2} .

Enterobacteriaceae daudzums žaunās bija būtiski ($p<0.05$) atšķirīgs zušos Ķīšezerā, Usmas ezerā un asaros, pličos, zušos Sīvera ezerā, un pličos Usmas ezerā. Uz ādas būtiskas atšķirības ($p<0.05$) tika konstatētas zušos Usmas

ezerā un Sīvera ezerā, zušos, asaros Kīšezerā, asaros, plīčos Usmas ezerā, un asaros Sīvera ezerā. *Enterobacteriaceae* daudzums zarnās būtiski ($p<0.05$) atšķirīgs bija asaros, plīčos Usmas ezerā un Sīvera ezerā un zušos Kīšezerā, Usmas ezerā un Sīvera ezerā, un asaros Kīšezerā.

Enterobacteriaceae dzimtas baktēriju daudzums asaros, plīčos un zušos Kīšezerā, Usmas ezerā un Sīvera ezerā parādīts 6. tabulā.

6. tabula

***Enterobacteriaceae* daudzums asaros (*Perca fluviatilis*), plīčos (*Blicca bjoerkna*) un zušos (*Anguilla anguilla*) Kīšezerā,
Usmas ezerā un Sīvera ezerā**

Ezers	Zīvs suga	Paraugu skaitis	Žaunas		Āda		Zarnas	
			vidējā vērtība \pm SD \log_{10} KVV g $^{-1}$	diapazons (min-max) \log_{10} KVV g $^{-1}$	vidējā vērtība \pm SD \log_{10} KVV cm $^{-2}$	diapazons (min-max) \log_{10} KVV cm $^{-2}$	vidējā vērtība \pm SD \log_{10} KVV g $^{-1}$	diapazons (min-max) \log_{10} KVV g $^{-1}$
Kīšezers	asaris	4	1.65 \pm 1.30 ^a	1.00-3.60	2.46 \pm 1.68 ^b	1.00-4.04	1.96 \pm 2.02	0.85-4.99
	zutis	10	2.22 \pm 1.63 ^a	0.00-3.90	2.27 \pm 2.16 ^b	0.00-4.86	1.27 \pm 1.40	0.00-3.78
Usmas	asaris	13	4.63 \pm 1.80	0.30-7.36	6.85 \pm 0.45	5.64-7.30	5.56 \pm 1.33 ^d	3.25-7.52
	plicis	5	4.46 \pm 2.05	2.46-7.67	5.74 \pm 0.43	5.15-6.17	5.68 \pm 0.91 ^d	4.74-6.86
	zutis	11	1.32 \pm 0.53 ^a	0.48-2.23	0.41 \pm 0.40 ^b	0.00-1.08	1.21 \pm 0.80	0.00-1.92
Sīvers	asaris	4	5.02 \pm 0.63	4.54-5.94	5.78 \pm 1.03	4.79-6.89	5.49 \pm 1.78 ^e	3.43-7.11
	plicis	3	5.26 \pm 0.50	4.95-5.83	4.80 \pm 1.11	3.90-6.04	6.32 \pm 1.11 ^e	5.04-6.97
	zutis	9	4.95 \pm 0.64	4.08-6.00	3.22 \pm 0.53 ^c	2.34-4.15	2.33 \pm 1.19	0.00-4.20

^a *Enterobacteriaceae* daudzums žaunās asaros un zušos Kīšezerā un zušos Usmas ezerā bija būtiski mazāks ($p<0.05$) nekā asaros, plīčos un zušos Sīvera ezerā un plīčos Usmas ezerā

^b *Enterobacteriaceae* daudzums uz ādas zušos Usmas ezerā un zušos un asaros Kīšezerā bija būtiski mazāks ($p<0.05$) nekā asaros un plīčos Usmas ezerā un asaros Sīvera ezerā

^c *Enterobacteriaceae* daudzums uz ādas zušos Sīvera ezerā bija būtiski mazāks ($p<0.05$) nekā asaros un plīčos Usmas ezerā un asaros Sīvera ezerā, bet būtiski lielāks ($p<0.05$) nekā zušos Usmas ezerā

^d *Enterobacteriaceae* daudzums zarnās būtiski lielāks ($p<0.05$) bija asaros un plīčos Usmas ezerā nekā zušos Usmas ezerā un asaros un zušos Kīšezerā un Sīvera ezerā

^e *Enterobacteriaceae* daudzums zarnās būtiski lielāks ($p<0.05$) bija asaros un plīčos Sīvera ezerā nekā zušos Sīvera un Usmas ezeros un asaros un zušos Kīšezerā

Fekālo koliformu daudzums žaunās asaros, plīčos un zušos Kīšezerā, Usmas ezerā un Sīvera ezerā svārstījās no 0.00-4.40 \log_{10} KVV g $^{-1}$, bet fekālo koliformu vidējais daudzums vislielākais bija asaros Kīšezerā, bet vismazākais zušos Usmas ezerā, attiecīgi 4.19 un 0.54 \log_{10} KVV g $^{-1}$. Fekālo koliformu daudzums asaros, plīčos un zušos Kīšezerā, Usmas ezerā un Sīvera ezerā svārstījās no 0.00-6.74 \log_{10} KVV cm $^{-2}$ uz ādas un 0.00-6.80 \log_{10} KVV g $^{-1}$

zarnās. Tikmēr lielākā fekālo koliformu vidējā vērtība uz ādas tika konstatēta Usmas ezerā plīchos ($5.29 \log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$), bet mazākā zušos ($0.34 \log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$). Fekālo koliformu vidējais daudzums zarnās lielākais bija asaros, bet mazākais zušos Usmas ezerā, attiecīgi 4.07 un $0.00 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$. Piesārņojumā ar fekālajām koliformām būtiskas ($p<0.05$) atšķirības žaunās bija zušos Sīvera ezerā un Usmas ezerā, asaros, plīchos Usmas ezerā un zušos un asaros Kīšezerā. Tikmēr fekālo koliformu daudzums zarnās un zarnās būtiski ($p<0.05$) atšķirās zušos Kīšezerā, Usmas ezerā un Sīvera ezerā un asaros un plīchos Usmas ezerā.

Fekālo koliformu daudzums žaunās asaros, plīchos un zušos Kīšezerā, Usmas ezerā un Sīvera ezerā atspoguļots 7. tabulā.

7. tabula

**Fekālo koliformu daudzums asaros (*Perca fluviatilis*),
plīchos (*Blicca bjoerkna*) un zušos (*Anguilla anguilla*)
Kīšezerā, Usmas ezerā un Sīvera ezerā**

Ezers	Zīvs suga	Paraugu skaits	Žaunas		Āda		Zarnas	
			vidējā vērtība \pm SD $\log_{10} \text{KVV g}^{-1}$	diapazons (min-max) $\log_{10} \text{KVV g}^{-1}$	vidējā vērtība \pm SD $\log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$	diapazons (min-max) $\log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$	vidējā vērtība \pm SD $\log_{10} \text{KVV g}^{-1}$	diapazons (min-max) $\log_{10} \text{KVV g}^{-1}$
Kīšezers	asaris	4	4.19 ± 0.15^a	4.04-4.40	ND	ND	ND	ND
	zutis	10	0.86 ± 0.87	0.00-2.04	1.27 ± 1.18	0.00-2.96	0.22 ± 0.50	0.00-1.11
Usmas	asaris	13	3.31 ± 1.38^b	0.00-5.11	5.16 ± 1.17^c	4.00-6.74	4.07 ± 1.70^d	0.00-6.80
	plīcīs	5	3.32 ± 0.67^b	2.43-4.20	5.29 ± 0.52^c	4.76-6.04	3.96 ± 0.91^d	3.04-5.20
Sīvers	zutis	11	0.54 ± 0.71	0.00-1.92	0.34 ± 0.59	0.00-1.74	0.00 ± 0.00	0.00-0.00
	zutis	9	2.37 ± 1.36^b	0.00-3.68	0.67 ± 0.59	0.00-1.60	0.56 ± 1.17	0.00-3.23

ND – nav datu nepietiekama parauga apjoma dēļ

^aFekālo koliformu daudzums žaunās bija būtiski lielāks ($p<0.05$) asaros Kīšezerā nekā asaros, plīchos un zušos Usmas ezerā un zušos Sīvera ezerā

^bFekālo koliformu daudzums žaunās bija būtiski lielāks ($p<0.05$) zušos Sīvera ezerā un asaros un plīchos Usmas ezerā nekā zušos Kīšezerā un Usmas ezerā

^cFekālo koliformu daudzums uz ādas bija būtiski lielāks ($p<0.05$) asaros un plīchos Usmas ezerā nekā zušos Kīšezerā, Usmas un Sīvera ezeros

^dFekālo koliformu daudzums zarnās bija būtiski lielāks ($p<0.05$) asaros un plīchos Usmas ezerā nekā zušos Kīšezerā, Usmas un Sīvera ezeros

Psihrotrofo mikroorganismu daudzums žaunās asaros, plīchos un zušos Kīšezerā, Usmas ezerā un Sīvera ezerā svārstījās no 1.51 - $7.64 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$. Vislielākais psihrotrofo mikroorganismu vidējais daudzums žaunās tika

konstatēts asaros ($5.71 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$) Usmas ezerā, bet mazākais zušos ($2.24 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$) Usmas ezerā. Uz ādas psihrotrofo mikroorganismu skaits svārstījās no 4.34 - $7.61 \log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$. Lielākais psihrotrofo mikroorganismu vidējais daudzums uz ādas bija asaros Usmas ezerā ($6.69 \log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$), kamēr mazākā zušos Kīšezerā ($5.00 \log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$). Bet zarnās psihrotrofo mikroorganismu daudzums svārstījās no 1.00 - $5.56 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$, bet lielākā vidējā vērtība bija pliņos ($6.27 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$), kamēr mazākā zušos ($2.76 \log_{10} \text{KVV g}^{-1}$) no Usmas ezera.

Psihrotrofo mikroorganismu daudzums asaros, pliņos un zušos Kīšezerā, Usmas ezerā un Sīvera ezerā parādīts 8. tabulā.

8. tabula

Psihrotrofo mikroorganismu daudzums asaros (*Perca fluviatilis*), pliņos (*Blicca bjoerkna*) un zušos (*Anguilla anguilla*) Kīšezerā, Usmas ezerā un Sīvera ezerā

Ezers	Zīvs suga	Paraugu skaits	Žaunas		Āda		Zarnas	
			vidējā vērtība \pm SD $\log_{10} \text{KVV g}^{-1}$	diapazons (min-max) $\log_{10} \text{KVV g}^{-1}$	vidējā vērtība \pm SD $\log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$	diapazons (min-max) $\log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$	vidējā vērtība \pm SD $\log_{10} \text{KVV g}^{-1}$	diapazons (min-max) $\log_{10} \text{KVV g}^{-1}$
Kīšezers	asaris	4	ND	ND	ND	ND	4.84 ± 0.54	4.28 - 5.52
	zutis	10	$5.00 \pm 0.00^{\text{a}}$	5.00 - 5.00	5.00 ± 0.00	5.00 - 5.00	3.74 ± 1.60	1.00 - 5.00
Usmas	asaris	13	5.71 ± 1.12	3.30 - 7.64	$6.69 \pm 0.69^{\text{a}}$	5.50 - 7.61	$5.78 \pm 1.01^{\text{d}}$	4.50 - 7.43
	pliņis	5	5.62 ± 0.92	4.58 - 6.79	$6.42 \pm 0.43^{\text{a}}$	5.87 - 6.91	$6.27 \pm 0.51^{\text{d}}$	5.56 - 6.81
	zutis	11	$2.24 \pm 0.67^{\text{b}}$	1.51 - 3.82	$6.22 \pm 0.41^{\text{a}}$	5.51 - 6.91	2.76 ± 0.92	1.73 - 5.08
Sīvers	asaris	4	5.26 ± 0.10	5.15 - 5.39	ND	ND	4.84 ± 0.54	4.28 - 5.52
	pliņis	3	5.13 ± 0.25	4.95 - 5.30	5.50 ± 0.14	5.40 - 5.60	5.45 ± 0.41	5.16 - 5.74
	zutis	9	5.51 ± 0.59	4.26 - 6.15	5.12 ± 0.48	4.34 - 5.66	$6.04 \pm 0.83^{\text{d}}$	4.58 - 6.88

ND – nav datu nepietiekama parauga apjoma dēļ

^a Psihrotrofo mikroorganismu daudzums žaunās bija būtiski mazāks ($p<0.05$) zušos Kīšezerā nekā asaros un zušos Sīvera ezerā un asaros Usmas ezerā

^b Psihrotrofo mikroorganismu daudzums žaunās bija būtiski mazāks ($p<0.01$) zušos Usmas ezerā nekā asaros un pliņos Usmas ezerā, asaros un zušos Kīšezerā un Sīvera ezerā un pliņos Sīvera ezerā

^c Psihrotrofo mikroorganismu daudzums uz ādas bija būtiski lielāks ($p<0.05$) asaros, pliņos un zušos Usmas ezerā nekā pliņos un zušos Sīvera ezerā un zušos Kīšezerā

^d Psihrotrofo mikroorganismu daudzums zarnās bija būtiski lielāks ($p<0.05$) asaros un pliņos Usmas ezerā un zušos Sīvera ezerā nekā zušos Kīšezerā un Usmas ezerā un asaros Sīvera ezerā

Higiēnas indikatormikroorganismi zivīs mazumtirdzniecībā

Baktēriju kopskaitis uz ādas dažādu sugu zivīs mazumtirdzniecībā svārstījās no 3.00-8.65 \log_{10} KVV cm⁻² (9.tabula). Lielākā baktēriju kopskaita vidējā vērtība tika konstatēta ruduļos ($7.51 \log_{10}$ KVV cm⁻²), bet mazākā citās zivju sugās ($4.61 \log_{10}$ KVV cm⁻²). Mūsu pētījumā baktēriju kopskaita diapazons ($3.00-8.65 \log_{10}$ KVV cm⁻²) zivīs mazumtirdzniecībā ir lielāks nekā Svanevik ar līdzautoriem (2015) pētījuma rezultāti. Autori analizēja kvalitāti 510 zivju paraugos no zvejas kuģiem un zivju pārstrādes uzņēmumiem un konstatēja, ka baktēriju kopskaitis zivīs svārstās no <3.0 līdz $7.4 \log_{10}$ KVV g⁻¹. Turklat zivju paraugi piederēja Atlantijas makreles (*Scomber scombrus*), Atlantijas siļķes (*Clupea harengus*), moivas (*Mallotus villosus*) un putasu (*Micromesistius poutassou*) sugām.

9. tabula/ Table 9

Baktēriju kopskaitis uz ādas zivīs mazumtirdzniecībā

Total bacterial count on the skin of fish at retail

Zivs suga/ Fish species	Paraugu skaits/ No. of samples	Vidējā vērtība±SD \log_{10} KVV cm ⁻² / Mean±SD \log_{10} CFU cm ⁻²	Diapazons (min-max) \log_{10} KVV cm ⁻² / Range (min-max)/ \log_{10} CFU cm ⁻²
Rauda/ Roach (<i>Rutilus rutilus</i>)	28	6.04 ± 0.72^a	4.83-7.32
Breksis/ Freshwater bream (<i>Abramis brama</i>)	26	6.05 ± 0.5^a	5.15-7.11
Karūsa/ Crucian carp (<i>Carassius carassius</i>)	10	6.42 ± 1.06	4.58-7.59
Vimba/ Vimba bream (<i>Vimba vimba</i>)	24	6.12 ± 0.43^a	5.34-7.15
Asaris/ Perch (<i>Perca fluviatilis</i>)	11	6.56 ± 0.77	5.63-7.52
Plicis/ Silver bream (<i>Blicca bjoerkna</i>)	25	6.94 ± 0.77	5.62-8.65
Rudulis/ Rudd (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	6	7.51 ± 0.5	6.98-8.15
Citas zivju sugas/ Other fish species (līnis/ tench (<i>Tinca tinca</i>), karpa/ carp (<i>Cyprinus carpio</i>))	5	4.61 ± 0.91^b	3.00-5.11

^a Baktēriju kopskaitis raudās, brekšos un vimbās bija būtiski mazāks ($p<0.05$) nekā pličos un ruduļos/ total bacterial count of roach, freshwater bream and vimba bream was significantly lower ($p<0.05$) than of silver bream and rudd

^b Baktēriju kopskaitis citās zivju sugās bija būtiski mazāks ($p<0.05$) nekā ruduļos, pličos, asaros un karūsās/ total bacterial count of other fish species was significantly lower ($p<0.05$) than of rudd, silver bream, perch and crucian carp

Enterobacteriaceae daudzums zivīs mazumtirdzniecībā svārstījās no 0.00 līdz $5.20 \log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$. Lielākais *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju vidējais daudzums tika konstatēts karūsās ($3.66 \log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$), bet mazākais bija citās zivju sugās ($1.40 \log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$).

Pētījumā par mikrobioloģisko sastāvu aukstumā uzglabātos auksti kūpinātos lašos un taimiņos, kas īemti tirgū Portugālē, da Silva un Gibbs (2015) norādīja, ka *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju daudzumu paraugos varēja ietekmēt produktu agrīnā pārstrādes posmā pielietotie tehnoloģiskie procesi, piesārņojums kūpināšanas laikā, kā arī apstākļi un temperatūras svārstības mazumtirdzniecībā. *Enterobacteriaceae* daudzums zivīs mazumtirdzniecībā parādīts 10. tabulā.

10. tabula/ *Table 10*

***Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju daudzums uz ādas zivīs mazumtirdzniecībā**

Enterobacteriaceae count on the skin of fish at retail

Zivs suga/ <i>Fish species</i>	Paraugu skaits/ <i>No. of samples</i>	Vidējā vērtība \pm SD $\log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$ / Mean \pm SD $\log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$	Diapazons (min-max) $\log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$ / Range (min-max)/ $\log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$
Rauda/ <i>Roach</i> (<i>Rutilus rutilus</i>)	28	3.29 ± 1.31	1.00-5.20
Breksis/ <i>Freshwater bream</i> (<i>Abramis brama</i>)	26	2.3 ± 1.1	0.78-4.76
Karūsa/ <i>Crucian carp</i> (<i>Carassius carassius</i>)	10	3.66 ± 1.1	1.91-4.78
Vimba/ <i>Vimba bream</i> (<i>Vimba vimba</i>)	24	1.93 ± 1.02^a	0.00-4.00
Asaris/ <i>Perch</i> (<i>Perca fluviatilis</i>)	11	3.29 ± 0.72	2.36-4.28
Plicis/ <i>Silver bream</i> (<i>Blicca bjoerkna</i>)	25	2.49 ± 1.53	0.00-5.11
Rudulis/ <i>Rudd</i> (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	6	2.79 ± 0.28	2.54-3.18
Citas zivju sugas/ <i>Other fish species</i> (<i>Iinis/ tench</i> (<i>Tinca tinca</i>), <i>karpa/ carp</i> (<i>Cyprinus carpio</i>))	5	1.40 ± 1.11	0.00-2.72

^a *Enterobacteriaceae* daudzums vimbās bija būtiski mazāks ($p<0.05$) nekā raudās un karūsās/ *Enterobacteriaceae count of vimba bream was significantly lower ($p<0.05$) than of roach and crucian carp*

E. coli sastopamība uz ādas dažādām zivju sugām mazumtirdzniecībā svārstījās no 16.7-53.6% (11. tabula). Visaugstākā *E. coli* prevalence tika konstatēta raudās (53.6%, 15 no 28), bet viszemākā vimbās (12.5%, 3 no 24). *E. coli* netika konstatēta nevienā no pieciem analizētajiem citu zivju paraugiem.

11. tabula/ *Table 11*

***E. coli* prevalence neeviscerētās zivīs mazumtirdzniecībā**
The prevalence of E. coli on the skin surface of fish at retail

Zivs suga/ <i>Fish species</i>	Paraugu skaits/ <i>No. of samples</i>	<i>E. coli</i> pozitīvo paraugu skaits (%)/ <i>No of positive samples (%)</i>
Rauda/ <i>Roach</i> (<i>Rutilus rutilus</i>)	28	15 (53.6)
Breksis/ <i>Freshwater bream</i> (<i>Abramis brama</i>)	26	8 (30.8)
Karūsa/ <i>Crucian carp</i> (<i>Carassius carassius</i>)	10	2 (20)
Vimba/ <i>Vimba bream</i> (<i>Vimba vimba</i>)	24	3 (12.5)
Asaris/ <i>Perch</i> (<i>Perca fluviatilis</i>)	11	5 (45.5)
Plicis/ <i>Silver bream</i> (<i>Blicca bjoerkna</i>)	25	6 (24)
Rudulis/ <i>Rudd</i> (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	6	1 (16.7)
Citas zivju sugas/ <i>Other fish species</i> (<i>Iñis/ tench</i> (<i>Tinca tinca</i>), karpa/ <i>carp</i> (<i>Cyprinus carpio</i>))	5	0 (0)
Kopā/ <i>Total</i>	135	40 (29.6)

Arī citu autoru pētījumos *E. coli* tika izmantots kā indikatormikroorganisms (Stollewerk et al., 2014). Elsaidy ar līdzautoriem (2015) pētījumā *E. coli* klātbūtne tika konstatēta 20% (3/15) no analizētajām Nīlas tilapijām (*Oreochromis niloticus*), kas sešdesmit dienas audzētas eksperimentāli ar vistu mēsliem apstrādātos akvārijos. Nesen veiktajos pētījumos citi autori ir analizējuši *E. coli* sastopamību tādās pārtikas izejvielās kā zivīs, zivju produktos (Kim et al., 2017, Svanevik et al., 2015; Leisner et al., 2014, Van et al., 2008). Thampuran et al. (2005) pētījumā norāda, ka *E. coli* nereti ir zivju piesārņotājs tropiskajos reģionos. Autori izolēja *E. coli* no zivju paraugiem iegūtiem no tirgus Indijā un Kostarikā (Thampuran et al., 2005; Marín et al., 2009), kā arī piekrastes ūdeņos Kamerūnā (Akoachere et al., 2009). Costa (2013) norādīja, ka mikrobioloģiskajam piesārņojumam, nokļūstot

piekrastes ūdeņos, tiek kontaminētas ūdeņos dzīvojošās zivis, kā arī tiek radīts apdraudējums patēriņajiem. *E. coli* sastopamība zivīs un zivju produktos var radīt apdraudējumu patēriņajiem patogēno *E. coli* celmu dēļ. Tomēr arī nepatogēno *E. coli* celmu klātbūtne zivīs var apdraudēt sabiedrības veselību, jo *E. coli* kā fekālas izcelsmes piesārņojuma indikatormikroorganisms var liecināt par citu zarnās mītošu patogēno baktēriju klātbūtni.

Pārtikas infekciju ierosinātāju *Salmonella* spp., *Listeria* spp. un *Yersinia* spp. sastopamība zivīs mazumtirdzniecībā

Kopumā no analizētajiem 135 zivju paraugiem mazumtirdzniecībā, *L. monocytogenes* tika konstatēta 26% jeb 35 paraugos, kas pieder dažādām zivju sugām. Tākā 33% jeb 45 no izmeklētajiem 135 zivju paraugiem bija *Y. enterocolitica* pozitīvi. *Salmonella* spp. netika atrasta nevienā no analizētajiem zivju paraugiem mazumtirdzniecībā (12. tabula).

No pētījumā analizētajiem zivju paraugiem, lielākā *L. monocytogenes* sastopamība bija karūsās (40%, 4 no 10), bet ruduļos un citās zivju sugās *L. monocytogenes* netika atrasta. Tākā *Y. enterocolitica* visbiežāk tika konstatēta plīcos (56%, 14 no 25), kā arī citās zivju sugās (60%, 3 no 5), bet desmit karūsu un seši ruduļu paraugi bija *Y. enterocolitica* negatīvi.

Gaertner ar līdzautoriem (2008) norādīja, ka *Salmonella* spp. parasti nav atrodama mikrobiotas sastāvā zivīs, tomēr dažkārt *Salmonella* spp. klātbūtne zivīs tika atrasta (Onmaz et. al., 2015; Yang et al., 2015; Raufu et al., 2014; Busani et al., 2005; Davies et al., 2001). Nesen veiktajā pētījumā Onmaz ar līdzautoriem (2015) konstatēja *Salmonella* klātbūtni 10% (3 no 30) anšovu (*Engraulis encrasiculus*) un 6% (2 no 35) varavīksnes foreļu (*Oncorhynchus mykiss*) paraugos zivju tirgū Turcijā. Nesen veiktajā pētījumā par *Salmonella* prevalenci svaigās zivīs tirgū Ķīnā, Yang et al. (2015) konstatēja, ka *Salmonella* spp. biežāk sastopama saldūdens zivīs (18.6%, 43/231) nekā zivīs no sālsūdens (12.2%, 24/197). Pretstatā iepriekš minētajiem pētījumiem, Davies ar līdzautoriem (2001) nekonstatēja *Salmonella* nevienā no analizētajiem svaigu zivju paraugiem tirdzniecības uzņēmumos Eiropā, un tas saskan ar mūsu pētījuma rezultātiem. *Salmonella* spp. klātbūtne zivīs liecina par neatbilstošiem higiēnas apstākļiem. *Salmonella* spp. zivīs var nokļūt ar piesārņotu ūdeni, tāpat arī no kontaminētām virsmām un priekšmetiem jebkurā no transportēšanas, uzglabāšanas un tirdzniecības posmiem.

12. tabula/ Table 12

***L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* un *Salmonella* spp.
sastopamība zivīs mazumtirdzniecībā**

***The prevalence of L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* and
Salmonella spp. in fish at retail**

Zivs suga/ Fish species	Paraugu skaits/ No. of samples	Pozitīvo paraugu skaits (%)/ No of positive samples (%)		
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Salmonella</i> spp.
Rauda/ Roach (<i>Rutilus rutilus</i>)	28	6 (21)	2 (7)	0 (0)
Breksis/ Freshwater bream (<i>Aramis brama</i>)	26	5 (19)	8 (30)	0 (0)
Karūsa/ Crucian carp (<i>Carassius carassius</i>)	10	4 (40)	0 (0)	0 (0)
Vimba/ Vimba bream (<i>Vimba vimba</i>)	24	7 (29)	13 (54)	0 (0)
Asaris/ Perch (<i>Perca fluviatilis</i>)	11	4 (36)	5 (46)	0 (0)
Plicis/ Silver bream (<i>Blicca bjoerkna</i>)	25	9 (36)	14 (56)	0 (0)
Rudulis/ Rudd (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	6	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Citas zivju sugars/ Other fish species (līnis/ tench (<i>Tinca tinca</i>), karpa/ carp (<i>Cyprinus carpio</i>))	5	0 (0)	3 (60)	0 (0)
Kopā/ Total	135	35 (26)	45 (33)	0 (0)

Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka *L. monocytogenes* sastopamība zivīs mazumtirdzniecībā ir ievērojami biežāka nekā svaigās zivīs citās Eiropas reģiona valstīs. Citi autori pētījumos norādījuši, ka *L. monocytogenes* prevalence bija zemāka par 1% svaigās zivīs tirgū Griekijas ziemeļu daļā (Soullos et al., 2007), 13.5% svaigās zivīs pārstrādes uzņēmumos Ziemeļvalstīs (Gudbjörnsdóttir et al., 2004) un 14.6% varavīksnes forelēs (*Onchorynchus mykiss*) zivjaudzētavās Somijā (Miettinen, Wirtanen, 2005). Svaigu zivju paraugos zivju pārstrādes uzņēmumos Norvēģijā *L. monocytogenes* tika konstatēta 2 no 155 izmeklētajiem paraugiem (Svanevik et.al, 2015). Pretstatā iepriekš minētajai dažādu autoru konstatētajai

L. monocytogenes prevalencei, Latorre et al. (2007) neatrada *L. monocytogenes* nevienā no analizētajiem 154 svaigu zivju produktiem Itālijā 1993.-2004. gadā.

L. monocytogenes tika pētīta svaigās zivīs un zivju pārstrādes uzņēmuma vidē (Hoffman et al., 2003). Hoffman et al. analizēja *L. monocytogenes* vides paraugos (n=512) un svaigu zivju paraugos (n=312) divos kūpinātu zivju ražošanas uzņēmumos. Svaigu zivju paraugos bija iekļautas sīgas no ezeriem, Norvēģijas un Čīles zivjaudzētavu laši, savvaļas laši no ASV rietumu krasta un citas zivis. Autori konstatēja, ka no analizētajiem paraugiem 115 vides un 46 svaigu zivju paraugi bija *L. monocytogenes* pozitīvi. Turklat autori arī analizēja *L. monocytogenes* apakštīpus abos paraugu veidos un secināja, ka vides piesārņojums ar *L. monocytogenes* pārstrādes uzņēmumā lielākoties atšķiras no ienākošo izejvielu jeb svaigu zivju kontaminācijas.

Salīdzinājumā ar mūsu pētījuma rezultātiem, Davies et al. (2001) pētījuma rezultāti norāda, ka svaigās zivīs tirdzniecības uzņēmumos vairākās Eiropas valstīs *Y. enterocolitica* konstatēta retāk. Davies et al. pētījumā *Y. enterocolitica* pozitīvi bija 9% no izmeklētajiem 76 svaigu zivju paraugiem, kas iegūti Francijā, Lielbritānijā un Portugālē.

No zivīm mazumtirdzniecībā izolētajiem *Y. enterocolitica* celmiem tika noteikti biotipi, pielietojot bioķīmiskās reakcijas pēc Wauters et al. (1987) aprakstītās metodes. Bioķīmisko reakciju rezultāti (13. tabula) norādīja, ka visi, kopumā 45, *Y. enterocolitica* celmi piederēja biotipam 1A, kas tiek uzskatīts par nepatogēnu.

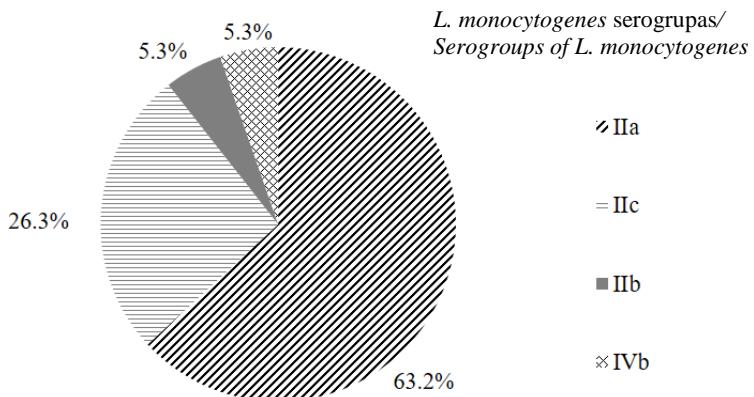
13. tabula/ *Table 13*
***Y. enterocolitica* klasifikācija zivīs mazumtirdzniecībā,
 pēc Wauters et al., 1987**

***The classification of Y. enterocolitica of fish at retail, after Wauters et al.,
 1987***

Bioķīmiskā reakcija/ Biochemical reaction	<i>Y. enterocolitica</i> celmu skaits/ No. of <i>Y. enterocolitica</i> strains	Rezultāts/ * Result
Salicīna fermentācija/ <i>Salicin</i> fermentation	45	pozitīvs/ positive
Ksilozes fermentācija/ <i>Xylose</i> fermentation	45	pozitīvs/ positive
Lipāzes aktivitāte/ <i>Lipase activity</i>	45	pozitīvs/ positive
Pirazīnamidāzes aktivitāte/ <i>Pyrazinamidase activity</i>	45	pozitīvs/ positive
Indola veidošana/ <i>Indole reaction</i>	45	pozitīvs/ positive

* Reakciju rezultāti tika nolasīti pēc testu inkubēšanas termostatā 28 °C temperatūrā piecas dienas/
the results obtained after incubation for five days at 28 °C

No zivīm mazumtirdzniecībā izolētajiem *L. monocytogenes* celmiem tika noteiktas serogrupas, pielietojot polimerāžes ķedes reakciju. Kopumā no analizētajiem 19 *L. monocytogenes* izolātiem 63.1% (n=12) bija *L. monocytogenes* serogrupa IIa, 26.3% (n=5) serogrupa IIc, bet serogrupai IIb piederēja 5.3% (n=1) un IVb - 5.3% (n=1) *L. monocytogenes* izolātu (1. att.).



1. att. *Listeria monocytogenes* serogrupu sastopamība svaigās zivīs mazumtirdzniecībā

*Fig. 1. The prevalence of *Listeria monocytogenes* serogroups
in raw fish at retail*

Arī citi autori pētījuši *L. monocytogenes* serogrupu sastopamību svaigos un pārstrādātos pārtikas produktos. Igaunijā veiktajā pētījumā Kramarenko ar līdzautoriem (2013) konstatēja, ka vairums *L. monocytogenes* izolātu (73.6%) no dažādiem pārtikas produktiem piederēja serotipam 1/2a, tajā skaitā 100% no svaigām zivīm iegūtie *L. monocytogenes* izolāti. Četri dažādi *L. monocytogenes* serotipi tika izolēti no svaigām zivīm Itālijā periodā no 2002. līdz 2005. gadam (Gianfranceschi et al., 2009), turklāt serotips 1/2a konstatēts visbiežāk (11 no 17 izolātos), un tas saskan ar mūsu pētījuma rezultātiem.

Pētījumā analizējām *Listeria* sugu sastopamību 135 zivju paraugos mazumtirdzniecībā. Kopumā tika iegūti 113 *Listeria* spp. izolāti, kas piederēja kādai no piecām *Listeria* sugām – *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* vai *L. seeligeri* (14. tabula).

Listeria* spp. sastopamībā zivīs mazumtirdzniecībā**The prevalence of Listeria spp. in fish at retail***

Zivs suga/ Fish species	Paraugu skaits/ No. of samples	Pozitīvo paraugu skaits (%) / No of positive samples (%)				
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. ivanovii</i>
Rauda/ Roach (<i>Rutilus rutilus</i>)	28	6 (21.4)	7 (25)	4 (14.3)	2 (7.1)	1 (3.6)
Breksis/ Freshwater bream (<i>Abramis brama</i>)	26	5 (19.2)	6 (23.1)	4 (15.4)	6 (23.1)	5 (19.2)
Karūsa/ Crucian carp (<i>Carassius carassius</i>)	10	4 (40)	3 (30)	1 (10)	0 (0)	0 (0)
Vimba/ Vimba bream (<i>Vimba vimba</i>)	24	7 (29.2)	6 (25)	4 (16.7)	1 (4.17)	0 (0)
Asaris/ Perch (<i>Perca fluviatilis</i>)	11	4 (36.4)	5 (45.5)	3 (27.3)	0 (0)	0 (0)
Plicis/ Silver bream (<i>Blicca bjoerkna</i>)	25	9 (36)	7 (28)	4 (16)	5 (20)	4 (16)
Rudulis/ Rudd (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	6	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Citas zivju sugars/ Other fish species (līnis/ tench (<i>Tinca tinca</i>), karpa/ carp (<i>Cyprinus carpio</i>))	5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Kopā/ Total	135	35 (25.9)	34 (25.2)	20 (14.8)	14 (10.4)	10 (7.4)

No *Listeria* sugām visbiežāk tika konstatēta *L. monocytogenes* (25.9%), kam sekoja *L. innocua* (25.2%), *L. welshimeri* (14.8%), *L. seeligeri* (10.4%) un *L. ivanovii* (7.4%). *Listeria* spp. sastopamībā dažādās zivju sugās bija atšķirīga. *L. monocytogenes* un *L. innocua* biežāk tika konstatētas asaros, attiecīgi 36.4% un 45.5%. *L. monocytogenes* un *L. innocua* retāk tika konstatēta brekšos, attiecīgi 19.2% un 23.1%. *L. ivanovii* biežāk bija sastopama brekšos (19.2%), bet retāk raudās (3.6%). Arī *L. seeligeri* biežāk bija sastopama brekšos (23.1%),

kamēr raudās retāk (7.1%). Savukārt *L. welshimeri* prevalence lielāka bija asaros (27.3%), bet mazāka karūsās (10%). *Listeria* spp. netika konstatēta nevienā no analizētajiem ruduļu un citu zivju paraugiem.

Listeria spp. sastopamību zivīs pētīja arī citi autori (Jamali et al., 2015; Kovačević et al., 2012; Jallewar et al., 2007;). Jallewar ar līdzautoriem (2007) Indijā no tirgus zivīm ķēma 100 muskuļu un 100 iekšējo orgānu paraugus un no tiem izoleja 39 *Listeria* spp. celmus, tajā skaitā 67% (n=26) *L. monocytogenes*, 21% (n=8) *L. seeligeri*, 8% (n=3) *L. grayi* un 5% (n=2) *L. welshimeri*. Zemāka *Listeria* spp. prevalence kā mūsu pētījumā tika konstatēta svaigās zivīs zivju tirgū Irānā (Jamali et al., 2015). Autori no svaigām zivīm izolēja *Listeria* spp. (21.3%, 104 no 488) un norādīja, ka no iegūtajiem *Listeria* spp. izolātiem 32.3 % (49 no 133) piederēja *L. monocytogenes*, turklāt tā bija visbiežāk konstatētā *Listeria* suga. Nākamā biežāk konstatētā bija *L. innocua* (35.3 %, 47 no 133), *L. seeligeri* (18 %, 24 no 133) un *L. ivanovii* (14.3 %, 19 no 133), un tas saskan ar *Listeria* sugu sastopamību mūsu pētījumā. Autori arī norādīja, ka *Listeria monocytogenes* klātesamība zivīs var radīt apdraudējumu patēriņajiem.

Zivju paraugos mazumtirdzniecībā noteicām *Yersinia* spp. klātbūtni. Kopumā 135 zivju paraugos tika izolēti 79 *Yersinia* spp. celmi, kas piedereja *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedii* vai *Y. kristensenii*.

Visbiežāk sastopamā *Yersinia* suga pētījumā analizētajām zivīm mazumtirdzniecībā bija *Y. enterocolitica* (33.3%), bet retāk *Y. frederiksenii* (11.1%), *Y. intermedii* (11.1%) un *Y. kristensenii* (3.0%).

Yersinia spp. Sastopamība zivīs mazumtirdzniecībā atspoguļota 15. tabulā.

Yersinia* spp. sastopamība zivīs mazumtirdzniecībā**The prevalence of Yersinia spp. in fish at retail***

Zivs suga/ Fish species	Paraugu skaits/ No. of samples	Pozitīvo paraugu skaits (%)/ No of positive samples (%)			
		<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. frederiksenii</i>	<i>Y. intermedii</i>	<i>Y. kristensenii</i>
Rauda/ <i>Roach</i> (<i>Rutilus rutilus</i>)	28	2 (7.1)	2 (7.1)	2 (7.1)	1 (3.6)
Breksis/ <i>Freshwater bream</i> (<i>Abramis brama</i>)	26	8 (30.8)	3 (11.5)	3 (11.5)	2 (7.7)
Karūsa/ <i>Crucian carp</i> (<i>Carassius carassius</i>)	10	0 (0)	2 (20)	2 (20)	0 (0)
Vimba/ <i>Vimba bream</i> (<i>Vimba vimba</i>)	24	13 (54)	1 (4.2)	1 (4.2)	0 (0)
Asaris/ <i>Perch</i> (<i>Perca fluviatilis</i>)	11	5 (46)	2 (18.2)	2 (18.2)	1 (9.1)
Plicis/ <i>Silver bream</i> (<i>Blicca bjoerkna</i>)	25	14 (56)	5 (20)	5 (20)	0 (0)
Rudulis/ <i>Rudd</i> (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	6	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Citas zivju sugars/ <i>Other fish species</i> (<i>līnis/ tench</i> (<i>Tinca tinca</i>), karpa/ <i>carp</i> (<i>Cyprinus carpio</i>))	5	3 (60)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Kopā/ Total	135	45 (33.3)	15 (11.1)	15 (11.1)	4 (3.0)

Augstāka *Y. enterocolitica* prevalence tika konstatēta citās zivju sugās (60%), bet zemāka raudās (7.1%). *Y. frederiksenii* biežāk sastopama bija pličos (20%), un retāk vimbās (4.2%), tikmēr *Y. intermedii* biežāk karūsās un pličos (20%), bet retāk vimbās (4.2%). *Y. kristensenii* prevalence augstāka bija asaros (9.1%), bet zemāka raudās (3.6%). *Yersinia* spp. netika konstatēta nevienā no analizētajiem ruduļu paraugiem.

SECINĀJUMI

1. Higiēnas indikatormikroorganismu daudzums (baktēriju kopskaitis, *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju daudzums, fekālo koliformu daudzums un psihrotrofo mikroorganismu daudzums) dažādos audos asaros, pliņos un zušos Ķīšezerā, Usmas ezerā un Sīvera ezerā bija atšķirīgs. No analizētajām zivju sugām būtiski zemāka ($p<0.05$) higiēnas indikatormikroorganismu vidējā vērtība žaunās, uz ādas un zarnās bija zušos nekā pliņos un asaros. Fekālo koliformu daudzums zivīs Usmas ezerā Kurzemē un Sīvera ezerā Latgalē bija mazāks nekā Ķīšezerā Rīgā.
2. Baktēriju kopskaita un *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju daudzums dažādām zivju sugām mazumtirdzniecībā bija atšķirīgs. Baktēriju kopskaita vidējā vērtība raudās ($6.04 \log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$), brekšos ($6.05 \log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$) un vimbās ($6.12 \log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$) bija būtiski mazāka ($p<0.05$) nekā pliņos ($6.94 \log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$) un ruduļos ($7.51 \log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$). *Enterobacteriaceae* vidējais daudzums vimbās ($1.93 \log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$) bija būtiski mazāks ($p<0.05$) nekā raudās ($3.29 \log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$) un karūsās ($3.66 \log_{10} \text{KVV cm}^{-2}$). Zivīs mazumtirdzniecībā bija augsta *Escherichia coli* prevalence (30%, 40/135), kas liecina par fekālā piesārņojuma klātbūtni, un var norādīt uz patogēno baktēriju klātbūtni zivīs.
3. Zivīs *Salmonella* ģints baktērijas nebija sastopamas. *Listeria* spp. un *Yersinia* spp. tika konstatētas zivīs mazumtirdzniecībā, bet netika atrastas ezeru zivīs. No *Listeria* sugām visbiežāk tika atrastas *Listeria monocytogenes* (26%, 35/135), kam seko *L. innocua* (25%, 34/135), *L. welshimeri* (15%, 20/135), *L. seeligeri* (10% 14/135) un *L. ivanovii* (7%, 10/135). Tīkmēr no *Yersinia* ģints sugām visbiežāk bija sastopama *Y. enterocolitica* (33%, 45/135), tad *Y. frederiksenii* (11%, 15/135) un *Y. intermedii* (11%, 15/135), bet visretāk *Y. kristensenii* (7%, 10/135).
4. Zivīs mazumtirdzniecībā tika konstatētas *Listeria monocytogenes* serogrupas IIa, IIb un IVb, kas var būt potenciāli patogēni un radīt apdraudējumu cilvēku veselībai. Lai gan no zivīm mazumtirdzniecībā tika izolēta *Yersinia enterocolitica*, tomēr visi *Y. enterocolitica* celmi piederēja biotipam 1A, kas bieži sastopams apkārtējā vidē un netiek uzskatīts par cilvēkiem patogēnu.

PRIEKŠLIKUMI

1. Bakteriālo pārtikas infekciju ierosinātāji *Listeria monocytogenes* patogēnie celmi ir sastopami svaigās zīvīs mazumtirdzniecībā, tādēļ cilvēkiem, kuri uzturā lieto zivju produktus, jāizvairās lietot svaigas vai nepietiekami pagatavotas zivis, lai novērstu patogēno baktēriju uzņemšanu. Tāpat arī jāievēro labu virtuves higiēnu, apstrādājot svaigas zivis, turklāt jānovērš krusteniskā kontaminācija ar patogēnajām baktērijām.
2. Pārtikas infekciju ierosinātāju klātbūtne ezeru zīvīs netika konstatēta. Tādēļ īpaša uzmanība jāpievērš atbilstošiem higiēnas apstākļiem un uzglabāšanas temperatūras režīmam pēc zivju nozvejas, transportēšanas un pārstrādes laikā, pēc pārstrādes un mazumtirdzniecībā, tādejādi radot vidi, kādā bakteriālo pārtikas infekciju ierosinātāji nav spējīgi vairoties.
3. Higiēnas indikatormikroorganismu daudzums svaigās zīvīs neatspoguļo *Salmonella* spp., *Listeria* spp. un *Yersinia* spp. sastopamību, tādēļ zivju mikrobioloģiskā drošuma noteikšanai jānosaka patogēno baktēriju sastopamība.

INTRODUCTION

Topicality of the study

Fish is a nutrient-rich part of a healthful diet, and fish consumption is associated with potential health benefits. The various beneficial effects of fish have been attributed to high amount of fatty acids, protein, vitamins and minerals. However, along with the benefits provided from fish consumption, potential health risks of eating contaminated fish might be present. Fish and products thereof is responsible for an important proportion of foodborne illness and outbreaks in European Union (EFSA, 2016; EFSA, 2013).

One of the infectious agents associated with foodborne illness include bacteria. Psychrotrophic bacteria or psychrotrophs are able of growing at temperatures at or close to zero degree Celsius. Psychrotrophs are distributed in environment and in food. Pathogenic psychrotrophs such as *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* may grow in food under refrigeration and can pose a threat to public health. *Salmonella* is a pathogen that causes human foodborne illness salmonellosis. Salmonellosis is the second most commonly reported foodborne infection in European Union in 2015, followed by listeriosis caused by *Listeria monocytogenes*. Yersiniosis is the fifth most common foodborne disease in European Union in 2015 (EFSA, 2016).

The purpose of our study was to analyse hygiene indicators and psychrotrophic pathogens in fish from eutrophic lakes and in fish from retail in Latvia.

Objectives of the study

1. To analyse the hygiene indicators on gills, skin and in gut of fish from Lake Ķīšezers, Lake Usmas and Lake Sīvers.
2. To analyse the hygiene indicators of fish collected from retail.
3. To detect the prevalence of *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Yersinia* spp. in fish from lakes and at retail.
4. To identify the serogroups of *Listeria monocytogenes* and biotypes of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from fish.

Scientific novelty of the study

1. The comprehensive detection of hygiene indicators and foodborne pathogens in fresh fish from lakes and retail was completed for the first time in Latvia.
2. The serogroups of *Listeria monocytogenes* and biotypes of *Yersinia enterocolitica* strains isolated of fish lakes and at retail were analysed.
3. The present study complements the research database of microbial safety of food in Latvia.

Approbation of the results of research

1. Novoslavskij A., Terentjeva M., Eizenberga I., Valciņa O., Bartkevičs V., Bērziņš A. (2016) Major foodborne pathogens in fish and fish products: a review. *Annals of Microbiology*, Vol. 66, No. 1, p. 1-15
2. Terentjeva M., Eizenberga I., Novoslavskij A., Strazdiņa V., Valciņa O., Ošmjanā J., Bērziņš A. (2015) Prevalence of foodborne pathogens in freshwater fish in Latvia. *Journal of Food Protection*, Vol. 78, No. 11, p. 2093-2098
3. Terentjeva M., Eizenberga I., Novoslavskij A., Strazdiņa V., Valciņa O., Ošmjanā J., Bērziņš A. (2015) Bacterial microflora of freshwater fish originated from Usmas lake in Latvia. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, Vol. 4, No. 1, p. 74-77
4. Eizenberga I., Terentjeva M., Valciņa O., Novoslavskij A., Strazdiņa V., Ošmjanā J., Bērziņš A. (2015) Evaluation of microbiological quality of freshwater fish in Usma lake. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*, Vol. 15, No. 1, p. 65-73
5. Eizenberga I., Terentjeva M., Valciņa O., Novoslavskij A., Strazdiņa V., Ošmjanā J., Bērziņš A. (2015) Microbiological quality of raw fish at retail market in Latvia. In: *25th Congress of the Nordic Association of Agricultural Scientists „Nordic View to Sustainable Rural Development”*: proceedings, Riga, Latvia, p. 324-328
6. Strazdina V., Terentjeva M., Valcina O., Eizenberga I., Novoslavskij A., Osmjana J., Berzins A. (2015) The Microflora of Gills, Gut and Skin of European Eels (*Anguilla anguilla*) in Lakes of Latvia. *Journal of Food Science and Engineering*, Vol. 5, p. 130-136

8. Eizenberga I., Terentjeva M., Valciņa O., Novoslavskij A., Strazdiņa V., Ošmjana J., Bērziņš A. A comparison of *Listeria* spp. prevalence between the raw freshwater fish from lake and retail market in Latvia. In: *6th Congress of European Microbiologists FEMS 2015*, proceedings, Maastricht, The Netherlands, 7-11 June, 2015
9. Terentjeva M., Eizenberga I., Valciņa O., Novoslavskij A., Strazdiņa V., Ošmjana J., Bērziņš A. 2015. Microbiological quality of freshly caught freshwater fish from lakes in Latvia. In: *6th Congress of European Microbiologists FEMS 2015*, proceedings, Maastricht, The Netherlands, 7-11 June, 2015
10. Eizenberga I., Terentjeva M., Valciņa O., Novoslavskij A., Strazdiņa V., Ošmjana J., Bērziņš A. Evaluation of microbiological quality of freshwater fish in Usma lake. In: *8th International Conference on Biodiversity Research: Proceedings of the International Scientific Conference*, Daugavpils, Latvia, 28-30th April, 2015
11. Novoslavskij A., Terentjeva M., Eizenberga I., Ošmjana J., Valciņa O., Bērziņš A. Bacterial microflora of European eel (*Anguilla Anguilla*) originated from Daugavpils lake in Latvia. In: *10th Baltic Conference on Food Science and Technology "FoodBalt 2015"*. Proceedings of the International Scientific Conference, Kaunas, Lithuania, 21-22 May, 2015
12. Terentjeva M., Eizenberga I., Valciņa O., Novoslavskij A., Ošmjana J., Bērziņš A. Evaluation of bacterial microflora of European eel (*Anguilla anguilla*) skin samples from lakes in Latvia. In: *Conférence "Research and Practice in Veterinary Medicine 2014"*. Proceedings of the International Scientific Conference, Jelgava, Latvia, 27-28 November, 2014
13. Terentjeva M., Eizenberga I., Novoslavskij A., Strazdiņa V., Valciņa O., Ošmjana J., Bērziņš A. 2015. Bacterial microflora of freshwater fish originated from Usmas lake in Latvia. In: *10th International Scientific Conference „Biotechnology and Quality of Raw Materials and Foodstuffs“*, Stará Lesná, Slovakia, 28-30 January, 2015
14. Strazdiņa V., Terentjeva M., Valciņa O., Eizenberga I., Novoslavskij A., Ošmjana J., Bērziņš A. 2015. The microflora of gills, gut and skin of European eels (*Anguilla anguilla*) in lakes in Latvia. In: *6th International Conference Biosystems Engineering „BSE 2015“*, Tartu, Estonia, 7-8 May, 2015
15. Eizenberga I., Derman Y., Lindström M., Korkeala H., Bērziņš A. Prevalence of *Clostridium botulinum* in the Gulf of Riga. In: *9th Baltic Conference Food Science and Technology „Food for Consumer Well-*

Being FoodBalt 2014": Proceedings of the International Scientific Conference, Jelgava, Latvia, 8 – 9th May, 2014

16. Eizenberga I., Derman Y., Lindström M., Korkeala H., Bērziņš A. *Clostridium botulinum* detection in the sediments from the Gulf of Riga. In: *Laboratory diagnostics in Veterinary Medicine, Food and Environmental Safety: Proceedings of the International Scientific Conference*, Riga, Latvia, 5-6th September, 2013

MATERIAL AND METHODS

In this study microbial examination of fresh fish from lakes and from retail in Latvia was done during June 2014 and February 2015. Fish samples were investigated in laboratories of Institute of Food Safety, Animal Health and Environment „BIOR” and in laboratory of Institute of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia University of Agriculture.

Collection of fish samples

Fish samples analysed in this study were collected from lakes and at retail in Fish Pavilion in Riga Central Market. All samples obtained represents fish that were intended for human consumption. The sampling of fish was organised during the catch season of fish species.

Fish samplings were conducted in three lakes in Latvia - Lake Usmas in Kurzeme, Lake Sīvers in Latgale and Lake Ķīšezers in Riga. The lakes were selected to be representative of regions in Latvia, including the capital of Latvia. Besides, the lakes provide habitat for eel (*Anguilla anguilla*), are one of the largest lakes by surface area in Latvia, and are used for fishing.

From lakes, an amount of 59 fish samples were collected between June and October 2014. The following fish species have been collected – eel (*Anguilla anguilla* (n=30)), perch (*Perca fluviatilis* (n=21)) and silver bream (*Blicca bjoerkna* (n=8)).

During the study, fish of nine species comprising 135 individuals were sampled from retail. Fish samples at retail were collected multiple times during October and December in 2014. Fish species belonged to roach (*Rutilus rutilus* (n=28)), freshwater bream (*Abramis brama* (n=26)), silver bream (*Blicca bjoerkna* (n=25)), vimba bream (*Vimba vimba* (n=24)), perch (*Perca fluviatilis* (n=11)), crucian carp (*Carassius carassius* (n=10)), rudd (*Scardinius erythrophthalmus* (n=6)), tench (*Tinca tinca* (n=3)), and carp (*Cyprinus carpio*

(n=2)). Because of the limited number of tench and carp samples, they were ranked together under the „other fish species” (n=5).

During October in 2014 and February in 2015 multiplex PCR serogrouping was performed for the strains of *L. monocytogenes* isolated from fish. Meanwhile, for isolated *Y. enterocolitica* strains biotypes were determined.

Sampling of eel form lakes was carried out using trap. In the same day, eel samples were transported to the laboratory in a container filled with water from lake. In laboratory of Institute „BIOR”, eels were killed by a sharp blow on the head. Meanwhile, perch and silver bream samples from lakes were collected using net, placed into sterile plastic bag, and transported to the laboratory in an insulated box with a cool pack. Fish from retail were collected in plastic bags and transported to the laboratory in an insulated box with a cool pack. Samples were processed in the same day of collection.

The preparation of the samples of fish gills, skin, gut and pooled samples

For microbial analysis, the various samples of fish body tissue were collected. The samples of fish gills, skin and gut, as well as pooled sample of each fish was prepared in the laboratory of Institute of food safety, animal health and environment „BIOR”.

For perch and silver bream collected from lakes the gill samples from each fish were removed aseptically with sterile forceps and scissors. An amount not less than 1 g of gill was investigated. For eel, gill samples were collected with swab moisturized with 0.1% peptone water (Biolife Italiana S.r.l, Italy) by covering surface of gill.

The gut samples from perch and silver bream from lakes were collected by opening with the scalpel abdominal cavity of fish, and aseptically separating gut using sterile scalpel and scissors. Not less than 1 g of gut was sampled form each fish. For eel, abdominal cavity and gut was opened aseptically. Samples of ell gut were collected with swab moisturized with 0.1% peptone water by covering the lumen of gut. Skin samples of each fish from lakes and market were collected with abrasive sponge moisturized with 0.1% peptone water by covering a 25 cm² area of fish skin.

For bacteriological analysis serial 10-fold dilutions of initial gill, skin and gut samples were prepared. Fish skin, gill and gut samples of each fish were investigated separately for total bacterial count, *Enterobacteriaceae*, fecal coliforms, psychrotrophic bacteria count or the presence of *E. coli*.

A pooled sample of 25 ± 1 g of skin, musculature and intestines of each fish was used for *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Yersinia* spp. detection. Samples were collected aseptically using sterile forceps and scalpel, and placed into a sterile stomacher bag.

Detection of hygiene indicators of fish

In this study in fish from lakes total bacterial count, *Enterobacteriaceae*, fecal coliforms and psychrotrophs were determined. Meanwhile, total bacterial count, *Enterobacteriaceae* and the prevalence of *E. coli* were analysed in fish collected from market.

Total bacterial count and *Enterobacteriaceae* were detected according to the ISO 4833 (Anonymous, 2003a) and ISO 21528-2 (Anonymous, 2004), respectively. Briefly, 1 ml of each decimal dilution were transferred into duplicate plates of Plate Count Agar (PCA, Biolife) for detection of TBC and into Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG, Biolife) for detection of *Enterobacteriaceae*. Inoculated PCA and VRBG plates were incubated at 30°C for 72 h and 37°C for 24 h, respectively. Further, enumeration of colony forming units was done.

For detection and enumeration of fecal coliform the method of ISO 4832 was applied (Anonymous, 1991). An amount of 1 ml of each decimal dilution were transferred into duplicate plates, overlaid with Violet Red Bile Lactose Agar (VRBLA), and incubated at $44\pm1^{\circ}\text{C}$ for 24 h, followed by identification and manual counting of typical colonies.

Psychrotrophic bacteria were determined according to ISO 17410 (Anonymous, 2001). An amount of 1 ml of each dilution transferred into duplicate plates of Plate Count Agar (PCA, Biolife Italiana S.r.l, Milan, Italy). For psychrotrophic bacteria enumeration, the PCA plates were incubated at 21°C for 3 to 5 days. PCA plates were examined to evaluate bacterial colonies morphology, followed by manual counting of colonies according to the ISO requirements.

The detection of *E. coli* was performed according to ISO 7251 (Anonymous, 2005). An amount of 1 ml from each decimal dilution (from 10^{-1} to 10^{-5}) of the sample inoculated into 10 ml lauryl sulphate broth (Biolife). The tubes were incubated at 37°C and after 24 h examined for gas production. Gas-negative tubes were re-incubated for an additional 24 h and reactions examined again. One 10- μl loopful of material from each tube with positive gas formation was inoculated into a tube containing 10 ml of *Escherichia coli* (EC) broth (Biolife), incubated at 44°C for 24-48 h and examined for the presence of gas production. After evaluation, gas positive EC broth tubes were transferred in

tripot water (TW, Biolife) and further incubated at 44 °C for 48 h. Finally, the indole test was performed for the presence of *E. coli*.

Detection of *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Yersinia* spp.

In our study the presence of *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Yersinia* spp. in fish samples from lakes and market was analysed. Samples for detection of *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* and *Yersinia* spp. were pooled samples of skin, musculature and intestinal tract of each fish. Samples were collected aseptically using sterile forceps and scalpel, and placed into a sterile stomacher bag.

The detection of *Salmonella* was done according to ISO 6579 (Anonymous, 2002). A total of 25 g of each sample were homogenized with 225 ml of buffered peptone water (Biolife) in stomacher for 60 s and suspension was incubated at 37 °C for 18 h. A 10 µl loopful of pre-enrichment broth after incubation was transferred into Rappaport Vassiliadis broth (RV, Biolife) and Mueller-Kaufmann tetrathionate novobiocin broth (MKT_{Tn}, Biolife). The RV broth was incubated at 41.5 °C for 24 h, while MKT_{Tn} broth at 37 °C for 24 h. An amount of 0.1 ml of incubated material from each broth was plated to xylose lysine desoxycholate agar (XLD, Biolife) and brilliant green agar (BGA, Biolife), incubated at 37 °C for 24 h and examined for the presence of presumptive colonies.

For detection of *Yersinia* spp. an amount of 25 g of sample was transferred into peptone sorbitol bile salt broth and incubated 24 h at 22 °C (Anonymous, 2003b). After incubation, 0.1 ml of suspension was plated out onto CIN agar (Biolife) with and without treatment with 0.5% KOH prior to plating. CIN plates were incubated at 30 °C for 24-48 h and examined for the presence of *Yersinia* colonies. Presumptive colonies were confirmed with API 20E kit (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), according to the manufacturer's instructions. All *Y. enterocolitica* biotypes were determined according to Wauters et al. (1987).

For *L. monocytogenes* detection, an amount of 25 g of sample was added to 225 ml Half-Fraser broth (HF, Biolife) followed by homogenization for 60 s in a stomacher and incubation for 24 h at 30 °C according to ISO 11290-1 (Anonymous, 1996). Thereafter 0.1 ml aliquots of the HF broth were transferred to 9 ml of Fraser broth (Biolife) and incubated at 37°C for 48 h. An amount of 0.1 ml of both, Half-Fraser and Fraser enrichments were streaked onto Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA, Biolife) and Oxford agar (Biolife). After an incubation period of 24-48 h at 37 °C, the selective agar plates were examined for the presence of the characteristic colonies of *L. monocytogenes* - blue-green colonies surrounded by an opaque

halo on ALOA agar. Suspicious colonies on ALOA agar were Gram stained, tested for β -haemolysis, motility and catalase activity followed by biochemical identification with the API *Listeria* system (BioMérieux, Mancy l'Etoile, France), according to the manufacturer's instructions.

Detection of *L. monocytogenes* serogroups by multiplex PCR

For the strains of *L. monocytogenes* isolated from fish PCR serogrouping was performed. A multiplex PCR and PCR for detection of *flaA* gene encoding flagellar protein were used to identify *L. monocytogenes* serogroups (Kérouanton et al. 2010, Doumith et al. 2004). PCR was carried out in 25 μ l amplification mix, containing 1 μ l of tested DNA, 15.6 μ l RNase free water (Qiagen, Germany), 1X fast-start Buffer without MgCl₂, 2 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, Lithuania), 0.2 mM dNTP mix (Qiagen, Germany), 1 U recombinant Taq polymerase (Thermo Scientific, Lithuania) and 0.4 μ M of each primer: *lmo0737*-F, *lmo0737*-R, *lmo1118*-F, *lmo1118*-R, ORF2110-F, ORF2110-R, ORF2819-F, ORF2819-R, 0.1 μ M of *prs*-F, *prs*-R, and 0.2 μ M of *lip*-F, and *lip*-R (Table 1). For detection of *flaA* gene a master mix consisted of 2 μ l tested DNA, 12.1 μ l RNase free water (Qiagen, France), 1X fast-start Buffer without MgCl₂, 4 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, Lithuania), 0.2 mM dNTP mix (Qiagen, France), 1 U of recombinant Taq polymerase (Thermo Scientific, Lithuania) and 0.8 μ M of each primer: *flaA*-F and *flaA*-R (Table 1). Multiplex PCR and PCR for detection of *flaA* gene was performed in a thermo cycler (Applied Biosystems) with an initial denaturation step of DNA at 94 °C for 3 min continued by 40 cycles at 94 °C for 30 s, 40 s at 61 °C, and 60 s at 72 °C followed by one final extension at 72 °C for 7 min. Results of amplification of PCR products were read by capillary electrophoresis system Qiaxcel Advanced (Qiagen, Hilden, Germany).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Microsoft Excel 2010. To compare the count of *Enterobacteriaceae*, fecal coliforms, psychrotrophs and total bacterial count the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer test was performed on the CFU/g or CFU/cm² data. p-values < 0.05 were considered significant. *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* data was subjected to the chi-square test.

RESULTS AND DISCUSSION

The microbial quality of fish samples from lakes and at retail in Latvia in this study was described by indicator microorganism detection, including total bacterial count, *Enterobacteriaceae*, fecal coliforms, psychrotrophs, and *E. coli*. Also, potential health risk for humans represented by pathogenic bacterial contamination was proved by detection of *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Yersinia* spp.

Hygiene indicators of fish from lakes

Overall, total bacterial count across perch (*Perca fluviatilis*), silver bream (*Blicca bjoerkna*) and eel (*Anguilla anguilla*) from Lake Kīšezers, Lake Usmas and Lake Sīvers ranged from $0.00 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ to $8.71 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$. Total bacterial count on gills, skin and in gut of perch, silver bream and eel are shown in table 1.

Total bacterial count on gills of perch, silver bream and eel ranged from $0.60 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ to $8.40 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$. An average total bacterial count on gills was the highest in perch ($7.21 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$), but the lowest in eel ($4.04 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$). Total bacterial count on skin ranged from 1.04 to $8.71 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$. An average count on skin the highest was in silver bream ($7.72 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$), but the lowest in eel ($4.14 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$). Total bacterial count in gut of perch, silver bream and eel ranged from 0.00 to $8.28 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$. An average total bacterial count the highest was in gut of silver bream ($7.31 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$), but the lowest in gut of eel ($3.38 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$).

Differences in the levels of microbial contamination among various fish species may be related to ecology of fish, feeding habits, migration, and microbial contamination of aquatic environment. Mudarris and Austin (1988) and Al-Harbi and Uddin (2005) reported the results of total bacterial count in fish. Mudarris and Austin (1988) examined the gills of turbot (*Scophthalmus maximus*) from the fish farm. Authors reported that total bacterial count on gills of turbot was $5.84 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$, and this count was lower than in our study. Al-Harbi and Uddin (2005) reported that total bacterial count ranged from 7.44 to $8.00 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ in gut, and from 5.93 to $6.32 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ in gills of tilapia (*Oreochromis niloticus*), which coincides with our results according to contamination of perch and silver bream. Al-Harbi and Uddin (2005) suggested that environmental conditions and types of aquaculture can contribute to the microbial contamination of fish.

Enterobacteriaceae count ranged from 0.00 to $7.67 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ on gills, skin and in gut of perch, silver bream and eel from lakes (table 2).

Enterobacteriaceae on gills of perch, silver bream and eel ranged from 0.00 to $7.67 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$. The mean *Enterobacteriaceae* count was the highest on gills of silver bream ($4.76 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$), while the lowest on gills of eel ($2.71 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$).

Enterobacteriaceae count ranged from 1.00 to $7.30 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ on skin of fish from lakes. The mean *Enterobacteriaceae* count the highest was on skin of perch, while the lowest on skin of eel, 5.81 and $1.87 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$.

In gut of fish from lakes *Enterobacteriaceae* count ranged from 0.00 to $7.52 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$. The highest *Enterobacteriaceae* mean count was in gut of perch ($4.86 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$), but the lowest in gut of eel ($1.57 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$). *Enterobacteriaceae* count on skin and in gut of eel was significantly lower ($p<0.05$) than of perch and silver bream. Also, González et al. (1999) reported low *Enterobacteriaceae* count in fish from cold and unpolluted waters.

Fecal coliform count on gills, skin and in gut of perch, silver bream and eel from lakes is shown in table 3.

Fecal coliforms on gills of perch, silver bream and eel ranged from 0.00 to $5.11 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$. On gills the highest fecal coliform average count was in perch ($3.51 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$), while the lowest in eel ($1.26 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$).

The number of fecal coliforms on skin ranged from 0.00 to $6.74 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$. Fecal coliform average count the highest was on skin of silver bream ($5.29 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$), but the lowest on skin of eel ($0.64 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$). Meanwhile, in gut fecal coliform count ranged from 0.00 to $6.80 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$, but mean count the highest was in perch ($4.07 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$), and the lowest in eel ($0.25 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$).

Significant differences ($p<0.05$) was detected between fecal coliform count on skin, gills an in gut of perch, also on gills and skin of silver bream, and on gills and in gut of eel.

The contamination of fish with fecal coliforms might be related with contamination of aquatic environment. Also, other authors reported contamination with fecal coliforms on gills, skin and in gut of fish (Geldreich, Clark, 1966; El-Shafai et al., 2004). El-Shafai et al. (2004) detected fecal coliforms on gills of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in aquaculture ponds. Authors suggested that contamination might be related to the morphology of gills, and volume of water flow over the gills. Geldreich and Clark (1966) reported that fecal coliform count in gut ranged from $1.37 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ of bluegill (*Lepomis macrochirus*) to $6.04 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in The Little Miami River in USA at temperatures ranging from 13 to 18 °C. Authors concluded that contamination with fecal coliforms of fish might be affected by feeding habits of fish and water pollution.

Psychrotroph count on gills of perch, silver bream and eel ranged from 1.15 to $7.64 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$ (table 4). Psychrotroph mean count on gills the highest was of perch ($5.60 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$), while the lowest of eel ($3.97 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$). Psychrotrophs count on skin ranged from 4.34 to $5.40 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$. The highest psychrotroph mean count was detected on skin of perch, but the lowest on skin of eel, 6.57 and $5.58 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$, respectively. Meanwhile, in gut psychrotroph count ranged from 1.00 to $7.43 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$, and psychrotroph average count the highest was in silver bream ($6.03 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$), but the lowest in eel ($4.14 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$).

Psychrotroph count on gills and in gut of eel was significantly lower ($p<0.05$) than on gills of perch, and in gut of perch and silver bream. Contrary to our study, Scherer et al. (2006) found lower psychrotroph count ($3.00 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$) on skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) from fish farm. High contamination level of fish by psychrotrophs might be related to low ambient temperature that contributed to psychrotroph multiplication (Dalgaard, 2003). Carrascosa et al. (2015) studied microbial indicators of gilt-head bream caught in temperate waters around Canary Islands. Authors revealed that microbial contamination the highest was on gills, followed by skin, while muscle tissues contain the least numbers of microbes.

Also, other authors studied microbial contamination of various tissues of fish (Mandal et al., 2009; Balasubramanian et al., 1992). Mandal et al. (2009) investigated microbial contamination of gills, gut and muscles of fish. Authors found that total bacterial count was the highest in gut ($4.95 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), while fecal coliforms the highest was on gills ($2.48 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$). Huss (1994) suggested that fecal coliforms were not an indigenous microbiota in gut of fish. Presence of fecal coliforms in gut of fish might be associated with poor water quality. Balasubramanian et al. (1992) reported results on microbial contamination in several fish species obtained from fish farm. Authors revealed that microbial contamination the highest was in gut, followed by skin, gills, and muscles. The results of this study showed higher microbial contamination level of detritivorous fish feeding on non-living organic food mainly near the bottom of water body. Meanwhile, microbial contamination was lower of plankton feeder fish feeding in pelagic zone of water body.

Hygiene indicators of fish from Lake Kīšezers, Lake Usmas and Lake Sīvers

Total bacterial count on gills, skin and in gut of perch, silver bream and eel from Lake Kīšezers, Lake Usmas and Lake Sīvers was distinct (Table 5). Total bacterial mean counts the highest was on gills of silver bream

($8.15 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$) from Lake Sivers, but the lowest on gills of eel ($2.40 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$) from Lake Usmas. On skin total bacterial count ranged from 1.04 to $8.71 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$. Total bacterial mean counts the highest was on skin of silver bream ($7.87 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$) from Lake Usmas, while the lowest on skin of eel ($2.51 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$) from Lake Usmas. Total bacterial mean count in gut the highest was of silver bream from Lake Sivers, but the lowest of eel from Lake Usmas (7.47 and $2.16 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$).

Table 5

Total bacterial count of perch (*Perca fluviatilis*), silver bream (*Blicca bjoerkna*) and eel (*Anguilla anguilla*) in Lake Kīsezers, Lake Usmas and Lake Sivers

Lake	Fish species	No. of samples	Gills		Skin		Gut	
			Mean±SD $\log_{10} \text{CFU g}^{-1}$	Range (min-max) $\log_{10} \text{CFU g}^{-1}$	Mean±SD $\log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$	Range (min-max) $\log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$	Mean±SD $\log_{10} \text{CFU g}^{-1}$	Range (min-max) $\log_{10} \text{CFU g}^{-1}$
Kīsezers	perch	4	5.08 ± 0.90	4.11-6.28	5.61 ± 0.21	5.34-5.84	6.31 ± 1.53	4.38-7.84
	eel	10	3.86 ± 2.69^a	0.60-6.65	4.88 ± 2.17^c	2.20-7.38	3.22 ± 1.82^f	0.00-5.90
Usmas	perch	13	6.32 ± 1.18	3.78-8.00	7.80 ± 0.43	7.04-8.51	6.67 ± 1.04	4.62-7.96
	silver bream	5	6.64 ± 1.18	5.41-8.08	7.87 ± 0.69	6.89-8.61	7.21 ± 0.53	6.58-8.28
	eel	11	2.40 ± 0.67^b	1.26-3.76	2.51 ± 0.85^d	1.04-3.93	2.16 ± 0.44^f	1.45-2.78
Sivers	perch	4	6.51 ± 1.19	5.46-7.68	6.99 ± 0.21	6.81-7.30	6.39 ± 1.28	4.48-7.15
	silver bream	3	8.15 ± 0.32	7.79-8.40	7.47 ± 1.09	6.69-8.71	7.47 ± 0.74	4.95-5.83
	eel	9	6.25 ± 0.43	5.53-6.88	5.32 ± 0.53^e	4.32-6.04	5.05 ± 1.32	3.30-6.84

^a Total bacterial count of gills of eel in Kīsezers was significantly lower ($p<0.05$) than of gills of perch and eel in Lake Sivers, and of perch and silver bream in Lake Usmas

^b Total bacterial count of gills of eel in Lake Usmas was significantly lower ($p<0.05$) than of gills of perch and silver bream in Lake Usmas, of perch and eel in Lake Sivers, and of eel in Kīsezers

^c Total bacterial count on skin of eel in Kīsezers was significantly lower ($p<0.05$) than on skin of silver bream in Lake Sivers, and eel and silver bream in Lake Usmas

^d Total bacterial count on skin of eel in Lake Usmas was significantly lower ($p<0.05$) than of perch, silver bream and eel in Lake Sivers, of perch and silver bream in Lake Usmas, and of perch and eel in Kīsezers

^e Total bacterial count on skin of eel in Lake Sivers was significantly lower ($p<0.05$) than of perch and silver bream in Lake Usmas

^f Total bacterial count of gut of eel in Lake Usmas and in Kīsezers was significantly lower ($p<0.05$) than of perch, silver bream and eel in Lake Sivers, of perch and silver bream in Lake Usmas, and of perch in Kīsezers

Enterobacteriaceae mean count the highest was on gills ($5.26 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$) and in gut ($6.32 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$) of silver bream from Lake Sivers, but on skin of perch ($6.85 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$) from Lake Usmas (table 6).

Table 6

Enterobacteriaceae count of perch (*Perca fluviatilis*), silver bream (*Blicca bjoerkna*) and eel (*Anguilla anguilla*) in Lake Kīšezers, Lake Usmas and Lake Sīvers

Lake	Fish species	No. of samples	Gills		Skin		Gut	
			Mean±SD \log_{10} CFU g ⁻¹	Range (min-max) \log_{10} CFU g ⁻¹	Mean±SD \log_{10} CFU cm ⁻²	Range (min-max) \log_{10} CFU cm ⁻²	Mean±SD \log_{10} CFU g ⁻¹	Range (min-max) \log_{10} CFU g ⁻¹
Kīšezers	perch	4	1.65±1.30 ^a	1.00-3.60	2.46±1.68 ^b	1.00-4.04	1.96±2.02	0.85-4.99
	eel	10	2.22±1.63 ^a	0.00-3.90	2.27±2.16 ^b	0.00-4.86	1.27±1.40	0.00-3.78
Usmas	perch	13	4.63±1.80	0.30-7.36	6.85±0.45	5.64-7.30	5.56±1.33 ^d	3.25-7.52
	silver bream	5	4.46±2.05	2.46-7.67	5.74±0.43	5.15-6.17	5.68±0.91 ^d	4.74-6.86
	eel	11	1.32±0.53 ^a	0.48-2.23	0.41±0.40 ^b	0.00-1.08	1.21±0.80	0.00-1.92
Sīvers	perch	4	5.02±0.63	4.54-5.94	5.78±1.03	4.79-6.89	5.49±1.78 ^e	3.43-7.11
	silver bream	3	5.26±0.50	4.95-5.83	4.80±1.11	3.90-6.04	6.32±1.11 ^e	5.04-6.97
	eel	9	4.95±0.64	4.08-6.00	3.22±0.53 ^c	2.34-4.15	2.33±1.19	0.00-4.20

^a Enterobacteriaceae count of gills of perch and eel in Kīšezers and of eel in Lake Usmas was significantly lower ($p<0.05$) than of gills of perch, silver bream and eel in Lake Sīvers, and of gills of silver bream in Lake Usmas

^b Enterobacteriaceae count on skin of eel in Lake Usmas, and on skin of eel and perch in Lake Kīšezers was significantly lower ($p<0.05$) than on skin of perch, silver bream in Lake Usmas, and of perch in Lake Sīvers

^c Enterobacteriaceae count on skin of eel in Lake Sīvers was significantly lower ($p<0.05$) than on skin of perch and silver bream in Lake Usmas, and of perch in Lake Sīvers, and significantly higher ($p<0.05$) than on skin of eel in Lake Usmas

^d Enterobacteriaceae count of gut of perch and silver bream in Lake Usmas was significantly higher ($p<0.05$) than of eel in Lake Usmas, and of perch and eel in Kīšezers and in Lake Sīvers

^e Enterobacteriaceae count of gut of perch and silver bream in Lake Sīvers was significantly higher ($p<0.05$) than of eel in Lake Sīvers and Lake Usmas, and of perch and eel in Kīšezers

Meanwhile, Enterobacteriaceae mean count the lowest was on gills, skin and in gut of eel from Lake Usmas ($1.32 \log_{10}$ CFU g⁻¹, $0.41 \log_{10}$ CFU cm⁻² and $1.21 \log_{10}$ CFU g⁻¹, respectively).

Fecal coliform average count on gills the highest was of perch from Lake Kīšezers, but the lowest on gills of eel from Lake Usmas (4.19 and $0.54 \log_{10}$ CFU g⁻¹, respectively).

Fecal coliform count of perch, silver bream and eel from Lake Kīšezers, Lake Usmas and Lake Sīvers is shown in table 7.

Table 7

Fecal coliform count of perch (*Perca fluviatilis*), silver bream (*Blicca bjoerkna*) and eel (*Anguilla anguilla*) in Lake Kīšezers, Lake Usmas and Lake Sīvers

Lake	Fish species	No. of samples	Gills		Skin		Gut	
			Mean±SD \log_{10} CFU g ⁻¹	Range (min-max) \log_{10} CFU g ⁻¹	Mean±SD \log_{10} CFU cm ⁻²	Range (min-max) \log_{10} CFU cm ⁻²	Mean±SD \log_{10} CFU g ⁻¹	Range (min-max) \log_{10} CFU g ⁻¹
Kīšezers	perch	4	4.19±0.15 ^a	4.04-4.40	ND	ND	ND	ND
	eel	10	0.86±0.87	0.00-2.04	1.27±1.18	0.00-2.96	0.22±0.50	0.00-1.11
Usmas	perch	13	3.31±1.38 ^b	0.00-5.11	5.16±1.17 ^c	4.00-6.74	4.07±1.70 ^d	0.00-6.80
	silver bream	5	3.32±0.67 ^b	2.43-4.20	5.29±0.52 ^c	4.76-6.04	3.96±0.91 ^d	3.04-5.20
	eel	11	0.54±0.71	0.00-1.92	0.34±0.59	0.00-1.74	0.00±0.00	0.00-0.00
Sīvers	eel	9	2.37±1.36 ^b	0.00-3.68	0.67±0.59	0.00-1.60	0.56±1.17	0.00-3.23

ND – No data, inappropriate sample size

^a Fecal coliform count of gills of perch in Kīšezers was significantly higher (p<0.05) than of perch, silver bream and eel in Lake Usmas, and of eel in Lake Sīvers

^b Fecal coliform count of gills of eel in Lake Sīvers and of perch and silver bream of Lake Usmas was significantly higher (p<0.05) than of eel in Kīšezers and Lake Usmas

^c Fecal coliform count on skin of perch and silver bream in Lake Usmas was significantly higher (p<0.05) than of eel in Kīšezers, Lake Usmas, and Lake Sīvers

^d Fecal coliform count of gut of perch and silver bream in Lake Usmas was significantly higher (p<0.05) than of eel in Kīšezers, Lake Usmas, and Lake Sīvers

Fecal coliform average count on skin was the highest of silver bream from Lake Usmas, but the lowest on eel from Lake Usmas (5.29 and $0.34 \log_{10}$ CFU cm⁻², respectively). Fecal coliform average count in gut was the highest of perch ($4.07 \log_{10}$ CFU g⁻¹), but the lowest of eel ($0.00 \log_{10}$ CFU g⁻¹) from Lake Usmas.

Significant differences (p<0.05) in contamination of gills by fecal coliforms between eel from Lake Sīvers, Lake Usmas and perch, silver bream from Lake Usmas, and eel, perch from Lake Kīšezers. Fecal coliform count on skin of perch and silver bream from Lake Usmas was significantly higher (p<0.05) than of eel from lakes.

Psychrotroph mean count on gills the highest was detected of perch ($5.71 \log_{10}$ CFU g⁻¹) from Lake Usmas, but the lowest of eel from Lake Usmas ($2.24 \log_{10}$ CFU g⁻¹). Psychrotroph count of perch, silver bream and eel from Lake Kīšezers, Lake Usmas and Lake Sīvers is shown in table 8.

Table 8

Psychrotrophic bacteria count of perch (*Perca fluviatilis*), silver bream (*Blicca bjoerkna*) and eel (*Anguilla anguilla*) in Lake Kīšezers, Lake Usmas and Lake Sivers

Lake	Fish species	No. of samples	Gills		Skin		Gut	
			Mean±SD \log_{10} CFU g ⁻¹	Range (min-max) \log_{10} CFU g ⁻¹	Mean±SD \log_{10} CFU cm ⁻²	Range (min-max) \log_{10} CFU cm ⁻²	Mean±SD \log_{10} CFU g ⁻¹	Range (min-max) \log_{10} CFU g ⁻¹
Kīšezers	perch	4	ND	ND	ND	ND	4.84±0.54	4.28-5.52
	eel	10	5.00±0.00 ^a	5.00-5.00	5.00±0.00	5.00-5.00	3.74±1.60	1.00-5.00
Usmas	perch	13	5.71±1.12	3.30-7.64	6.69±0.69 ^c	5.50-7.61	5.78±1.01 ^d	4.50-7.43
	silver bream	5	5.62±0.92	4.58-6.79	6.42±0.43 ^c	5.87-6.91	6.27±0.51 ^d	5.56-6.81
	eel	11	2.24±0.67 ^b	1.51-3.82	6.22±0.41 ^c	5.51-6.91	2.76±0.92	1.73-5.08
Sivers	perch	4	5.26±0.10	5.15-5.39	ND	ND	4.84±0.54	4.28-5.52
	silver bream	3	5.13±0.25	4.95-5.30	5.50±0.14	5.40-5.60	5.45±0.41	5.16-5.74
	eel	9	5.51±0.59	4.26-6.15	5.12±0.48	4.34-5.66	6.04±0.83 ^d	4.58-6.88

ND – No data, inappropriate sample size

^a Psychrotrophic bacteria count of gills of eel in Lake Kīšezers was significantly lower (p<0.05) than of perch and eel in Lake Sivers, and of perch in Lake Usmas

^b Psychrotrophic bacteria count of gills of eel in Lake Usmas was significantly lower (p<0.05) than of perch and silver bream in Lake Usmas, and of perch and eel in Lake Kīšezers and Lake Sivers, and of silver bream in Lake Sivers

^c Psychrotrophic bacteria count on skin of perch, silver bream and eel in Lake Usmas was significantly higher (p<0.05) than of silver bream and eel in Lake Sivers, and of eel in Lake Kīšezers

^d Psychrotrophic bacteria count of gut of perch and silver bream in Lake Usmas, and of eel in Lake Sivers was significantly higher (p<0.05) than of eel in Lake Kīšezers and in Lake Usmas, and of perch in Lake Sivers

On skin the highest psychrotroph mean count was of perch (6.69 \log_{10} CFU cm⁻²) from Lake Usmas, while the lowest of eel (5.00 \log_{10} CFU cm⁻²) from Lake Kīšezers. In gut the highest psychrotroph mean count was of silver bream, but the lowest of eel from Lake Usmas (6.27 and 2.76 \log_{10} CFU g⁻¹, respectively).

Hygiene indicators of fish at retail

Total bacterial count ranged from 3.00 to 8.65 \log_{10} CFU cm⁻² on skin of various fish species at retail (table 9). The highest total bacterial mean count was detected of rudd (7.51 \log_{10} CFU cm⁻²), while the lowest of other fish

species ($4.61 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$). Significant differences ($p<0.05$) on total bacterial count were detected between silver bream, rudd and roach, freshwater bream, vimba bream.

A study by Svanevik et al. (2015) was conducted to investigate the microbial quality of fish in processing plants and on fishing vessels. The fish samples selected for this study belonged to various fish species – Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*), Atlantic herring (*Clupea harengus*), capelin (*Mallotus villosus*), blue whiting (*Micromesistius poutassou*). Out of 510 fish samples tested, total bacterial count ranged from <3.00 to $7.4 \log_{10} \text{CFU g}^{-1}$, and these results are lower than in our study on fish at retail.

Enterobacteriaceae count on fish at retail ranged from 0.00 to $5.20 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$. *Enterobacteriaceae* mean count the highest was on skin of crucian carp ($3.66 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$), but the lowest on other fish species ($1.40 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$). Significant difference ($p<0.05$) was detected between *Enterobacteriaceae* count of vimba bream, roach and crucian carp.

Da Silva and Gibbs studied the microbiology of cold-smoked fish cold stored in retail market of Portugal. Authors reported that *Enterobacteriaceae* count of fish might be related to the technological processes used at the early processing stage, contamination during smoking process or conditions and temperature fluctuations in the retail. *Enterobacteriaceae* count on fish at retail is shown in table 10.

The occurrence of *E. coli* ranged from 17.7 to 53.6% on skin of fish at retail (table 11). The highest prevalence was detected in roach (53.6%, 15 from 28 samples). The lowest prevalence of *E. coli* was in vimba bream (12.5%, 3 from 24 samples). *E. coli* was not detected in any of other fish species.

Stollewerk et al. (2014) used the presence of *E. coli* as microbiological quality indicators of fish based food products. Among several microbiological criteria, *E. coli* was used as spoilage indicator bacteria. Authors demonstrated that *E. coli* was not present in fish products during storage period for 27 days at temperature 4 and 8 °C. Compared to our study, lower *E. coli* prevalence was found by Elsaify et al. (2015). These authors observed that *E. coli* was present in 20% (3 of 15) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) samples after 60 days growth in ponds experimentally treated with chicken manure.

Recently, *E. coli* prevalence was analysed in fish and products thereof (Kim et al., 2017, Svanevik et al., 2015; Leisner et al., 2014, Van et al., 2008). *E. coli* was isolated from fish samples collected from market in India and Costa Rica (Thampuran et al., 2005; Marín et al., 2009). Costa (2013) suggested that microbial contamination in coastal waters might spread also on fish. *E. coli* occurrence and fish products may pose a threat to public health because *E. coli* pathogenic strains could be present. Also, the presence of non-pathogenic

E. coli strains requires attention as it could indicate to fecal contamination and occurrence of other pathogens.

Prevalence of foodborne pathogens *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Yersinia* spp. in fish

L. monocytogenes was isolated from 26% (35 of 135) of the fish samples collected at retail market. *Y. enterocolitica* was detected in 33% (45 of 135) of fish samples analysed. Meanwhile, *Salmonella* spp. was not found in any of fish samples from retail (table 12).

From fish samples analysed, the highest prevalence of *L. monocytogenes* (40%) was found in crucian carp (in 4 of 10 samples), while rudd (6 samples) and other fish species (5 samples) were *L. monocytogenes* negative. *Y. enterocolitica* more often was detected in other fish species (60%, in 3 of 5 samples) and in silver bream (56%, in 14 of 25 samples). Meanwhile, *Y. enterocolitica* was not found in crucian carp (10 samples) and rudd (6 samples).

Gaertner et al. (2008) suggested that *Salmonella* spp. usually has not been found in the composition of fish microbiota. However, several authors detected the presence of *Salmonella* spp. in fish (Onmaz et. al., 2015; Yang et al., 2015; Raufu et al., 2014; Busani et al., 2005; Davies et al., 2001). Recent study by Onmaz et al. (2015) revealed that prevalence of *Salmonella* spp. was 10 % (3 of 30 samples) in European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and 6% (2 of 35 samples) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) collected from fish market in Turkey. Yang et al. (2015) characterized the prevalence of *Salmonella* in fresh fish from market in China and showed that *Salmonella* spp. more often was detected in freshwater fish (18.6%, 43/231) compared to saltwater fish (12.2%, 24/197). Contrary, Davies et al. (2001) did not find *Salmonella* spp. in any of fish samples from retail enterprises in European countries, and this result is in agreement with our study.

The presence of *Salmonella* spp. in fish might be related to poor hygiene. *Salmonella* spp. might be spread in fish with contaminated water, surfaces and tools during any stage of transportation, storage and trade.

The results of our study showed that prevalence of *L. monocytogenes* in fish (26%, 35/135) at retail was considerably higher than in other European countries. The prevalence of *L. monocytogenes* in fresh fish samples from market in Northern Greece was 1% (Soullos et al., 2007). Meanwhile in fresh fish at processing plants *L. monocytogenes* prevalence was reported 1.3% (Svanevik et al., 2015) and 13.5% (Gudbjörnsdóttir et al., 2004), but 14.6% in rainbow trouts from fish farm in Finland (Miettinen, Wirtanen, 2005). Latorre

et al. (2007) examined fish and products thereof in Italy during years 1993 to 2004, and concluded that *L. monocytogenes* was absent in 154 samples analysed.

A study by Hoffman et al. (2003) was conducted to investigate the prevalence of *L. monocytogenes* in environmental samples (n=512) and in fresh fish samples (n=312) from two fish processing plants. Fish samples for this study belonged to whitefish from lakes, salmon from fish farms in Norway and Chile, wild salmons from west coast of USA, and other fish. Authors revealed that 22.5% (115/512) of environmental samples and 14.7% (46/312) of fish samples were positive for *L. monocytogenes*. Also, it was observed that *L. monocytogenes* subtypes in environmental samples from processing plants and in fresh fish were different. Based on this investigation, it was concluded that various sources might lead to contamination with *L. monocytogenes*.

In our study *Y. enterocolitica* prevalence in fish was 33% (45 of 135 samples). Previous study indicates that the prevalence of *Y. enterocolitica* was lower (9%, 7/76) in fresh fish from markets in France, Great Britain and Portugal (Davies et al. 2001).

The determination of biotypes for *Y. enterocolitica* isolates obtained from fish samples was done using biochemical tests described by Wauters et al. (1987). All of *Y. enterocolitica* strains tested (n=45) belonged to biotype 1A, what considered to be non-pathogenic (table 13).

For *L. monocytogenes* strains (n=19) isolated from fish samples at retail were determined serogroups by polymerase chain reaction (PCR). Four *L. monocytogenes* serogroups were detected among the isolates with 63.1% (12/19) belonging to serogroup IIa, 26.3% (12/19) to serogroup IIc, 5.3% (1/19) to serogroup IIb, and 5.3% (1/19) belonging to serogroup IVb (Figure 1). Serogroups IIa, IIb and IVb account for most of the isolates from human illness. The results of an earlier study reported that 100% of the isolates from fish were of serotype 1/2a and belongs to serogroup IIa (Kramarenko et al., 2013). Another study by Gianfranceschi et al. (2009) also most frequently detected serogroup IIa (65%, 11/17) from fresh fish in Italy during years 2002 to 2005. The results of our study are in agreement that serogroup IIa most commonly are isolated from food than other *L. monocytogenes* serogroups.

In our study five *Listeria* species were detected in fish samples from market (Table 14). Most commonly was detected *L. monocytogenes* (25.9%), following by *L. innocua* (25.2%), *L. welshimeri* (14.8%), *L. seeligeri* (10.4%), and *L. ivanovii* (7.4%). The highest prevalence of *L. monocytogenes* and *L. innocua* was detected in perch (36.4 and 45.5%, respectively). Lower prevalence of *L. monocytogenes* and *L. innocua* was found in freshwater bream (19.2 and 23.1%, respectively). Meanwhile, the highest prevalence of *L. ivanovii* and *L. seeligeri* was found in freshwater bream (19.2 and 23.1%,

respectively), while the lowest in roach (3.6 and 7.1%, respectively). *L. welshimeri* most commonly was found in perch (27.3%), but lower prevalence was in crucian carp (10%). *Listeria* spp. was not detected in any of rudd and other fish species samples analysed.

The prevalence of *Yersinia* spp. in fish from market was analysed (Table 15). Of four *Yersinia* species most frequently was detected *Y. enterocolitica* (33.3%), followed by *Y. frederiksenii* (11.1%), *Y. intermedii* (11.1%), and *Y. kristensenii* (3.0%). The highest prevalence of *Y. enterocolitica* was detected in other fish species (60%), but the lowest in roach (7.1%). *Y. frederiksenii* most frequently was found in silver bream, while in vimba less common (4.2%). The highest prevalence of *Y. intermedii* was found in crucian carp and silver bream (20%), but the lowest in vimba (4.2%). Meanwhile, the prevalence of *Y. kristensenii* the highest was in perch (9.1%), while the lowest in roach (3.6%). *Yersinia* spp. was not found in any of rudd samples tested.

CONCLUSIONS

1. The count of hygiene indicators (total bacterial count, *Enterobacteriaceae*, fecal coliforms and psychrotrophs) of fish varied between Lake Kīšezers, Lake Usmas and Lake Sīvers, as well as between fish species and tissues analysed. From the fish samples from lakes analysed, the mean count of hygiene indicators was significantly lower ($p<0.05$) on gills, skin and in gut of eel than of perch and silver bream.
2. Total bacterial count and *Enterobacteriaceae* count was various among several fish species at retail. The mean total bacterial count of roach ($6.04 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$), freshwater bream ($6.05 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$) and vimba bream ($6.12 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$) was significantly lower ($p<0.05$) than of silver bream ($6.94 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$) and rudd ($7.51 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$). The mean count of *Enterobacteriaceae* of vimba bream ($1.93 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$) was significantly lower ($p<0.05$) than of roach ($3.29 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$) and crucian carp ($3.66 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$). The high prevalence of *E. coli* (30%, 40/135) in fish at retail may indicate that there is a possibility that other enteric bacteria, including pathogens, could be present.
3. *Salmonella* was not detected in any of fish samples analysed. *Listeria* spp. and *Yersinia* spp. were present in fish at retail. However, *Listeria* spp. and *Yersinia* spp. were not found in any of fish samples collected from lakes. Most common *Listeria* spp. isolated from fish from retail belonged to *L. monocytogenes* (26%, 35/135), followed by *L. innocua* (25%, 34/135), *L. welshimeri* (15%, 20/135), *L. seeligeri* (10% 14/135),

and *L. ivanovii* (7%, 10/135). From *Yersinia* spp. strains isolated, most frequently was identified *Y. enterocolitica* (33%, 45/135), then *Y. frederiksenii* (11%, 15/135) and *Y. intermedii* (11%, 15/135), and *Y. kristensenii* (7%, 10/135).

4. *Listeria monocytogenes* strains isolated from fish at retail were classified into four serogroups by multiplex PCR serogrouping method: IIa (63.1%, 12/19), IIc (26.3%, 5/19), IIb (5.3%, 1/19) and IVb (5.3%, 1/19). *L. monocytogenes* serogroups IIa, IIb un IVb are considered pathogenic and may pose a threat for human health. All *Yersinia enterocolitica* strains isolated (n=45) belonged to biotype 1A, that is non-pathogenic.

RECOMMENDATIONS FOR PRACTICE

1. The results of this study indicate that the contamination of fresh fish with *Listeria monocytogenes* represent a risk to public health in the retail in Latvia. This finding suggests that consumers might be aware that improper handling and cooking of fish may contribute to potential food safety hazards. Furthermore, avoiding cross contamination of food may reduce the risk of foodborne illness.
2. In any of fish samples collected from lakes *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Yersinia* spp. were not detected. These results may indicate that contamination with pathogenic bacteria may occur throughout the entire food supply chain. Therefore, distributors and retailers need to take into consideration that products meet all food safety requirements during storage and sale.
3. In our study the count of hygiene indicators did not reflect the presence of *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Yersinia* spp. in fish from lakes or retail. Thus, the detection of hygiene indicators in fish is not desirable for estimation of the occurrence of pathogens.