

Latvijas Lauksaimniecības universitātē
Pārtikas tehnoloģijas fakultātē
Pārtikas tehnoloģijas katedrā

Metodiskie norādījumi mikrobioloģijas laboratorijas darbiem

LLU Pārtikas tehnoloģijas fakultātes studentiem



Jelgava
2019

Autores: Latvijas Lauksaimniecības universitātes Pārtikas tehnoloģijas fakultātes Pārtikas tehnoloģijas katedras docētājas – profesore, *Dr.sc.ing.* **Līga Skudra**, asociētā profesore, *Dr.sc.ing.* **Dace Kļava** un vadošā pētniece, *Dr.sc.ing.* **Asnate Ķirse-Ozoliņa**.

Metodiskie norādījumi mikrobioloģijas laboratorijas darbiem LLU Pārtikas tehnoloģijas fakultātes studentiem – Latvijas Lauksaimniecības universitāte, 2019, 51 lpp.

Laboratorijas darbu metodiskais materiāls paredzēts LLU Pārtikas tehnoloģijas fakultātes (PTF) studentiem, maģistrantiem un doktorantiem, izmantojams arī citu LLU studiju programmu studentiem.

SATURS

Mikrobioloģijas pamati

1	Mikrobioloģijas laboratorija	4
2	Mikrobioloģijas laboratorijas iekārtas	4
2.1	HOMOGENIZATORS	4
2.2	LAMINĀRAIS BOKSS UN ANAEROBAIS BOKSS	4
2.3	ŪDENS VANNA	5
2.4	MIKROORGANISMU INKUBATORS JEB TERMOSTATS	5
2.5	ANAEROSTATS	5
2.6	KOLONIJU SKAITĪTĀJS	6
2.7	AUTOKLĀVS	6
2.8	SAUSĀS STERILIZĀCIJAS SKAPIS	6
2.9	TRAUKI UN INSTRUMENTI	6
2.10	MIKROSKOPS	8
2.11	GAISMAS MIKROSKOPI	10
2.12	BAROTNES	10
2.13	STERILIZĀCIJAS METODES	12
3	Mikroorganismu morfoloģija	12
3.1	NEKRĀSOTO PREPARĀTU GATAVOŠANA	13
3.2	KRĀSOTO PREPARĀTU GATAVOŠANA	15
3.3	MIKROORGANISMU IZMĒRU NOTEIKŠANA	21
3.4	MIKROORGANISMU SKAITA NOTEIKŠANA AR GORJAJEVA KAMERU	21
3.5	TĪRKULTŪRU IEGUVES METODES	22
4	Pārtikas ražošanas tehnoloģiskā procesa sanitāri – higiēniskā kontrole	23
4.1	GAISA MIKROBIOLOĢISKĀ KONTROLE	23
4.2	ŪDENS MIKROBIOLOĢISKĀ KONTROLE	24
4.3	APKALPOJOŠĀ PERSONĀLA UN IEKĀRTU SANITĀRI – HIGIĒNISKĀ KONTROLE	26
4.4	PĀRTIKAS UZŅĒMUMĀ IZMANTOJAMĀS EKSPRESMETODES	26

Pārtikas produktu mikrobioloģiskā kontrole

5	Atšķaidījumu gatavošana	28
6	Piena produktu mikrobioloģiskā kontrole	30
7	Gaļas un gaļas produktu mikrobioloģiskās kontrole	35
8	Olu produktu mikrobioloģiskās kontrole	36
9	Zivju un zivju produktu mikrobioloģiskās kontrole	37
10	Graudu, maizes un konditorejas izstrādājumu mikrobioloģiskā kontrole	38
11	Alus mikrobioloģiskā kontrole	39
12	Sauso augu valsts izcelsmes pārtikas produktu mikrobioloģiskā kontrole	40
13	Sulu un bezalkoholisko dzērienu mikrobioloģiskā kontrole	41
14	Saldēto pārtikas produktu mikrobioloģiskā kontrole	42
15	Majonēzes, kečupu un gatavo salātu (konservētu un svaigi gatavotu) mikrobioloģiskā kontrole ..	43
16	Paraugu ņemšana, sagatavošana un rezultātu interpretācija saskaņā ar ISO standartiem un Regulu (EK) Nr. 2073/2005	44
16.1	STANDARTI	44
16.2	PARAGU SAGATAVOŠANA MIKROBIOLOĢISKAJAI TESTĒŠANAI (LVS EN ISO 6887)	44
16.3	REZULTĀTU APRĒĶINS (LVS EN ISO 7218)	45
16.4	PARAGU ŅEMŠANAS PLĀNS	46
17	Mikroorganismu identifikācija līdz sugai	47
	Izmantotā literatūra	51

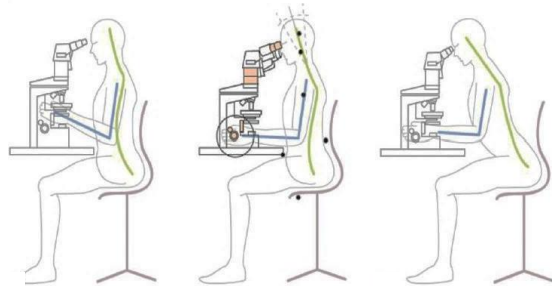
1 Mikrobioloģijas laboratorija

Mikrobioloģija ir nozare, kurā strādā ar mikroskopiskiem organismiem, kurus redzamajā pasaulē nevar ieraudzīt, tādēļ īpaši jāpievērš uzmanība telpas sanitārajiem un higiēniskajiem apstākļiem. Laboratorijai ir jābūt gaišai, sienas un grīdas klājumam jābūt no viegli mazgājama materiāla.

Mikrobioloģijas laboratorijas vispārīgās prasības ir noteiktas standartā LVS EN ISO/IEC 17025. Tas nosaka, ka laboratorijas iespējām, kuras neaprobežojas tikai ar enerģijas avotiem, apgaismojumu un vides nosacījumiem, jābūt tādām, lai varētu veikt korektu testēšanas izpildi. Laboratorijā jāvelta pienācīga uzmanība izpildāmajām tehniskajām darbībām, piemēram, bioloģiskai sterilitātei, putekļiem, elektromagnētiskiem traucējumiem, starojumam, mitrumam, elektrības piegādei, temperatūrai, trokšņa un vibrāciju līmenim. Testēšana jāaptur, ja

vides nosacījumi pakļauj riskam testēšanas rezultātus.

No laboratorijas jābūt atdalītai telpai, kurā sagatavo izejmateriālus, iznīcina izlietotos materiālus. Pie tam šajā telpā nedrīkst vienlaicīgi notikt gan izejmateriāla sagatavošana, gan izmantoto materiālu utilizēšana. Mikroskopi uz galdiem jāizvieto tā, lai būtu ērti strādāt, tos nedrīkst kustināt darba laikā (1. att.).



1. att. Mikroskopa novietojums uz galda

2 Mikrobioloģijas laboratorijas iekārtas

2.1 HOMOGENIZATORS

Homogenizatoru (2. att.) izmanto parauga sajaukšanai ar atbilstošu atšķaidītāju, no kura tālāk gatavo nepieciešamos decimālatšķaidījumus. Tas nepieciešams, lai vienmērīgi sajauktu visas parauga frakcijas un mikroorganismu klātbūtni analizētu visā produktā kopumā. Visbiežāk izmantotie homogenizatoru veidi ir stomahers, kurā parauga sajaukšanu nodrošina lāpstiņu mehānisms (BagMixer®) un mikseris, kurā parauga sajaukšana notiek ar vibrācijas palīdzību (Pulsifier®).

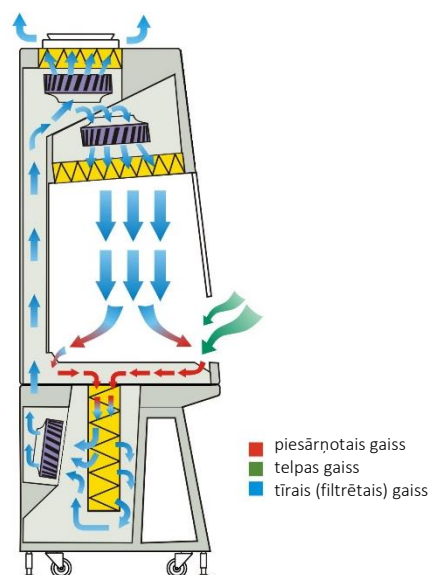


2. att. Bagmixer® un Pulsifier II®

2.2 LAMINĀRAIS BOKSS UN ANAEROBAIS BOKSS

Mikrobioloģisko analīžu veikšanai nepieciešams nodrošināt sterilu apkārtējo vidi. Ja nav atsevišķa telpa – bokss, kurā tiek nodrošināti sterili apstākļi darbam, tad mūsdienīgā laboratorijā izmanto lamināro boksu. Tajā nepārtraukti tiek nodrošināta mikrobioloģiski tīra gaisa padeve caur filtru sistēmu (3. att.). Laminārajā boksa (4. att.) ir integrēta UV-C lampa, lai dezinficētu vidi pēc darba.

Anaerobais bokss (5. att.) ir laminārā boksa veids, kurā bez sterilas apkārtējās vides tiek nodrošināta kontrolēta vide – anaerobi apstākļi. Anaerobajā boksa iespējams veikt uzsējumus bezskābekļa vidē, jaunākajos boksos iespējams nodrošināt gan uzsējumu un inkubācijas procesu, gan paraugu izmeklēšanu.



3. att. Filtru sistēmas shematisks attēlojums



4. att. Laminārais bokss *Monmouth Guardian*



5. att. Anaerobais bokss *Whitley A135*

2.3 ŪDENS VANNA

Ūdens vanna ir tvertne ar sildelementiem un temperatūras regulatoru (6. att.).

Lai nodrošinātu ilgtermiņa sildelementu darbību ieteicams lietot destilētu ūdeni. Ūdeni iespējams sasildīt līdz 98 °C temperatūrai. To izmanto barotņu atšķīdināšanai.



6. att. Ūdens vanna *GFL 1013*

2.4 MIKROORGANISMU INKUBATORS JEB TERMOSTATS

Mikroorganismus audzējot vides temperatūra jāpiemēro to prasībām. Lai nodrošinātu šos īpašos apstākļus izmanto termostatus, jeb inkubatorus (7. att.) – iekārtas, kuras automātiski uztur vajadzīgo vides temperatūru. Mikroorganismu inkubatoros, izmantojot programmēšanas iespējas var uzstādīt noteiktu temperatūru un laiku mikroorganismu kultivēšanai. Vienmērīgu temperatūru uztur sildelementi un termoregulators, kurš pie noteiktas temperatūras atvieno sildelementu darbību.



7. att. Mikroorganismu inkubators
Mettler IPP200

2.5 ANAEROSTATS

Anaerostats (8. att.) ir ierīce mikroorganismu audzēšanai anaerobos (bez skābekļa) apstākļos. Laboratorijā bieži izmanto *GasPak* metodi. Tie ir komerciāli pieejami maisiņi ar sausu pulveri vai granulām, kas rada vidi brīvu no skābekļa (O_2) pēc samaisīšanas ar ūdeni un izturēšanas hermētiski noslēgtā traukā.

Anaerobās vides radīšanai nepieciešams $NaBH_4$, $NaHCO_3$, $C_3H_5O(COOH)_3$ un $CoCl_2$ (katalizators). Šīs vielas reaģē ar ūdeni un veido ūdeņradi un oglekļa dioksīdu, kā arī citus blakusproduktus. Ūdeņradis katalizatora pallādijs klātbūtnē reaģē ar traukā esošo skābekli un veido ūdeni. Oglekļa dioksīds veicina anaerobo mikroorganismu augšanu.

Anaerostatā ievieto Petri plates ar inkubējamo paraugu, *GasPak* maisiņu un indikatoru (norāda uz

skābekļa klātbūtni vidē), to hermētiski noslēdz un inkubē atbilstošā temperatūrā.



8. att. *GasPak* anaerobā sistēma: anaerostati ar *GasPak* maisiņu un Petri platēm

2.6 KOLONIJU SKAITĪTĀJS

Koloniju skaitītāju (9. att.) izmanto koloniju skaitīšanai uz Petri plates. Koloniju skaitītājs apvieno sevī kompaktu un praktisku ierīci ar augstu izšķiršanas spējas digitālo kameru, apgaismojumu un USB savienojumu ar datoru. Koloniju skaitītājam ir nodrošināta pilnībā datorizēta attēla veidošanās koloniju skaitīšanai, kuru var veikt manuāli, izvēloties katru koloniju uz datora ekrāna un uzklikšķinot ar peli vai automātisko norādot atšķaidījuma pakāpi.



9. att. Automātiskais koloniju skaitītājs *aColyte*

2.7 AUTOKLĀVS

Autoklāvs – hermētiski noslēgta metāliska dubultsienu tvertne, kurā sterilizācijas efektu iegūt ar piesātinātu tvaiku. Starp tvaika spiedienu un temperatūru ir noteikta sakarība, kas tiek kontrolēta un reģistrēta ar datorizētu programmu. Visbiežāk autoklāvā tiek uzturēts 0.5-1 atm. spiediens. Pēc sterilizācijas procesa beigām autoklāvs uzreiz neatveras, jānogaida, līdz izlīdzinās iekšējais un ārējais spiediens.

Autoklāvu izmanto barotņu un materiālu sterilizācijai, kā arī utilizācijai. Laboratorijā izmantojamās autoklāvas iedala galda, horizontālos, vertikālos (10. att.) un plašas kapacitātes autoklāvos.

Barotņu sterilizācijai visbiežāk izmanto režīmu 121 °C vai 115 °C 15 min, trauku sterilizācijai 134 °C 3 min.



Systec V-150



Systec D-150

10. att. Vertikāla un horizontāla tipa autoklāvs

2.8 SAUSĀS STERILIZĀCIJAS SKAPIS

Sausās sterilizācijas skapjus (11. att.) lieto stikla laboratorijas trauku un citu sauso priekšmetu sterilizācijai. Sterilizācijas process noris karstā gaisā, 120-160 °C temperatūrā, sterilizācijas laiks 1.5-2 h. Termoelementi nodrošina gaisa sasilšanu līdz noteiktajai temperatūrai savukārt ventilators siltumu uztur vienmērīgi pa visu iekšieni.

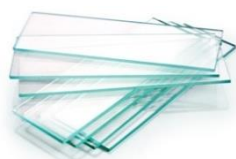


11. att. Sausās sterilizācijas skapis *Memmert P-500*

2.9 TRAUKI UN INSTRUMENTI

2.9.1 Priekšmetstikliņi

Priekšmeta stikliņš (12. att.) ir 26×76 mm garens stikliņš, kuru izmanto mikroskopēšanas preparātu gatavošanai.



12. att. Priekšmetstikliņi

2.9.2 Segstikliņi

Segstikliņi (13. att.) ir plāni dažādu izmēru četrstūrīgi stikliņi, kurus izmanto, lai piefiksētu sagatavoto preparātu. Visbiežāk lieto segstikļus, kuru izmēri ir 20×20 mm (iespējami arī 20×40 mm).



13. att. Segstikliņi

2.9.3 Petri plate

Petri plati (14. att.) izmanto mikroorganismu kultivēšanai. Petri plates ir vairāk reižu lietojamās no stikla un vienreizējās no polistirola. Visbiežāk izmanto Petri plates, kuru izmēri ir $\varnothing$ 90 mm (bez, ar 2, 3 vai 4 sektoriem) un $\varnothing$ 55 mm.



14. att. Petri plate

2.9.4 Cilpiņas, adatas un āķīši

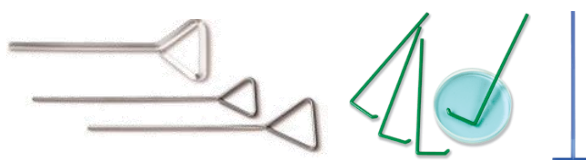
Cilpiņas (15. att.), adatas un āķīšus izmanto mikroskopēšanas preparātu gatavošanai. Ar cilpiņu uz priekšmetstikliņa uznes izejmateriālu no šķidrām un agarizētām barotnēm. Savukārt āķīšus un adatas lieto izejmateriāla uznesšanai uz priekšmetstikliņa no agarizētas barotnes, ja gatavo pelējumu preparātus.



15. att. Cilpiņas

2.9.5 Špātele

Špāтели (16. att.) jeb lāpstiņu izmanto uz Petri plates uznestā parauga izlīdzināšanai/izsmērēšanai pa tajā esošo agarizēto barotni. Špātele (L-veida nūjiņa, T-veida sadalītājs) ir ar noapaļotu virsmu, kas ļauj vienmērīgi izlīdzināt šķidrus paraugus, nebojājot agaru.



16. att. Špāteles

2.9.6 Sterils tampons

Sterili tamponi uz kociņa (17. att.) jeb švābi paredzēti uztriepju paņemšanai no virsmām, kautķermeņiem un ādas. Tie ir sausi tamponi uz kociņa vai plastikāta nūjiņas, kas varbūt individuāli iepakoti polipropilēna testa mēģenē ar vai bez barotnes. Testa mēģene nodrošina paņemtās uztriepes drošu transportēšanu.

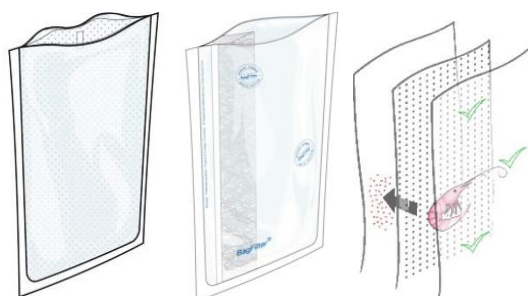


17. att. Sterili tamponi

2.9.7 Maisiņš ar filtru

Maisiņi ar filtru (18. att.) ir sterili daudzslāņu maisiņi, kas paredzēti parauga sagatavošanai mikrobioloģiskām analīzēm.

Tas ir kalibrēts mikroperforēts filtrs, kas nodrošina automātisku parauga filtrāciju. Filtrācijas porainība ir 50–280 mikroni un maisiņu darba tilpums 5–3500 ml. Tādējādi uzsējumiem iespējams ņemt paraugu, kas nesatur produkta gabaliņus vai daļiņas, tā nodrošinot precīzus analīžu rezultātus.



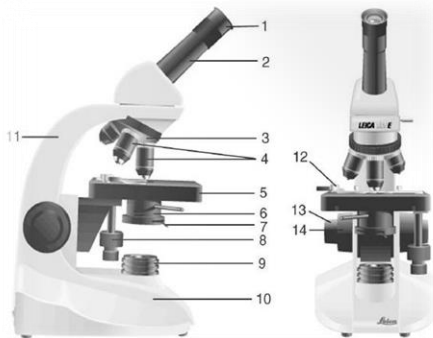
18. att. Maisiņi ar filtru

2.10 MIKROSKOPS

Mikrobioloģijas pamatā ir sīku mikroskopisku organismu izpēte, kuru apskatei nepieciešams lietot mikroskopu. Mikroskopus iedala:

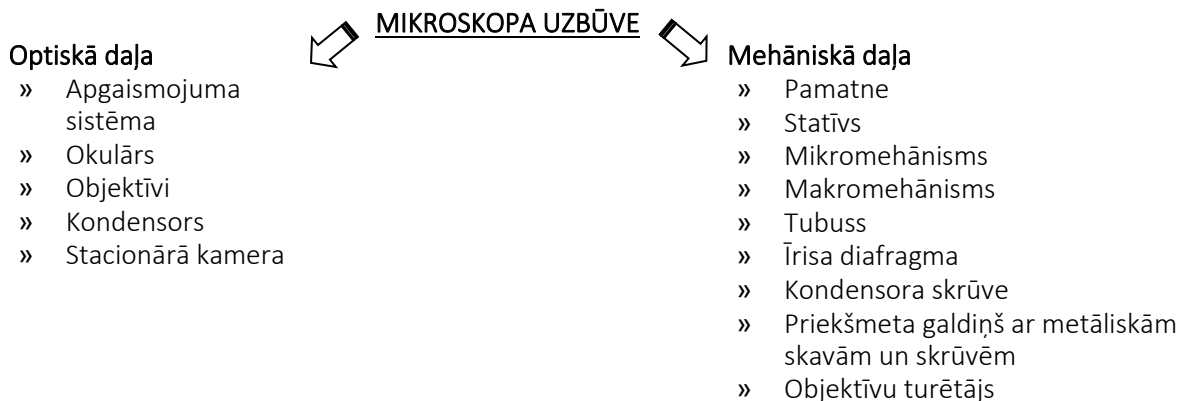
- » optiskie jeb gaismas mikroskopi (izmanto gaismu (vai tai tuvu elektromagnētisko starojumu) un attēlu iegūst vienā paņēmienā);
- » elektronmikroskopi (izmanto elektronu kūļus, ietver caurejošā starojuma elektronmikroskopu (TEM) un skenējošajos elektronmikroskopu (SEM));
- » skenējošās zondes mikroskopi (attēlu iegūst pa punktiem, pa parauga virsmu pārvietojot zondi, kas nosaka parauga īpašības attiecīgajā punktā);
- » citi mikroskopi (jonu mikroskops, rentgenmikroskops, akustiskais mikroskops u.c.).

Vispārīgā gaismas mikroskopa uzbūve norādīta 19. att.



- 1 – okulārs, 2 – tubuss,
- 3 – objektīvu turētājs,
- 4 – objektīvi, 5 – priekšmetgalds,
- 6 – kondensators,
- 7 – īrisa diafragmas svira,
- 8 – preparāta pārvietošanas skrūves,
- 9 – apgaismojuma frontālā lēca,
- 10 – mikroskopa pamatne,
- 11 – tubusa turētājs,
- 12 – preparāta fiksācijas mehānisms,
- 13, 14 – mikrofokusēšanas mehānisma skrūves

19. att. Mikroskopa uzbūve (Leica DM500 modelis kā laboratorijā)



2.10.1 Optiskā daļa

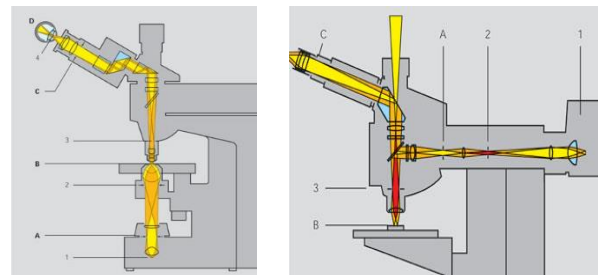
Apgaismojuma sistēmas

Mikroskopā apgaismojuma sistēmu veido elektriskais apgaismes avots un kondensors ar īrisa diafragmu. Kondensoram ir 2 vai 3 lēcas, kas iemontētas cilindriskā aptverē. Tas atrodas zem priekšmeta galdiņa. Mikroskopiem iespējama caurejošās gaismas sistēma, kad gaisma plūst caur objektu un atstarotajā gaismas sistēmā, kad gaismas stars tiek laužts speciālā iekārtā (20. att.).

Okulārs

Okulāri sastāv no divām lēcām, kuras iemontētas cilindriskā aptverē. Starp tām atrodas pastāvīga diafragma, kas ierobežo redzes lauku. Augšējā lēca noder skatīšanai, bet apakšējā fokusē objektīva

radīto attēlu diafragmas plaknē. Visbiežāk izmanto okulārus, kas palielina 10, 15 vai 20 reizes.



20. att. Caurejošā un atstarotās gaismas sistēma

Objektīvi

Objektīvi ir mikroskopa svarīgākā daļa. Tie dod īstu, apgrieztu, palielinātu attēlu. Objektīvs ir sarežģīta

optiska sistēma, kas atkarībā no palielinājuma un citām īpašībām sastāv no daudzām lēcām, kuras atrodas metāla ietvarā. Objektīvus viegli var identificēt pēc uzrakstiem to sānos, visi objektīvi ir marķēti arī ar speciāliem krāsu gredzeniem – palielinājums un imersijas vide.

Ļoti sīkus organismu pētījumiem tiek izmantoti eļļas vai ūdens imersijas objektīvi, ar kuriem strādājot starp priekšmetstikliņu un objektīvu liek eļļas vai ūdens pilienu. Attēlu palielinājums, ko iegūst strādājot ar dažādiem objektīviem ir 1-120 reizes. Tas ir objektīva palielinājums, kuru norāda arī uz paša objektīva. Studiju procesā visbiežāk izmanto objektīvus ar palielinājumu 8, 20, 40, vai 60 reizes, bet zinātniskiem pētījumiem iespējams izmantot 100 vai 120 reižu palielinājumu.

Kondensors

Kondensors sastāv no lēcu sistēmas, kas sakopo un novirza uz preparāta no gaismas ķermeņa izstaroto gaismu. To var pacelt līdz virsēja lēca ieiet priekšmetgaldiņa atvērumā. Kondensorā ir iekļauta arī īrisa veida diafragma. Tā sastāv no daudzām plānām noteiktas formas metāla plāksnītēm, kas kustīgi iemontētas īpašā atverē. Ar nelielas sviras palīdzību diafragmu var atvērt un aizvērt, tādējādi regulējot malējo gaismas staru iekļūšanu kondensorā un tālāk objektīvā.

Kontrasta metodes

Mikroskopēšanai iespējams izmantot vairākas kontrasta metodes specifisku mikroorganismu apskatei.

Gaišais redzes lauks - klasiskā mikroskopijas metode, kuru pamatā lieto medicīnā, mikrobioloģijā un bioloģijā nekrāsotu un krāsotu preparātu apskatei.

Tumšais redzes lauks - ar šo kontrasta metodi var vizualizēt smalkās struktūras caurejošās gaismas

mikroskopiem un, pielietojama metalogrāfiskiem un kristalogrāfiskiem izmeklējumiem atstarotajā gaismā. Papildus nepieciešams speciāls kondensors un bieži imersijas eļļa.

Fāzes kontrasts - speciāla metode, ko lieto ļoti smalku struktūru noteikšanai audos, mikroorganismos un atsevišķās šūnās nekrāsotiem preparātiem. Nepieciešams speciāls kondensors un objektīvi.

VAREL kontrasts - ar šo kontrasta metodi parauga struktūras tiek skatītas reljefā. Tā kā metode ir nejūtīga polarizācijas efektiem, tā ir speciāli piemērota paraugiem, kas turēti plastmasas traukos. Papildus nepieciešams speciāls kondensors un objektīvi.

Fluorescences mikroskopija – mikroskopijā plaši izmanto ierosināto jeb sekundāro fluorescenci, kas rodas, ja šūnas apstrādā ar fluorohromiem – īpašām krāsvielām ar kurām var krāsot dzīvās šūnas. Pēc ķīmiski-fizikālām īpašībām pastāv:

- » bāziskie fluorohromi – auramīni, akridindzeltenais, tripaflavīns, akridinoranžais. Šīs krāsvielas izmanto mikroorganismu šūniņu krāsošanai, kuri attīstās bāziskā vai neitrālā vidē (pH 7-7.2), piemēram, raugi, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Bacillus* spp.
- » skābes fluorohromi – primulīnu, eozīnu un tiazīnsarkanais. Lito baktērijām, kuras attīstās skābā vidē, piemēram, *Mycobacterium tuberculosis*.
- » neitrālie fluorohromi – rodanīns B un pironīns, izmanto mikroorganismiem, kas attīstās neitrālā vidē. Praksē visbiežāk lieto bāziskos fluorohromus – akridindzelteno un akridinoranžo. Dzīvām Gramnegatīvo baktēriju šūnām ir zaļgana fluorescence, savukārt dzīvām rauga šūnām citoplazma ir zaļganā krāsā, nedzīvām – vara sarkanā krāsā.

2.10.2 Mehāniskā daļa

Mikroskopa mehāniskā daļa sastāv no **pamatnes**, uz kuras balstīts viss mikroskops.

Makroskrūves un **mikroskrūves** paredzētas redzes lauka asuma noregulēšanai pie dažādiem palielinājumiem. Mikroskrūves ir ļoti precīzi tādēļ strādājot jāgriež ļoti uzmanīgi bez straujām kustībām un spēka pielietošanas, jo to pielieto ja preparātu apskata lielākā palielinājumā.

Priekšmetgaldiņš var būt savienots ar pamatni un tādā gadījumā asuma noregulēšanai tiek pārvietoti objektīvi, vai ar makroskrūves un mikroskrūves mehānismu. Šajā gadījumā regulējot asumu pārvietoja priekšmetgaldiņš. Zem priekšmeta galdiņa atrodas diafragma ar rokturīti, ar kura

palīdzību regulē redzes laukā apgaismojuma intensitāti.

Uz priekšmetgaldiņa ir novietotas **skaviņas**, kurās iestiprina preparātu, un tādējādi ir iespējams brīvi strādāt ar abām rokām.

Izmantojot **priekšmetgaldiņa skrūves** iespējams pārvietot priekšmetgaldiņu tādējādi izmainot redzes lauku.

Tubuss ir cilindriska caurule, kuras galos piestiprināts objektīvs un okulārs. Tubusa apakšējā galā ir piestiprināta objektīva turētājs – grozāms disks ar 2-4 objektīva ligzdām. Tubusa augšējā daļa atbilst okulāra cilindriskajai aptverei.

2.11 GAIŠMAS MIKROSKOPI

Stateniskie mikroskopi

Tie ir visbiežāk ikdienā izmantojamie mikroskopi (21.att.), tos var konfigurēt pēc lietotāju vajadzībām un vēlmēm. Tos izmanto kā mācību līdzekļus, laboratorijas darbiem, kā arī pētnieciskam darbam.

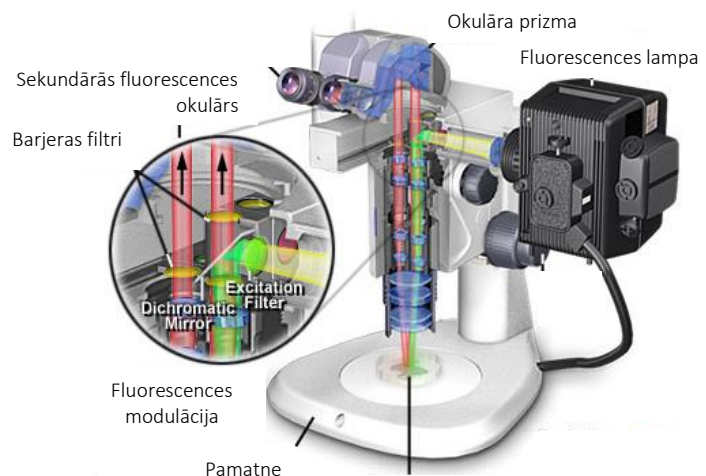
Fluorescences mikroskopi

Fluorescences mikroskopu izmanto „fotoluminescences” parādību (22. att.) – objektu mirdzēšanas efektu gaismas apstarošanas

gadījumā. Šajā mikroskopā paraugs tiek apstarots ar monohromatisku gaismu no lāzera vai no lampas caur ierosināšanas filtru, piemēram, zilu. Apgaismojums tiek fokusēts caur objektīvu uz paraugu virsmu un atstarotā gaisma iet atpakaļ caur objektīvu okulārā. Parauga fluorescences ar lielāku viļņa garumu tiek novērota caur emisijas filtru, piemēram, zaļā vai sarkanā krāsā. Būtiski ir tas, ka fluorescences mikroskops ļauj saskatīt tikai tās parauga daļas, kas rada fotoluminescenci izvēlēta viļņa garuma diapazonā.



21. att. Stateniskie mikroskopi



22. att. Mikroskopa fluorescences iekārta

2.12 BAROTNES

Barotnes ir labvēlīga vide mikroorganismu attīstībai ar mikroorganismiem nepieciešamām barības vielām. Barotnes iedala gan pēc veida, gan pēc funkcionalitātes (1. tabula).

2.12.1 Barotņu veidi

1. **Šķidrās barotnes** g.k. lieto mikroorganismu biomasas audzēšanai. Tajās vairums mikroorganismu aug ātrāk, jo barības vielām bagāta vide tās apņem no visām pusēm. Taču ar šādu barotņu palīdzību nevar izdalīt noteiktas baktēriju līnijas, jo visi mikroorganismi haotiski pārvietojas un sajaucas vides tilpumā.

2. **Cietās barotnes.** Augot uz cietas barotnes virsmas, baktērijas veido norobežotas kolonijas. Kolonija veidojas no vienas šūnas, tai daloties veidojas divas baktērijas, kad tās abas pārdalījušās jau ir četras šūnas utt. Tomēr cietās vides dēļ visas šūnas paliek viena ar otru kopā un nespēj tālu izplatīties pa barotnes virsmu. Kad, aktīvi daloties, kopā kolonijā atrodas jau simtiem tūkstošu baktēriju, koloniju var labi saredzēt bez palielinošām ierīcēm, var noteikt kolonijas formu,

krāsu un citas pazīmes. Pēc koloniju skaita var spriest, cik baktērijas sākotnēji uz barotnes nokļuvušas (viena dalīties spējīga baktērija – viena kolonija). **Koloniju veidojošās vienības (KVV)** raksturo ūdens, gaisa, pārtikas produktu parauga mikrobioloģisko stāvokli – cik dzīvot spējīgas baktērijas analizējamajā paraugā atrodas. Mūsdienīgu laboratoriju praksē visplašāk lieto agarizētās barotnes. **Agars** ir grūti attīrāms polisaharīds (pieder ogļhidrātu grupai), ko iegūst no dažām jūras aļģēm. Agarū kā pulverveida vielu barotnēm pievieno 2.0-2.5% koncentrācijā.

Ūdens vidē agars uzbriest un izšķīst 80-85 °C temperatūrā. Ja agarū saturošās barotnes atdziest zem 45-40 °C, tās sacietē un veido gelveidīgu masu. Pēc sacietēšanas barotne sašķidrināma, to uzkarsējot līdz 100 °C.

2.12.2 Barotņu funkcionālie tipi

Minimālā barotne apmierina tikai organisma pašas ierobežotākās barības vielu prasības, lai tās spētu augt un vairoties. Tipiska minimālā vide satur tikai neorganiskos sāļus un kādu no ogļhidrātiem (piem., glikozi) kā enerģijas avotu. Šādā barotnē spēs augt mikroorganismi, kuri visas pārējās šūnai vajadzīgās organiskās vielas (aminoskābes, vitamīnus u.c.) spēj sintezēt patstāvīgi. Ar minimālo barotņu palīdzību iespējams pētīt mikroorganismu biokīmisko procesu īpatnības – kādus savienojumus tās spēj noārdīt, kādus sintezēt un kādi tiem noteikti jāuzņem no apkārtējās vides.

Plaša pielietojuma barotnē ir ļoti daudzas dzīvai šūnai vajadzīgas organiskās un neorganiskās vielas, tai skaitā ogļhidrāti, aminoskābes, proteīni, vitamīni, mikro un makro elementi. Bagātajās barotnēs (*Nutrient Agar*, *Plate Count Agar*, *Brain Heart Infusion Agar* u.c.) var augt ļoti daudz dažādu mikroorganismu.

Selektīvo barotni lieto noteiktu mikroorganismu audzēšanai. Selektīvā barotnē pievienoti savienojumi, kuri indīgi daļai mikrobu, bet nekaitē vēlamajam, vai arī barības vielu sastāvs apmierina

tikai vēlamo mikroorganismu augšanu. Piemēram, slāpekli (N₂) fiksējošiem organismiem izmanto barotnes bez slāpekli saturošiem savienojumiem, Makkonkeja barotnē žultskābes sāļi un kristālvioletā krāsviela inhibē Gram(+) baktēriju augšanu un ļauj netraucēti vairoties Gram(-) baktērijām. Sukcinātu barotnē kā vienīgais oglekļa avots ir sukcināts – augs tikai mikroorganismi, kuri sukcinātu spēj pārvērst citos dzīvībai nepieciešamos oglekļa savienojumos.

Diferencējošā barotnē spēj attīstīties vairāki mikroorganismu tipi, taču tajā ir specifiskas krāsvielas vai citi savienojumi, kuru reakcija uz dažādo tipu organismiem ir atšķirīga – visbiežāk tā ir barotnes krāsas maiņa vai koloniju iekrāsošanās. Piem., selektīvajā Makkonkeja barotnē tiek pievienots pH indikators (neitrālais sarkanais), pašas kolonijas un barotne ap kolonijām, kurās baktērijas fermentē laktozi un izdala organiskās skābes (paskābina vidi) kļūst sarkanas. Savukārt baktēriju kolonijas, kuras skābi neizdala, krāsojumu nemaina. Šo barotni var saukt arī par selektīvi-diferenciālo barotni.

1. tabula

Biežāk lietotās barotnes un to saīsinājumu atšifrējums

Barotnes nosaukums, apzīmējums, atšifrējums	Nosakāmie mikroorganismi
Barojošais agars, gaļas peptona agars / <i>Nutrient agar</i>	GPA (latviski) vai NA (angliski) Mezofili aerobie un fakultatīvi anaerobie mikroorganismi (MAFAM) pārtikas produktos
Standartmetožu agars / <i>Plate count agar</i>	PCA Tryptona glikozes rauga ekstrakta agars
Standartmetožu agars ar vājpienu, vājpiena agars / <i>Plate count agar with skim milk</i>	VPA (latviski) MAFAM piena produktos, proteolītiskās baktērijas
Iesala ekstrakta agars / <i>Malt extract agar</i>	NMA (latviski) Raugi un pelējumi pārtikas produktos
MRS agars / <i>MRS agar</i>	MRS de Man, Rogosa, Sharpe agars
Endo agars / <i>Endo agar</i>	ENDO <i>E. coli</i> un koliformas baktērijas
Kristālvioletais neitrālsarkanais dekstrozes (glikozes) agars / <i>Violet red bile dextrose (glucose) agar</i>	VRBD vai VRBG <i>Enterobacteriaceae</i>
Tryptona sojas agars, CASO agars / <i>Tryptic Soy Agar</i> (arī <i>Tryptone</i> vai <i>Trypticasein</i>)	TSA Kazeīna peptona sojas miltu peptona agars <i>Pseudomonas spp.</i> , aerobās sporu veidotājas <i>Bacillus spp.</i> , <i>Streptomyces spp.</i>
TSC agars / <i>TSC agar</i>	TSC Tryptozes sulfīta cikloserīna agars <i>Clostridium perfringens</i>
<i>Bacillus cereus</i> (selektīvais) agars / <i>Bacillus cereus (selective) agar</i>	PEMBA Polimiksīna piruvāta olu dzeltenuma mannitola-bromtimola zila agars <i>Bacillus cereus</i>
Baird-Parker agars / <i>Baird-Parker agar</i>	Olu dzeltenuma telurīta glicīna piruvāta agars Koagulāzes pozitīvie stafilokoki (<i>Staphylococcus aureus</i> un citi)

2.13 STERILIZĀCIJAS METODES

Sterilizācija liesmā ir viens no vienkāršākajiem un ātrākajiem sterilizācijas veidiem, ko lieto metāla priekšmetu – skalpeļa, spalvas, pincetes, cilpiņas, adatas, āķīša –, kā arī stikliņu sterilizācijai tiešā liesmā, vai vispirms instrumentus apstrādājot ar spirtu un tad sterilizējot liesmā.

Sterilizācija Koha katlā (frakcionētā sterilizācija jeb tindalizācija) notiek sterilizācijas temperatūrai nepārsniedzot 100 °C (visbiežāk 80 °C) 20-30 min. Sterilizācijas procesu atkārto trīs reizes ik pēc 24 stundām. Mikroorganismu veģetatīvās šūnas šajā temperatūrā aiziet bojā, savukārt sporas iztur, tādēļ sterilizāciju nepieciešams atkārtot, jo 24 h laikā sporas izveidojas par veģetatīvajām šūnām. Metodi izmanto, ja nav pieejams autoklāvs.

Sterilizācija sausā sterilizācijas skapī notiek 150-160 °C temperatūrā 90-120 min. Pārsvārā izmanto

stiklu trauku sterilizācijai. Sterilizējamus priekšmetus ietin pergamentā, par sterilizācijas efekta sasniegšanu vizuāli liecina baltā papīra krāsas maiņa uz dzeltenīgu vai gaiši brūnu.

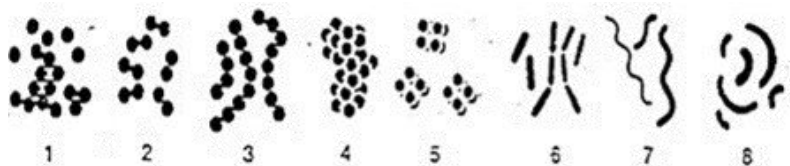
Sterilizācija autoklāvā notiek paaugstinātā atmosfēras spiediena autoklāvā, kurā var sasniegt 130 °C un augstāku temperatūru. Sterilizācijas ilgumu ietekmē barotnes ķīmiskais sastāvs vai tilpums. Autoklāvā iespējams sterilizēt arī ogļhidrātiem un olbaltumvielām bagātas barotnes, taču, lai izvairītos no ogļhidrātu karamelizācijas un olbaltumvielu denaturācijas, sterilizācijas temperatūra nedrīkst pārsniegt 115 °C. Autoklāvā sterilizē barotnes, virsvalkus, gumijas cimdus. Ja sterilizē gumijas cimdus, tie ir jāietin katrs atsevišķi, lai nenotiktu salipšana. Sterilizācijas režīms barotnēm visbiežāk ir 15 min 121 °C temperatūrā.

3 Mikroorganismu morfoloģija

Baktēriju morfoloģija

BAKTĒRIJU ŠŪNU FORMAS:

1 – mikrokoki, 2 – diplokoki,
3 – streptokoki, 4 – stafilokoki,
5 – sarcina, 6 – nūjiņveida baktērijas,
7 – spirillas, 8 – vibroni



Raugu un pelējumu morfoloģija

1. Maizes raugs *Sacharomyces cerevisiae*

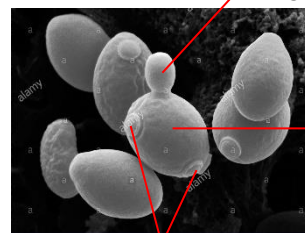


Rauga šūnas mikroskopā



Raugš uz Petri plates

2. Maizes rauga šūna elektronmikroskopā (dalīšanās process)

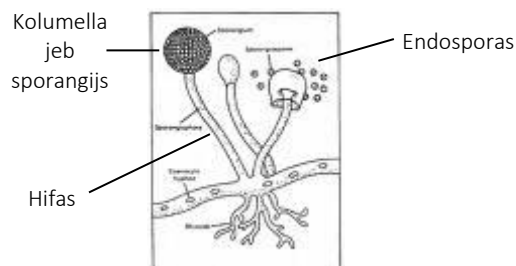


Rauga šūnas pumpurs

Rauga šūna / mātes šūna

Rēta no iepriekšējās dalīšanās reizes

3. Vienšūnu pelējums *Mucor mucedo*



Grafiski attēlots pelējums



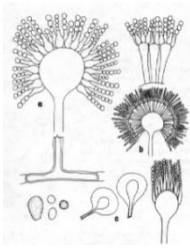
Pelējuma kolonija uz Petri plates



Pelējums mikroskopā

4. Daudzšūnu pelējums

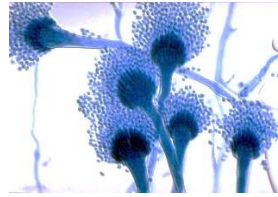
» Aspergillus spp.



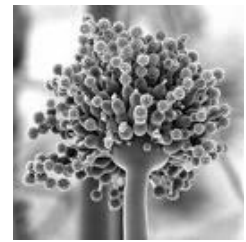
Grafiski attēlots pelējums



Pelējuma kolonija uz Petri plates (*Aspergillus niger*)

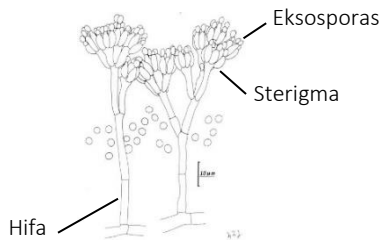


Pelējums mikroskopā (*Aspergillus niger*)



Pelējums elektronmikroskopā (*Aspergillus niger*)

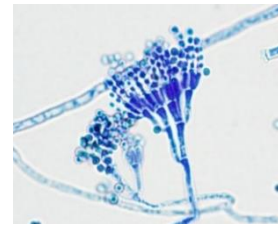
» Penicillium spp.



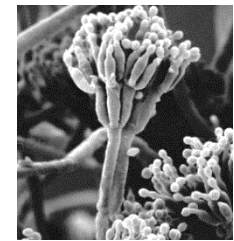
Grafiski attēlots pelējums



Pelējuma kolonijas uz Petri plates (*Penicillium chrysogenum*)

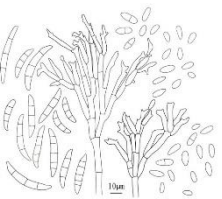


Pelējums mikroskopā



Pelējums elektronmikroskopā (*Penicillium camembertii*)

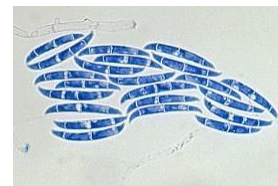
» Fusarium spp.



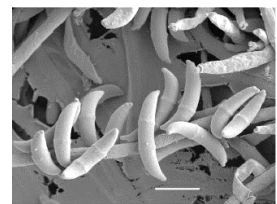
Grafiski attēlots pelējums



Pelējuma kolonijas uz Petri plates (*Fusarium oxysporum*)



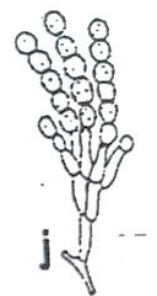
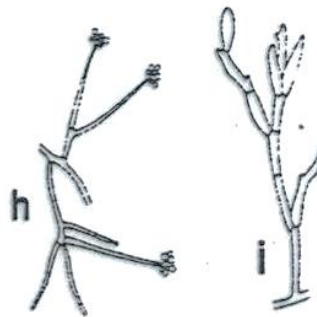
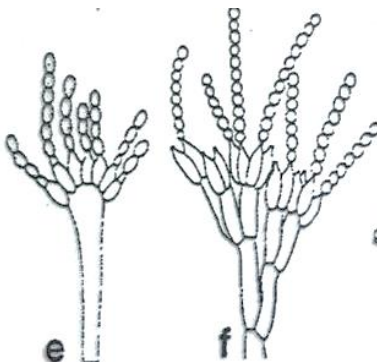
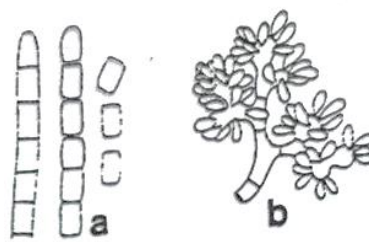
Pelējums mikroskopā (*Fusarium solani*)



Pelējums elektronmikroskopā (*Fusarium dimerum*)

PELĒJUMU UN MIKROSKOPISKO SĒŅU VEIDOTĀS SPORAS (KONĪDIJAS):

a – *Geotrichum*, b – *Botrytis*,
d – *Alternaria*, e – *Aspergillus*,
f – *Penicillium*, g – *Trichoderma*,
i – *Fusarium*



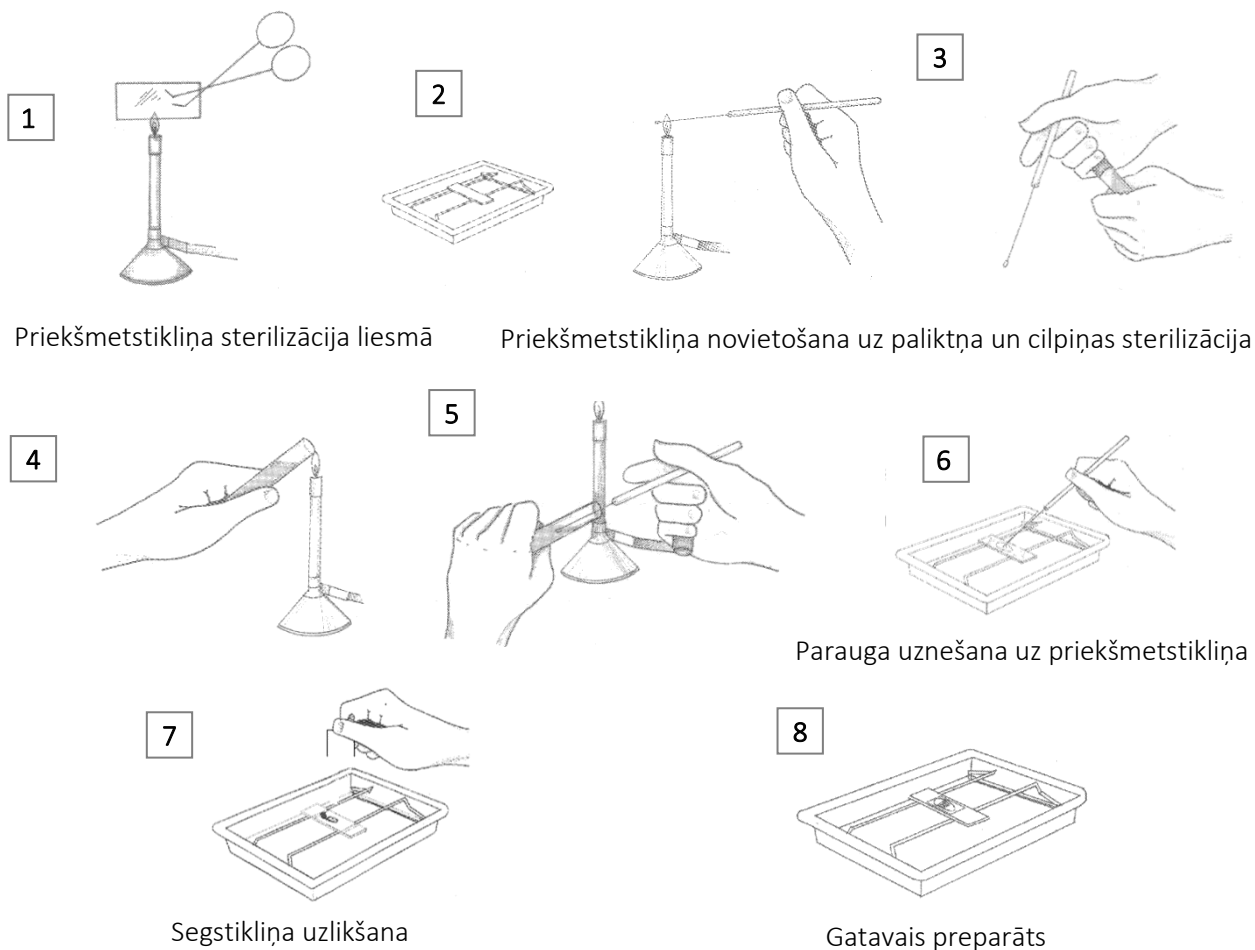
3.1 NEKRĀSOTO PREPARĀTU GATAVOŠANA

Nekrāsotos preparātus mikroskopēšanai gatavo, lai iepazītos ar mikroorganismu morfoloģiskām īpašībām (formu, izmēriem). Preparātu gatavo no mikroorganismu kultūras suspensijas, kas sagatavota sterilā vidē – peptona ūdenī, fizioloģiskā šķīdumā vai arī kas inkubētas šķidrās vai agarizētās (cietās) barotnēs.

Preparātu gatavošana no šķidrās barotnes vai suspensijas (skatīt nekrāsoto preparātu no šķidrās barotnes vai suspensijas gatavošanas shēmu Nr. 1)

1. Priekšmetstikliņu un segstikliņu sterilizē liesmā;
2. Uz sterila priekšmetstikla ar sterilu pipeti vai cilpu uznes pilienu no suspensijas vai barotnes, kurā kultivēti mikroorganismi;
3. Ar segstikliņa palīdzību sagatavoto preparātu fiksē uz priekšmetstikla. Segstikliņu uzliek lēni un uzmanīgi. Laukumam zem segstikliņa jābūt piepildītam ar sagatavoto materiālu un segstikliņa virsmai jābūt sausiai. Ja materiāla ir par daudz to nosusina ar filtrpapīru;
4. Sagatavoto preparātu mikroskopē un nosaka mikroorganismu veidu;
5. Mikroskopēšanas rezultātus apkopo darba protokolā.

Nekrāsoto preparātu no šķidrās barotnes vai suspensijas gatavošanas shēma Nr. 1

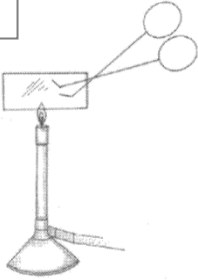
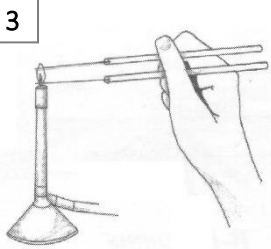
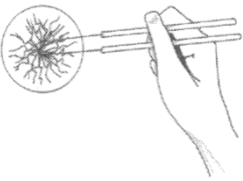
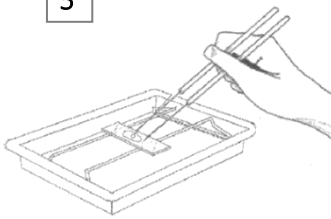
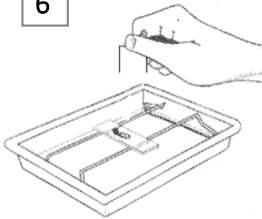
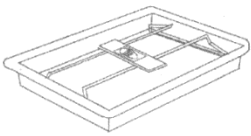


Preparātu gatavošana no agarizētās (cietās) barotnes (skatīt nekrāsoto pelējumu preparātu no agarizētās barotnes gatavošanas shēmu Nr. 2)

1. Priekšmetstikliņu un segstikliņu sterilizē liesmā;
2. Uz priekšmetstikla uznes sterila peptona ūdens vai fizioloģiskā šķīduma pilienu;
3. Ar sterilu āķīti un adatu paņem materiālu no mikroorganismu veidotās kolonijas malas un ieauc uznestā šķīduma pilienā. Paraugu no agarizētajām barotnēm ņem uzmanīgi no kolonijas malas, lai iegūtu

- preparātā dzīvos mikroorganismus. Uznestā materiāla daudzumam jābūt tādā apjomā, lai laukums zem segstikliņa pilnīgi pārklātos ar šķīdumu, bet neizplūstu gar tā malām;
- Ar segstikliņa palīdzību sagatavo preparātu fiksē uz priekšmetstikla. Segstikliņu uzliek lēni un uzmanīgi. Laukumam zem segstikliņa jābūt piepildītam ar sagatavoto materiālu un segstikliņa virsmai jābūt sausiai. Ja materiāla ir par daudz to nosusina ar filtrpapīru.
 - Sagatavoto preparātu mikroskopē un nosaka mikroorganismu šūnu formas;
 - Mikroskopēšanas rezultātus apkopo darba protokolā.

Nekrāsoto pelējuma preparāta no agarizētas barotnes gatavošanas shēma Nr .2

1  Priekšmetstikliņa sterilizācija liesmā	2  Priekšmetstikliņa novietošana uz paliktņa un fizioloģiskā šķīduma uzpilināšana	3  Āķīša un adatas, vai cilpiņas sterilizācija liesmā	
4  Pelējuma preparāta paņemšana un ienešana fizioloģiskajā šķīdumā uz priekšmeta stikliņa (baktēriju un raugu paraugu ņem ar cilpiņu, pelējumu ar āķīti un	5 	6  Segstikliņa uzlikšana	7  Gatavais preparāts

legaumē!

Lai preparātā neveidotos gaisa pūslīši:

- ✓ laukumam zem segstikliņa jābūt piepildītam ar sagatavoto suspensiju,
- ✓ ja šķīdums ir par daudz un parādās ārpus segstikliņa, to nosusina ar filtrpapīru.

3.2 KRĀSOTO PREPARĀTU GATAVOŠANA

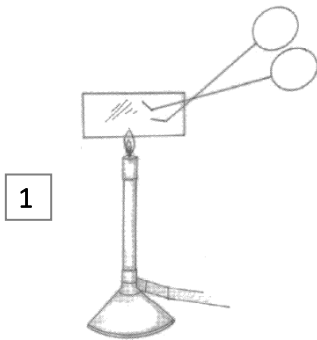
Vitālā krāsošana (skatīt vitālās krāsošanas shēmu Nr. 3)

Vitālā krāsošana ir ekspresmetode, kuru var veiksmīgi pielietot mikroorganismu tīrkultūru aktivitātes noteikšanai identificējot un nosakot dzīvo un nedzīvo šūnu daudzumu attiecīgā barotnē, vai sagatavotā fizioloģiskā šķīduma tīrkultūras suspensijā. Dzīvās mikroorganismu šūnas ar metilēnzilo krāsvielu nenokrāsojās, bet nedzīvās šūnas, kuru šūnapvalki ir kļuvuši caurlaidīgi, nokrāsojās zilā krāsā.

Preparātu gatavošanas process:

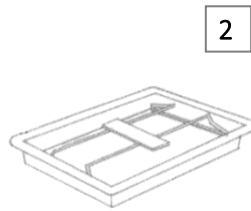
- Priekšmetstikliņu un segstikliņu sterilizē liesmā;
- Uz sterila priekšmetstikla ar sterilu pipeti vai cilpu uznes pilienu no suspensijas vai barotnes, kurā kultivēti mikroorganismi un nofiksē ar segstikliņu;
- Blakus segstikliņam uzpilina nelielu pilienu metilēnzilo krāsvielu. Pieliekot segstikliņa otrā malā filtrpapīru šķīdumu plūsmas rezultātā tiek iekrāsots uznestais materiāls;
- Sagatavoto preparātu mikroskopē un nosaka mikroorganismu veidu;
- Mikroskopēšanas rezultātus apkopo darba protokolā.

Vitālās krāsošanas shēma Nr. 3

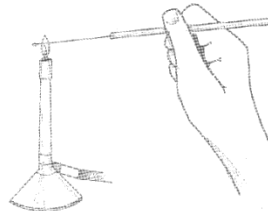


1

Priekšmetstikliņa
sterilizācija liesmā

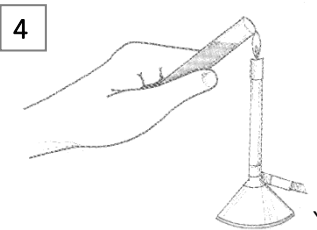


2



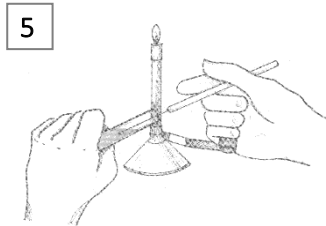
3

Priekšmetstikliņa novietošana uz paliktņa un cilpiņas sterilizācija



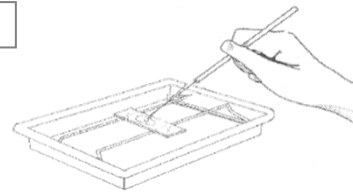
4

Izejmateriāla mēģenes atvēršana un materiāla paņemšana

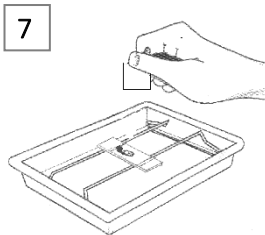


5

6

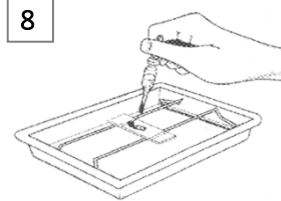


Parauga uznešana uz priekšmetstikliņa



7

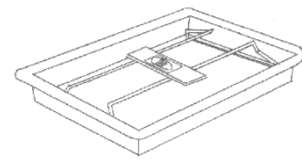
Segstikliņa uzlikšana



8

1 piliena metilēnzilā
uznešana blakus segstikliņam

9



Gatavais preparāts

Krāsotie fiksētie preparāti (skatīt krāsoto fiksēto preparātu gatavošanas shēmu Nr. 4)

Metodi izmanto saprofīto mikroorganismu kultūru krāsošanai, lai apskatītu to morfoloģiskās īpašības. Vairums bezsporu baktēriju, raugu un pelējumu šūnas fiksētos uztriepes preparātos nokrāsojas pietiekami kontrastaini ar vienu krāsvielu (metilēnzilo, karbolfuksīnu, kristālvioleto). Sagatavotās mikroorganismu kultūru uztriepes parasti fiksē spirta lampiņas liesmā, lai a) nonāvētu mikroorganismus, b) padarītu šūnas apvalkus caurlaidīgus, kas veicina krāsvielas iekļūšanu šūnā, c) piesaistītu materiālu priekšmeta stikliņam.

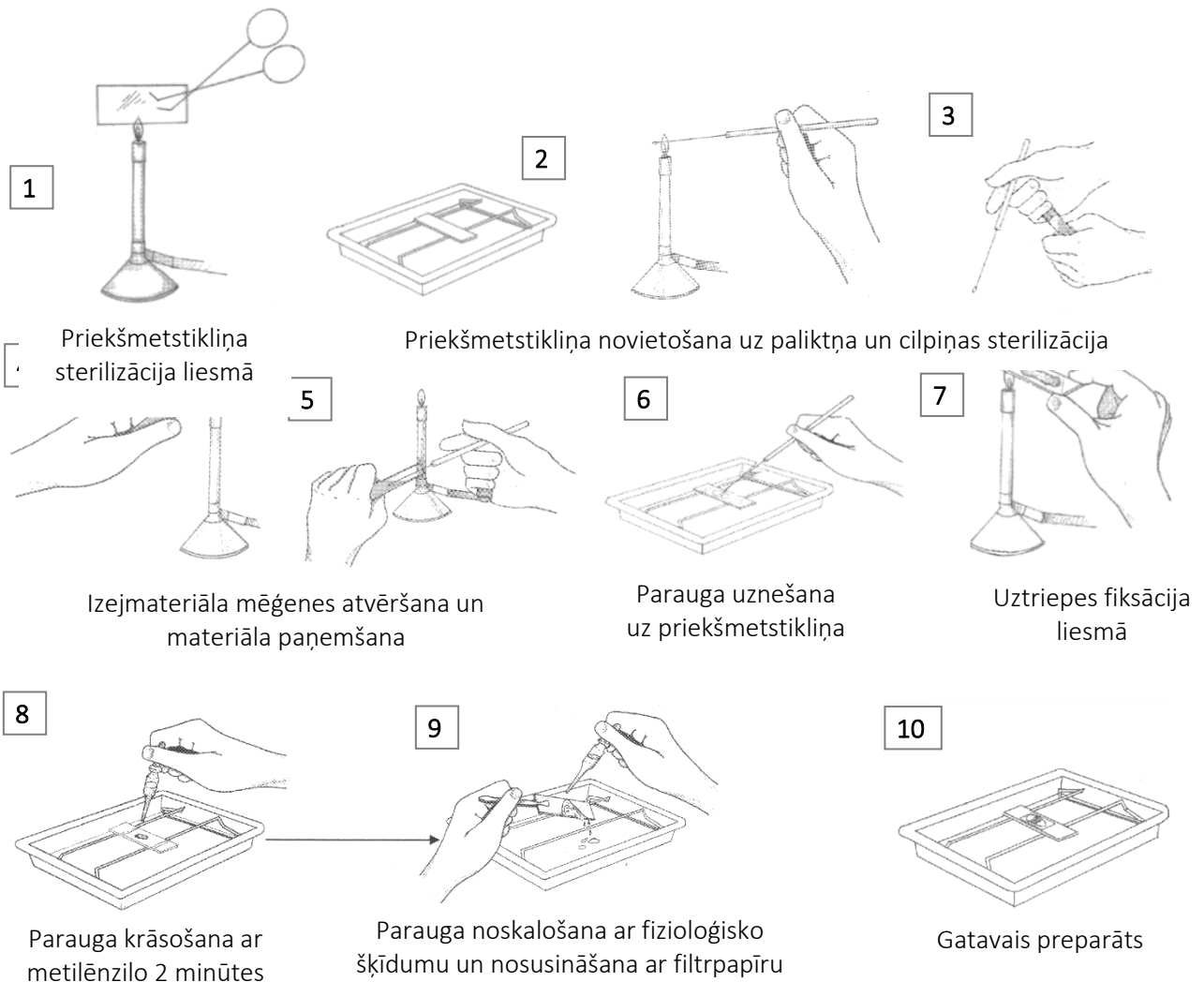
Preparātu gatavošanas process:

1. Priekšmetstikliņu un segstikliņu sterilizē liesmā;
2. Uz sterila priekšmetstikla ar sterilu pipeti vai cilpu uznes materiālu no suspensijas vai agarizētas barotnes, kurā kultivēti mikroorganismi. Gatavojot preparātu no agarizētās barotnes vispirms uz priekšmetstikliņa uznes 1 pilienu fizioloģiskā šķīduma, kurā pēc tam ienes mikroorganismu materiālu;
3. Izmantojot segstikliņa vienu malu sagatavo uztriepi, izvelkot materiālu pa priekšmetstikliņu;
4. Sagatavoto uztriepi fiksē liesmā;
5. Iegūto fiksēto preparātu caur filtrpapīru krāso ar metilēnzilo krāsvielu 2 minūtes;
6. Noņem filtrpapīru un preparātu noskalo ar fizioloģisko šķīdumu;
7. Izmantojot filtrpapīru nosusina sagatavoto preparātu;
8. Sagatavoto preparātu mikroskopē un nosaka mikroorganismu veidu;
9. Mikroskopēšanas rezultātus apkopo darba protokolā.

legaumē!

- ✓ Jo plānāka uztriepe, jo kvalitatīvāks preparāts.

Krāsoto fiksēto preparātu gatavošanas shēma Nr. 4



Krāsošana pēc Grama metodes (skatīt krāsošanas pēc Grama shēmu Nr. 5)

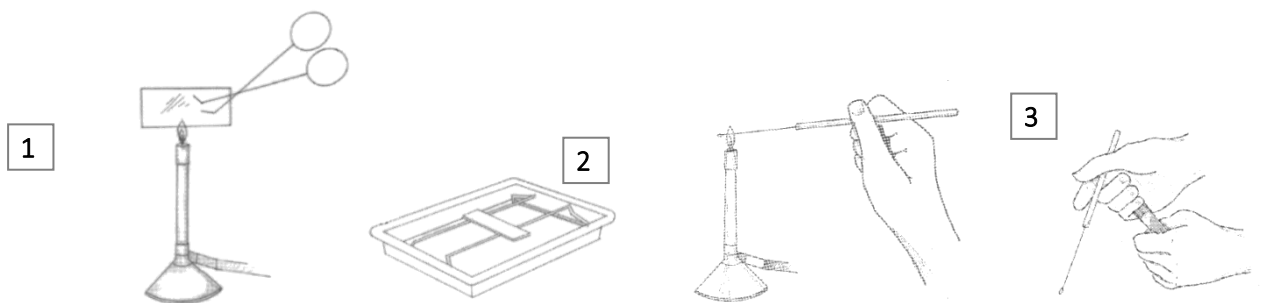
Tā ir ekspresmetode baktēriju identificēšanai. Gram pozitīvām (+) baktērijām pēc apstrādes ar Lugola šķīdumu veidojas stabils krāsojums, ko nevar atkrāsot ar etilspirtu, savukārt Gram negatīvās (-) baktērijas atkrāsojas, to šūnas var nokrāsot ar citu krāsvielu (Gram(+) baktēriju šūnas ir violetas, Gram(-) – sarkanas) (23. att.).

Preparātu gatavošanas process:

1. Priekšmetstikliņu un segstikliņu sterilizē liesmā;
2. Uz sterila priekšmetstikla ar sterilu pipeti vai cilpu uznes pilienu no suspensijas vai agarizētas barotnes, kurā kultivēti mikroorganismi. Gatavojot preparātu no agarizētās barotnes vispirms uz priekšmetstikliņa uznes 1 pilienu fizioloģiskā šķīduma, kurā pēc tam ienes materiālu ar mikroorganismiem;
3. Izmantojot segstikliņa vienu malu sagatavo uztriepi izvelkot pilienu pa priekšmetstikliņu. Jo plānāka uztriepe, jo kvalitatīvāks izdodas preparāts;
4. Sagatavoto uztriepi fiksē liesmā;
5. Iegūto fiksēto preparātu krāso ar kristālvioleto krāsvielu 1 minūtes;
6. Preparātu noskalo ar Lugola šķīdumu un papildus krāso to izturot 1 minūti;
7. Preparātu atkrāso ar 96% etilspirtu un iztur 1-2 sekundes;
8. Preparātu noskalo ar fizioloģisko šķīdumu un krāso ar karbolfuksīna krāsvielu 10-15 sekundes;

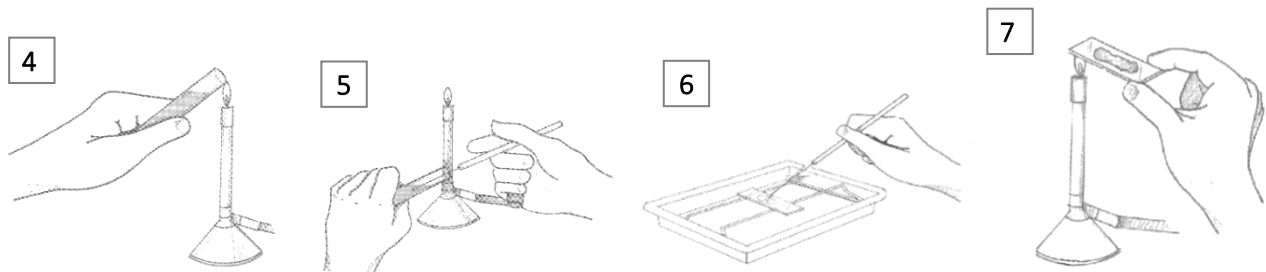
9. Nokrāsoto preparātu noskalo ar fizioloģisko šķīdumu;
10. Izmantojot filtrpapīru nosusina sagatavoto preparātu un apskata mikroskopā;
11. Sagatavoto preparātu mikroskopē un nosaka mikroorganismu veidu;
12. Mikroskopēšanas rezultātus apkopo darba protokolā.

Krāsošanas pēc Grama shēma Nr. 5



Priekšmetstikliņa sterilizācija
liesmā

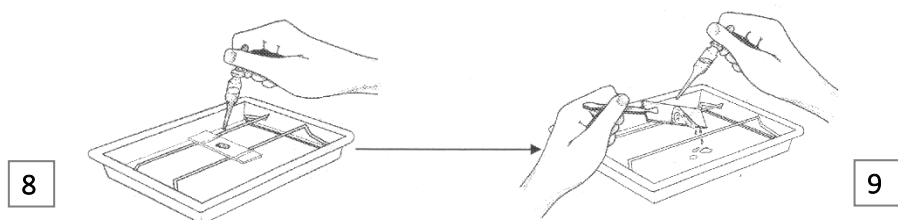
Priekšmetstikliņa novietošana uz paliktņa un cilpiņas sterilizācija



Izejmateriāla mēģenes atvēršana un
materiāla paņemšana

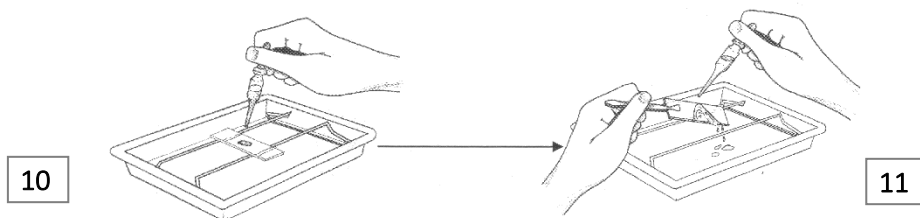
Parauga uznešana
uz priekšmetstikliņa

Uztriepes fiksācija
liesmā



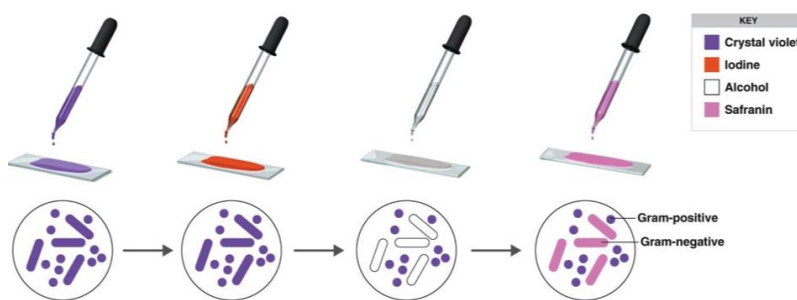
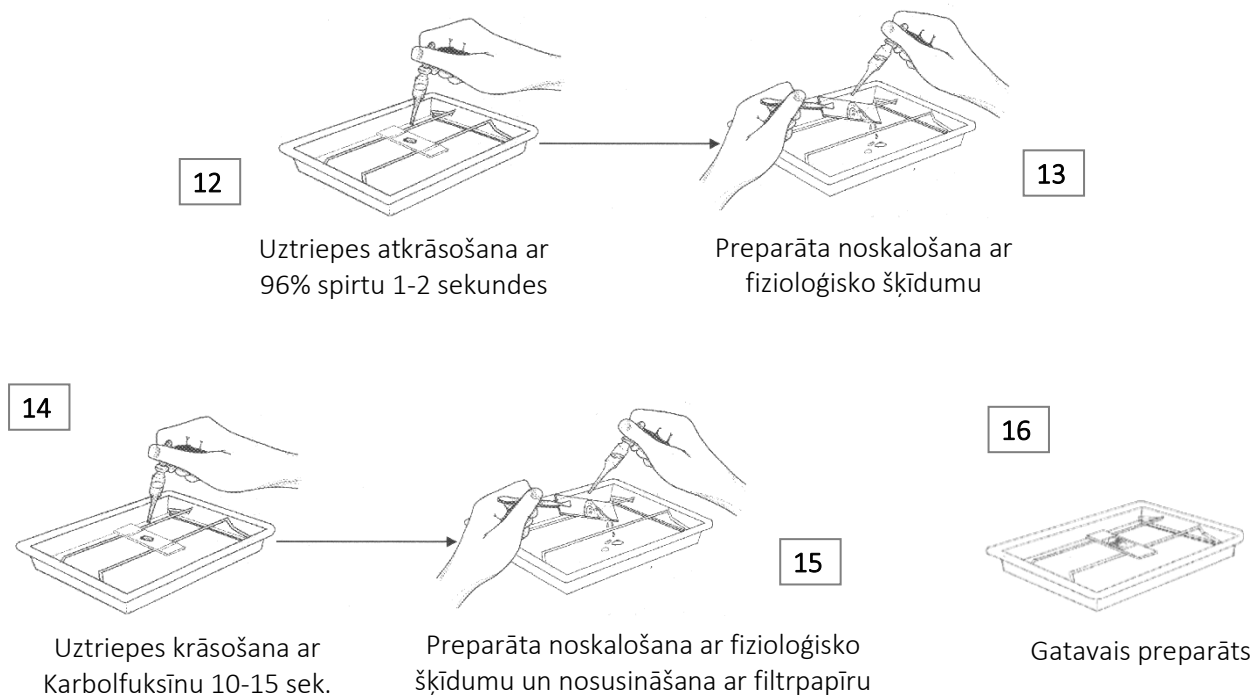
Uztriepes krāsošana ar kristālvioleto
1 min

Preparāta noskalošana ar
Lugola šķīdumu



Uztriepes krāsošana ar Lugola
šķīdumu 2min.

Preparāta noskalošana ar
96% spirtu



23. att. Krāsošanas pēc Grama metodes rezultātu shematisks attēlojums

Sporu krāsošanas metode (Sporu krāsošanas shēma nr. 6)

Bacillus, *Clostridium* ģints baktērijas veido endosporas, kuras izmantojot iepriekš aprakstītās krāsošanas metodes nekrāsojas. Izmantojot sporu krāsošanas metodi, tās nokrāsojas zaļas, bet veģetatīvās šūnas – sarkanas.

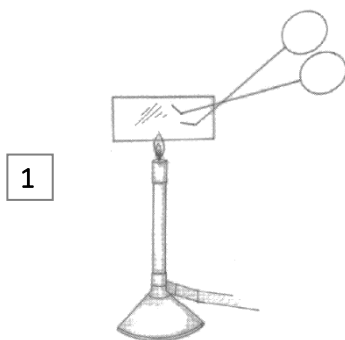
Preparātu gatavošanas process:

1. Priekšmetstikliņu un segstikliņu sterilizē liesmā;
2. Uz sterila priekšmetstikla ar sterilu pipeti vai cilpu uznes pilienu no suspensijas vai agarizētas barotnes, kurā kultivēti mikroorganismi. Gatavojot preparātu no agarizētas barotnes vispirms uz priekšmetstikliņa jāuznes 1 piliens fizioloģiskā šķīduma, kurā pēc tam ienes materiālu ar mikroorganismiem;
3. Izmantojot segstikliņa vienu malu sagatavo uztriepi izvelkot pilienu pa priekšmetstikliņu. Jo plānāka uztriepe, jo kvalitatīvāks izdodas preparāts;
4. Gaisā nožāvētu sagatavotā materiāla uztriepi intensīvi nofiksē liesmā 20 reizes izvelkot caur spirta lampiņas vai gāzes degļa liesmu;
5. Uztriepi pārklāj ar piesātinātu malahītzalā krāsas šķīdumu un krāso 10 minūtes;
6. Noskalo ar ūdensvada ūdeni;
7. Preparātu krāso ar 0.25% safranīna šķīdumu 10 sekundes;
8. Rūpīgi noskalo ar ūdeni un nožāvē;
9. Izmantojot filtrpapīru nosusina sagatavoto preparātu un apskata mikroskopā;
10. Sagatavoto preparātu mikroskopē un nosaka mikroorganismu veidu;
11. Mikroskopēšanas rezultātus apkopo darba protokolā.

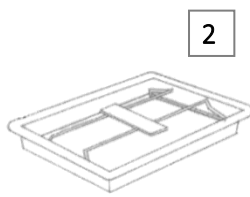
Alternatīva metode:

1. Priekšmetstikliņu un segstikliņu sterilizē liesmā;
2. Uz sterila priekšmetstikla ar sterilu pipeti vai cilpu uznes pilienu no suspensijas vai agarizētas barotnes, kurā kultivēti mikroorganismi. Gatavojot preparātu no agarizētās barotnes vispirms uz priekšmetstikliņa jāuznes 1 piliens fizioloģiskā šķīduma, kurā pēc tam ienes materiālu ar mikroorganismiem;
3. Izmantojot segstikliņa vienu malu sagatavo uztriepi izvelkot pilienu pa priekšmetstikliņu. Jo plānāka uztriepe, jo kvalitatīvāks izdodas preparāts;
4. Kultūras uztriepi nožāvē gaisā un fiksē liesmā;
5. Uztriepi pārklāj ar malahītzālā šķīdumu (5% ūdens šķīdumu) un uzmanīgi iztur nelielā liesmā lai parādās tvaiki – sekojot lai uztriepe neiekalstu, papildina krāsvielu un krāso 3 minūtes;
6. Krāsu ļoti rūpīgi noskalo ar ūdeni;
7. Uztriepi papildus krāso ar 0,5% safranīna šķīdumu (gatavotu ūdenī) 30 sekundes;
8. Rūpīgi noskalo ar ūdeni un nožāvē;
9. Izmantojot filtrpapīru nosusina sagatavoto preparātu un apskata mikroskopā;
10. Sagatavoto preparātu mikroskopē un nosaka mikroorganismu veidu;
11. Mikroskopēšanas rezultātus fiksē darba protokolā.

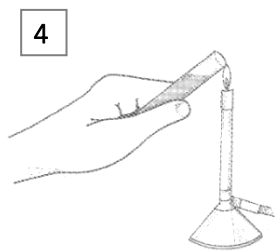
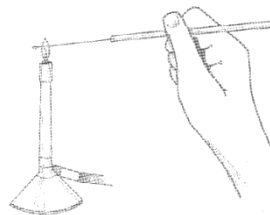
Sporu krāsošanas shēma Nr. 6



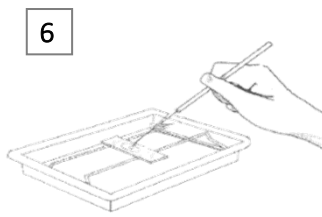
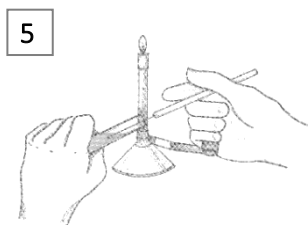
Priekšmetstikliņa
sterilizācija liesmā



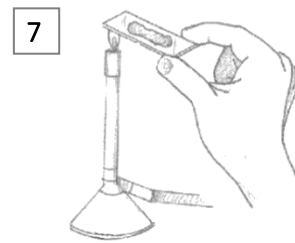
Priekšmetstikliņa novietošana uz paliktņa un cilpiņas sterilizācija



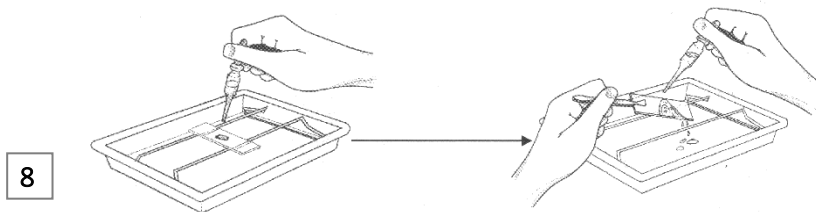
Izejmateriāla mēģenes atvēršana un
materiāla paņemšana



Parauga uznešana
uz priekšmetstikliņa

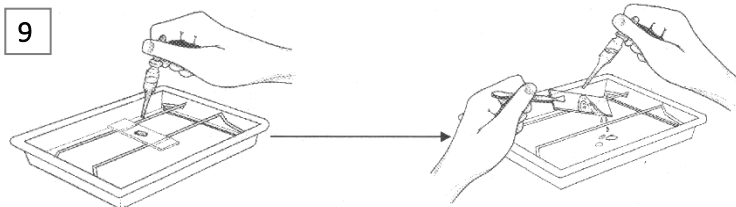


Uztriepes fiksācija
liesmā 20 reizes

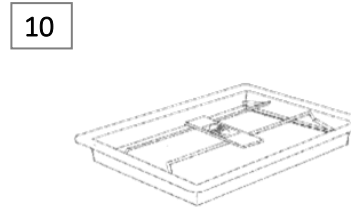


Parauga krāsošana ar
malahītzāļo 10 minūtes

Noskalošana ar ūdeni



Parauga krāsošana ar 0.25% safranīna šķīdumu 10 sekundes
Noskalo ar ūdeni un nosusina ar filtrpapīru



Gatavais preparāts

3.3 MIKROORGANISMU IZMĒRU NOTEIKŠANA

Lai noteiktu mikroorganismu lielumu izmanto okulārmikrometru. Lai izmērītu mikroorganismu lielumu nepieciešams noteikt okulārmikrometra iedaļas vērtību. To nosaka izmantojot objektīvmikrometru.

Objektīvmikrometrs ir metālā plāksnīte, kuras izmēri ir identiski priekšmetstikliņa lielumam. Objektīvmikrometra malas, kas atrodas stikla ietvarā ir 1 mm garumā un skala sadalīta 100 iedaļās. Vienas iedaļas vērtība ir 10 μm (1 mm = 1000 μm, 1000 : 100 = 10 μm).

Okulārmikrometrs – apaļa stikla plāksnīte, kuras centrā ir skala ar iedaļām. Skalas garums 5 mm un tā sadalīta 50 iedaļās.

Okulārmikrometra iedaļas vērtības noteikšana:

1. Savieno vienā punktā okulārmikrometra un objektīvmikrometra iedaļas, lai tās sakristu;

2. Saskaita, cik objektīvmikrometra iedaļām atbilst okulārmikrometra iedaļas;
3. Aprēķina vienas okulārmikrometra iedaļas vērtību.

Aprēķina piemērs:

5 objektīvmikrometra iedaļās ietilpst 30 okulārmikrometra iedaļas. Viena iedaļas vērtību aprēķina pēc formulas:

$$v = \frac{a \cdot 10}{b}, \text{ kur}$$

v – okulārmikrometra iedaļas vērtība (μm);

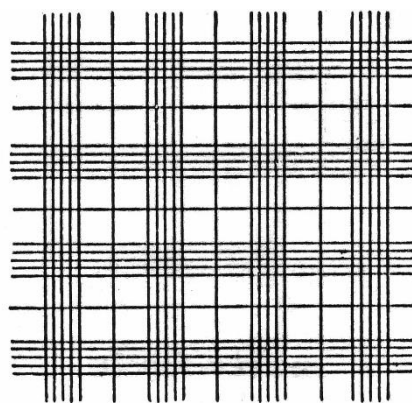
a – objektīvmikrometra iedaļas;

b – okulārmikrometra iedaļas.

Alternatīva – mikroorganisma izmērus nosaka ar *Leica Application Suite* (LAS) (Leica Microsystems, Vācija) datorprogrammu.

3.4 MIKROORGANISMU SKAITA NOTEIKŠANA AR GORJAJEVA KAMERU

Gorjajeva kameru izmanto mikroorganismu skaita noteikšanai tīrkultūras suspensijā. Gorjajeva kamera ir biezs priekšmeta stikls, kura vidusdaļā šķērsām izdobtas četras renītes, starp kurām atrodas plāksnītes. Vidējā plāksnīte, ko īpašā renīte pārdala uz pusēm, ir par 0,1 mm zemāka nekā malējās. Tāpēc, pārsedzot kameru ar segstikliņu, izveidojas mikrotelpa, kuras dziļums ir 0.1 mm. Uz vidējās plāksnītes abu pušu virsmām stiklā iegravēts tīkliņš (24. att.). Tīkliņš sastāv no 225 (15×15) kvadrātiem. Katrs trešais kvadrāts sadalīts 16 mazos kvadrātiņos. Tīkliņā ir 25 šādi kvadrāti. Mazā kvadrātiņa mala ir 1/20 mm, tā tilpums 1/4000 mm³.



24. att. Gorjajeva kamera

Darba gaita mikroorganismu skaita noteikšanai ar Gorjajeva kameru:

1. No izejmateriāla (maizes rauga *S. cerevisiae*, vīna rauga *S. vini*, alus rauga *S. carlsbergensis*) sagatavo atšķaidījuma suspensiju 1:100, t.i., 1 g rauga ievieto 99 ml sterila fizioloģiskā šķīduma un 2 minūtes maisa,
2. Ar sterilu cilpiņu sagatavoto suspensiju uznes uz Gorjajeva kameras abiem sektoriem un fiksē ar segstikliņa palīdzību,
3. Nostāda mikroskopu, lai skaidri būtu saskatāms kameras tīkliņš,

4. Rauga šūnas skaita 5 kvadrātos, kuri ir sadalīti mazajos kvadrātiņos (t.i. 80 mazajos) pa kameras tīkliņa diagonāli. Šim nolūkam redzes lauka kreisajā augšējā stūrī atrod lielo sadalīto kvadrātu un saskaita tajā redzamās šūnas. Pēc tam pārbīdot kameru pa diagonāli uz leju un atrod nākamo sadalīto kvadrātu, saskaita vēlreiz tā atkārtojot 5 reizes. Lai divreiz nesaskaitītu vienas un tās pašas šūnas, jāievēro šāds noteikums: skaita tās šūnas, kas atrodas mazajos kvadrātos, bet ja šūnas atrodas uz kvadrāta malas, tad pieskaita tikai uz divām malām, piemēram, uz kreisās un augšējās malas esošās šūnas, ja vismaz puse šūnas atrodas kvadrātā,

5. Šūnu skaita daudzumu 1 ml suspensijas aprēķina pēc formulas:

$$X = \frac{a \cdot 1000}{S \cdot h \cdot n}, \text{ kur}$$

X – šūnu skaits 1 ml suspensijas;

a – vidējais aritmētiskais šūnu skaits 5 lielos vai 16 mazos kvadrātos;

1000 – pārrēķina koeficients;

S – kameras laukums, mm² (lielais – 1/25 mm², mazais – 1/400 mm²)

h – kameras dziļums, mm (0.1 mm);

n – kvadrātu skaits.

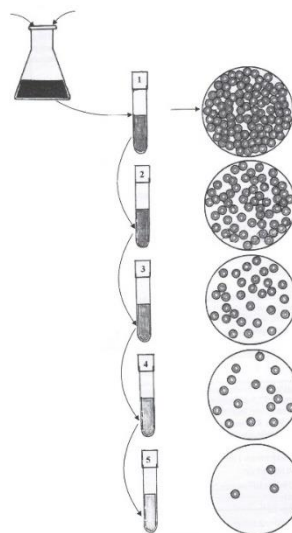
3.5 TĪRKULTŪRU IEGUVES METODES

Mikroorganismu morfoloģisko un fizioloģisko īpašību izpēte ir iespējama tikai tad, kad ir iegūta tīrkultūra. Tīrkultūru ieguvei no materiāla, kas satur dažādus mikroorganismus izmanto atšķaidījuma metodi un pilienu jeb Lindnera metodi.

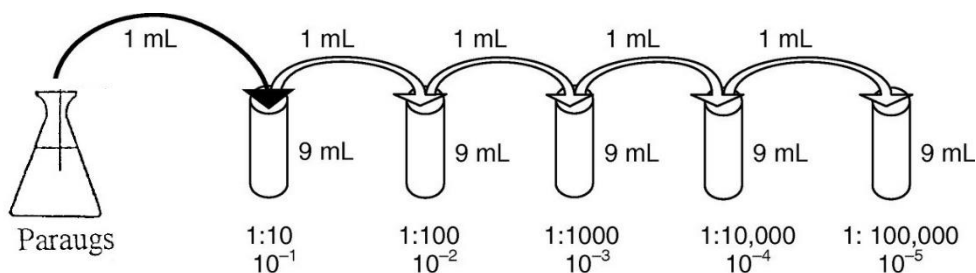
Tīrkultūras izolēšana ar atšķaidījuma metodi

Darba gaita:

1. No izejmateriāla gatavo atšķaidījumu atbilstoši shēmai 25. attēlā.
2. No sagatavotajiem atšķaidījumiem gatavo mikroskopēšanas preparātu un izvērtē šūnu daudzumu attiecīgā atšķaidījumā (26. att.).
3. No pēdējā atšķaidījuma ar vismazāko šūnu skaitu veic uzsējumus 0.1, 0.001 un 0.001 ml apjomā uz agarizētas barotnes.
4. Uzsējumus inkubē termostatā:
 - » raugu izolēšanai: iesala ekstrakta agara barotne (*Malt Extract agar*) 25 °C, 48 h;
 - » baktēriju izolēšanai 30 °C: gaļas peptona agara (*Nutrient agar*) 48 h vai PCA barotne 72h h.
5. Izvērtē izolēto tīrkultūru kvalitāti, nosakot:
 - » šūnu aktivitāti;
 - » šūnu attīstības fāzi.
6. Iegūtos rezultātus apkopo secinājumu veidā.



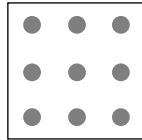
26. att. Tīrkultūras izolācijas shēma



25. att. Tīrkultūra atšķaidījumu gatavošanas shēma

Tīrkultūras ieguve no vienas šūnas – Lindnera metode

1. No rauga suspensijas gatavo atšķaidījumu sterilā neapiņotā misā pēc iepriekšējās shēmas 25. un 26. attēlā;
2. Gatavo mikroskopēšanas preparātu no sagatavotajiem atšķaidījumiem, tos izvērtē un izvēlas atšķaidījuma pakāpi, kurā ir vismazākais šūnu skaits;
3. No izvēlēta atšķaidījuma ar sterilu cilpiņu uz segstikliņa uznes 9 pilienus (27. att.);
4. Segstikliņu ar pilieniem uz leju novieto uz priekšmetstikliņa ar iedobi centrā tā, lai pilieni nesaplūstu un atrastos brīvi iedobē. Pilieni nedrīkst saplūst, tiem jāveido brīvi „karājošos” pilienus dobumā;
5. Katru pilienu mikroskopē un sameklē pielienu, kurā ir viena mikroorganismu šūna;
6. Pilienu ar vienu šūnu atzīmē;
7. Preparātu ievieto Petri platē, kurā ievietots ar sterilu ūdeni samitrināts filtrpapīrs. Pilienu ar sterilu filtrpapīra trīsstūrīti noņem un ievieto mēģenē ar sterilu iesala ekstrakta agara (*Malt Extract agar*) barotni;
8. Preparātu iztur termostatā 25 °C temperatūrā 24-48 h.



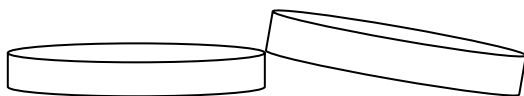
27. att. Pilienu izvietošana uz priekšmetstikliņa

4 Pārtikas ražošanas tehnoloģiskā procesa sanitāri – higiēniskā kontrole

4.1 GAISA MIKROBIOLOĢISKĀ KONTROLE

Pasīvā gaisa testēšana – sedimentācijas metode

1. Pelējumu, raugu un MAFAM noteikšanai gaisā ūdens vannā izšķīdina sterilās agarizētās barotnes (gaļas peptona agara (*Nutrient agar*) vai PCA barotni baktēriju noteikšanai, iesala ekstrakta agara (*Malt Extract agar*) barotni pelējumu, raugu noteikšanai);
2. Atšķīdinātās barotnes ielej Petri platēs tā, lai tiktu nosepta visa Petri plates pamatne;
3. Petri plates ar sacietējušu barotni noliek uz stabilas virsmas un atvērtas iztur 5 minūtes. Atvēršanas laikā vāciņa malai jābūt uz pamatnes malas, lai neaizsegtu daļu barotnes, jo aprēķinos jāizmanto plates laukums (28. att.).



28. att. Petri plates atvēršanas veids

4. Uzsējumus ievieto termostatā ar vāciņu uz leju, lai uz barotnes nenokļūtu kondensāta mikropilieni, kā rezultātā var veidoties sekundārās mikroorganismu kolonijas un iegūtie rezultāti būs neprecīzi. Plates inkubē

termostatā 30±1 °C temperatūrā baktēriju noteikšanai pēc 48 h vai 72 h, un 25±1 °C temperatūrā raugu noteikšanai pēc 48 h un pelējumu noteikšanai pēc 3-5 dienām.

5. Iegūtos rezultātus apkopo darba protokolā;
6. MAFAM (mezofili aerobos fakultatīvi anaerobos mikroorganismus) nosaka, saskaitot Petri platē izaugušās kolonijas un aprēķinot pēc formulas:

$$X = \frac{a \cdot \tau \cdot 10}{S} \cdot 100, \text{ kur}$$

X – MAFAM koloniju veidojošo vienību skaits 1 m³ gaisā;

a – izaugušo koloniju skaits Petri platē;

τ – Petri plates atvēršanas laiks, min.;

S – Petri plates pamatnes laukums, cm²;

10 – vidējais gaisa tilpums, kas noplūst uz Petri plates, virsmas atvēršanas laikā;

100 – pārrēķina koeficients uz 1 m³ gaisa.

7. Mikroorganismu apskatei sagatavo nekrāsotus preparātus.
8. Iegūtos rezultātus apkopo darba protokolos.

Aktīvā gaisa testēšana

Mikroorganismu daudzumu gaisā nosaka izmantojot gaisa testētāju (*microbiological air sampler*, 29. att.)

1. Sagatavo Petri plates kā iepriekš punktā 1. un 2.,
2. Petri plati ievieto iekārtā, iestata nepieciešamo caurplūstošā gaisa daudzumu (parasti 1 m³) un ar START pogu uzsāk gaisa filtrēšanu caur Petri plati,
3. Turpina kā punktos 4., 5., 6. un 7.



29. att. Gaisa testētājs SAS Super 180

4.2 ŪDENS MIKROBIOLOĢISKĀ KONTROLE

Ūdens mikrobioloģiskā kvalitāte ir viena no svarīgākajiem rādītājiem ne tikai dzeramā ūdens fasētājiem, bet arī jebkurā pārtikas produktu ražošanas tehnoloģiskajā procesā. Dzeramā ūdens obligātās nekaitīguma un kvalitātes prasības

nosaka LR MK noteikumi Nr. 671/2017, kuros noteikti dzeramā ūdens obligātās nekaitīguma un kvalitātes prasības mikrobioloģiskie rādītāji, kā arī izmantojamās standartu metodes to noteikšanai (2. un 3. tabula).

2. tabula

Dzeramā ūdens obligātās nekaitīguma un kvalitātes prasības (LR MK noteikumi Nr. 671/2017)

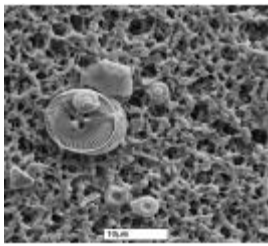
Nr.p.k.	Rādītājs	Maksimāli pieļaujamā norma
1.1.	Ūdensvada ūdenim:	
1.1.1.	<i>Escherichia coli</i>	0/100 ml
1.1.2.	enterokoki	0/100 ml
1.2.	Ūdenim, kas pildīts tirgošanai pudelēs vai citos traukos:	
1.2.1.	<i>Escherichia coli</i>	0/250 ml
1.2.2.	enterokoki	0/250 ml
1.2.3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0/250 ml
1.2.4.	mikroorganismu koloniju skaits (KVV) 22 °C	100/ml
1.2.5.	mikroorganismu koloniju skaits (KVV) 37 °C	20/ml

3. tabula

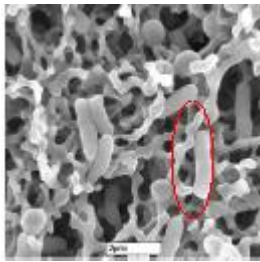
Dzeramā ūdens nekaitīguma un kvalitātes rādītāju noteikšanas metodes (LR MK noteikumi Nr. 671/2017)

Nr.p.k.	Rādītājs	Metode
1.1.	koliformas baktērijas un <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	LVS EN ISO 9308-1, LVS EN ISO 9308-2
1.2.	enterokoki	LVS EN ISO 7899-2
1.3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LVS EN ISO 16266
1.4.	mikroorganismu koloniju skaits (KVV) 22 °C	LVS EN ISO 6222
1.5.	mikroorganismu koloniju skaits (KVV) 36 °C	LVS EN ISO 6222
1.6.	<i>Clostridium perfringens</i> (ieskaitot sporas)	LVS EN ISO 14189

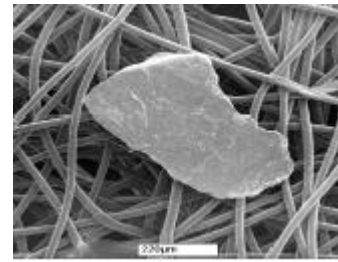
Dzeramā ūdens mikrobioloģisko analīzi veic izmantojot membrānfiltrācijas metodi – filtrēšanas iekārtā MILIPORE. Filtrs ir caurlaidīga barjera, kas ļauj aizturēt suspendēto fāzi šķidruma plūsmā, kuru virza spiedienu starpība starp sūkni un filtru. MILIPORE iekārtā tiek izmantoti membrānfiltri, kuru efektivitāte ir > 99.9999999% dotajam poru izmēram.



Kizilgurs uz 0.45 µm *Durapore* membrānas



E. coli baktērija uz celulozes esteru membrānas



Smilts graudiņi uz rupja šķiedru priekšfiltra

Ūdens mikrobioloģiskā analīzes veikšanas gaita

1. Dzeramā ūdens parauga ņemšana:
 - » Sterilā traukā tiek ņemts paraugs 1 l apjomā. Ja ūdens paraugu ņem no ūdensvada krāna, tad ūdens tiek notecināts 10 minūtes.
 - » Aizver krānu un to sterilizē ar spirtā samērcētu un aizdedzinātu vates tamponu.
 - » Sterilā traukā ņem ūdens paraugu 1 l apjomā.
2. Ūdens vannā izšķīdina sterilās agarizētās barotnes:
 - » Koliformas baktēriju un *E. coli* noteikšanai – Endo barotni;
 - » Enterokoku noteikšanai – Endo barotni;
 - » *Pseudomonas aeruginosa* noteikšanai – Caso agara vai *Pseudomonas* agara barotni;
 - » Mikroorganismu koloniju skaita (KVV) 22 °C noteikšanai – gaļas peptona agara (*Nutrient agar*) vai PCA barotni;
 - » *Clostridium perfringens* (ieskaitot sporas) noteikšanai – SPS (sulfīta polimiksīna sulfadiazīna) agara barotni.
3. Izmantojot vakuuma sūkni, 100 ml paraugs tiek izfiltrēts caur sterilu membrānfiltru 0.45 µm. Mikroorganismi tiek aizturēti uz membrānas virsmas (30. att.).
4. Membrānfiltru pārliek uz sagatavotās barotnes un inkubē atbilstošā temperatūrā:
 - » koliformas baktērijas un *E. coli* – 37°C, 24 h;
 - » enterokoki – 37°C, 24 h;
 - » *Pseudomonas aeruginosa* – 27°C, 72 h;
 - » mikroorganismu koloniju skaits (KVV) 22–30 °C, 48 h;
 - » *Clostridium perfringens* (ieskaitot sporas) – 35°C, 48 h.
5. Rezultātu apkopojums:
 - » Koliformu baktēriju, *Escherichia coli* (*E. coli*) un enterokoku mikroskopēšanai sagatavo

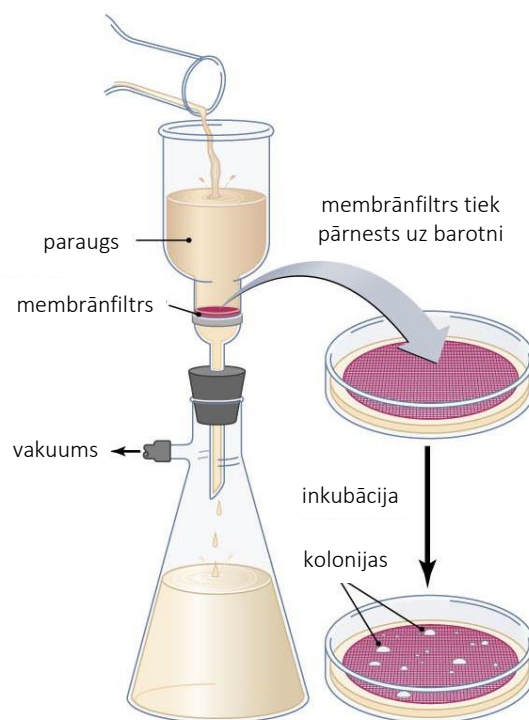
krāsotos preparātus pēc Grama metodes (shēma Nr. 5).

- » *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* baktēriju apskatei sagatavo krāsot preparātus izmantojot fiksētās krāsošanas metodi (shēma nr. 4);
- » MAFAM nosaka, saskaitot Petri platē izaugušās kolonijas un aprēķinot pēc formulas:

$$X = \frac{a \cdot b}{c}, \text{ kur}$$

X – MAFAM skaits 1 ml ūdens;
 a – izaugušo koloniju skaits Petri platē;
 b – atšķaidījuma pakāpe;
 c – uzsēto Petri plašu skaits.

- » legūtos rezultātus apkopo darba protokolos.



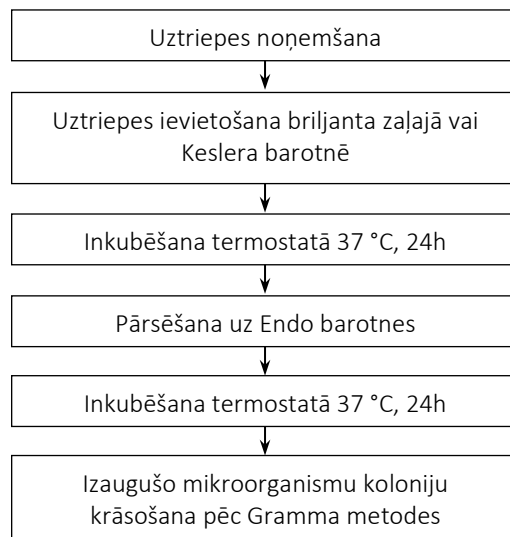
30. att. Membrānfiltrācijas princips

4.3 APKALPOJOŠĀ PERSONĀLA UN IEKĀRTU SANITĀRI – HIGIĒNISKĀ KONTROLE

- » Veicot sanitāri higiēnisko pārbaudi apkalpojošajam personālam nosaka tikai *Escherichia coli* klātbūtni. Paraugus analizēm noņem no vietām, kas ir saskarsmē ar pārtikas produktiem: rokām un apakšdelma, darba apģērbu – priekšauta, cimdiem vai iepakojamā materiāla 25×25 cm² laukumā;
- » Slēgto tehnoloģisko līniju mikrobiālo tīrību pārbauda noņemot paraugu no pēdējiem skalojamiem ūdeņiem 1 l apjomā. Paraugam nosaka *E. coli* klātbūtni un MAFAM;
- » Iekārtu virsmām noņem uztriepi 25×25 cm² vai 50×50 cm² laukumā:
 - ✓ Uztriepi noņem ar irbulīti, kura galā ir vates tampons, kas samērcēts briljanta zaļā vai Keslera barotnē. Mēģeni ar barotni ievieto termostātā 37 °C temperatūrā 24 stundas;
 - ✓ Pēc 24 h nosaka vai ir sācies rūgšanas process un barotnei mainījusies krāsa. No mēģenēm, kurās novērotas minētās izmaiņas veic uzsējumus uz Endo barotnes;
 - ✓ Uzsējumus ar Endo barotni ievieto termostātā 37 °C temperatūrā 24 stundas;

- ✓ Pēc 24 h izvērtē izaugušās mikroorganismu kolonijas un ja tās ir tumši sarkanas ar metālisku spīdumu veic krāsojumu pēc Grama metodes (shēma nr. 5);
- ✓ Iegūtos rezultātus apkopo darba protokolos.

Apkalpojošā personāla un iekārtu sanitāri – higiēniskās kontroles shēma



4.4 PĀRTIKAS UZŅĒMUMĀ IZMANTOJAMĀS EKSPRESMETODES

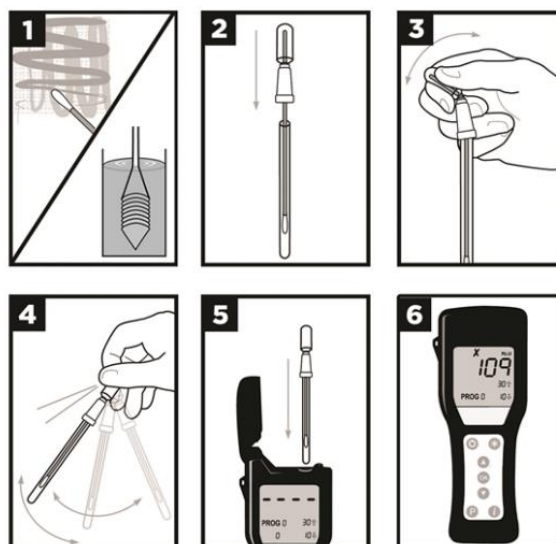
KOPĒJĀ TĪRĪBAS LĪMEŅA KONTROLE

Luminometrs - inovatīvs higiēnas monitorings ar ATM/AMF mērījumu

ATF (adenozīntrifosfāts) ir organiska molekula, ko dzīvās šūnas izmanto kā galveno enerģijas avotu. Augu, dzīvnieku un mikroorganismu (baktērijas, pelējumi un raugi) šūnas producē un izmanto ATF bioloģisko procesu nodrošināšanai. ATF klātbūtne uz virsmas norāda uz kādas bioloģiskas vielas klātbūtni, tātad virsma nav pietiekami tīra.

ATF reakcijā ar luciferāzes/luciferīna reaģentu izdala gaismu tieši proporcionāli ATF daudzumam paraugā. Ar luminometru (31. att.) nosaka izdalītās gaismas daudzumu (luminiscences pakāpi), kuru displejā parāda relatīvajās gaismas vienībās (RLU). RLU nosaka tīrības pakāpi. Jo augstāks ir bioluminescences līmenis, jo augstāka ir piesārņojuma pakāpe.

Atkarībā no izmantotā testa mēģenes veida, iespējams izvērtēt mikrobioloģisko piesārņojumu un proteīnu vai citu vielu atliekas uz virsmām vai ūdenī.

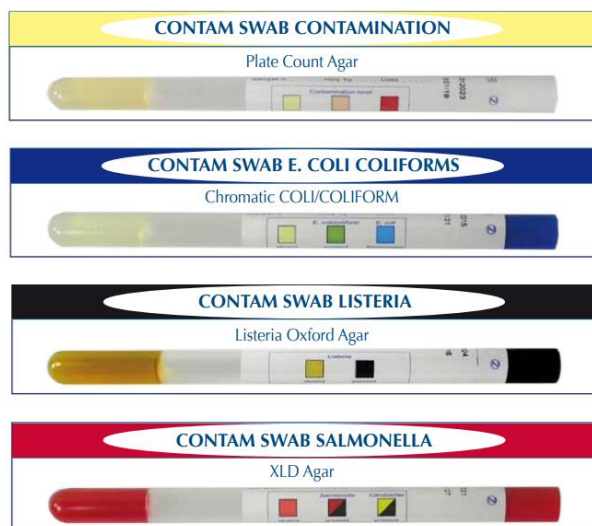


31. att. Analīzes veikšana ar luminometru *Hygiena*

1 – noņem paraugu no virsmas ar speciālu sterilu tamponu, 2 – ievieto to testa mēģenē, 3 – pārlauž augšējo daļu, saspiež šķidro reaģentu, lai tas samērcē tamponu, 4 – sakrata mēģeni 5 sekundes, 5 – ievieto testa mēģeni luminometrā, 6 – pēc 15 sekundēm nolasa rezultātu

Contam swab virsmu testi *Liofilchem*®

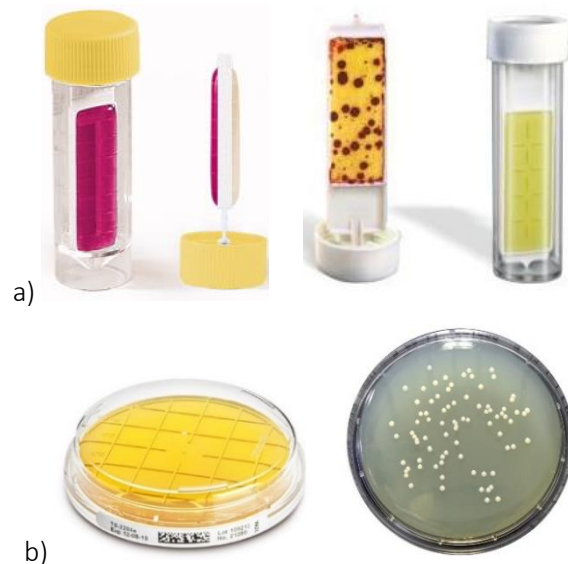
Mēģeņu testi ar agaru paredzēti mikrobiālā piesārņojuma novērtēšanai (mikroorganismu skaits) un identificēšanai tieši no darba virsmām (32. att.), metodes jutība <10 KVV. Sterilu tamponu samērcē sterilā fizioloģiskā šķīdumā, noņem paraugu no virsmas, ievieto mēģenē ar agaru. Inkubē norādītajos apstākļos (18-24 h, t° atkarībā no barotnes). Uz pozitīvu reakciju norāda krāsas maiņa.



32. att. *Liofilchem*® contam swab virsmu testi

Vides monitoringa kontaktplates

Kontaktplates izmanto virsmu un ūdens mikrobioloģiskās tīrības kontrolei (33. att.). Tās ir vienkopusējas vai divpusējas. Kontaktplate satur jau iepriekš sagatavotu attiecīgo barotni. Ar to noņem paraugu no virsmas stingri uzspiežot, tad inkubē noteiktajos apstākļos un nolasa rezultātu saskaņā ar ražotāja norādījumiem.



33. att. Dažādu veidu kontaktplates:
a) *dip slide* tipa, b) plašu tipa.

ŪDENS KVALITĀTES TESTĒŠANA

Colilert-18/Quanti-Tray (ISO 9308-2:2012) metode kopējo koliformu un *E. coli* noteikšanai ūdenī

Klātbūtne

1. Ūdens paraugam, kas ieliets caurspīdīgā pudelītē, pievieno reaģentu un inkubē $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 18 h,
2. Nolasa rezultātu (34. att.) – caurspīdīgs = negatīvs rezultāts, dzeltens = kopējo koliformu klātbūtne, dzeltens un fluorescents = *E. coli* klātbūtne



34. att. Colilert-18 testa rezultāti

Skaitis

1. Ūdens paraugam pievieno reaģentu,
3. Paraugu ielej Quanti-Tray platē (35. att.), aizkausē un inkubē $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 18 h,
4. Nolasa rezultātu – caurspīdīgs = negatīvs rezultāts, dzeltens = kopējo koliformu klātbūtne, dzeltens un fluorescents = *E. coli* klātbūtne,
5. Saskaita pozitīvos rezultātus un pēc tabulas nolasa kopējo koliformu un *E. coli* skaitu.



35. att. Quanti-Tray plate, dzeltenā krāsa norāda uz kopējo koliformu klātbūtni

5 Atšķaidījumu gatavošana

Atšķaidījumus gatavo mikroorganismu daudzuma noteikšanai pārtikas produktiem, turklāt jāizvēlas tāda atšķaidījuma pakāpe, lai Petri platē koloniju skaits būtu no 50–200, pieļaujamā maksimālā robeža 300 KVV. Pārtikas produktus nosver, ievieto maisiņā ar filtru un homogenizē ar fizioloģisko šķīdumu homogenizatorā. Homogenizēšanas laiku un ātrumu izvēlas atkarībā no produkta konsistences – cietākam un biezākam paraugam nepieciešams ilgāks laiks un lielāks ātrums. Rezultātā jāiegūst viendabīga suspensija, no kuras gatavot uzsējumus.

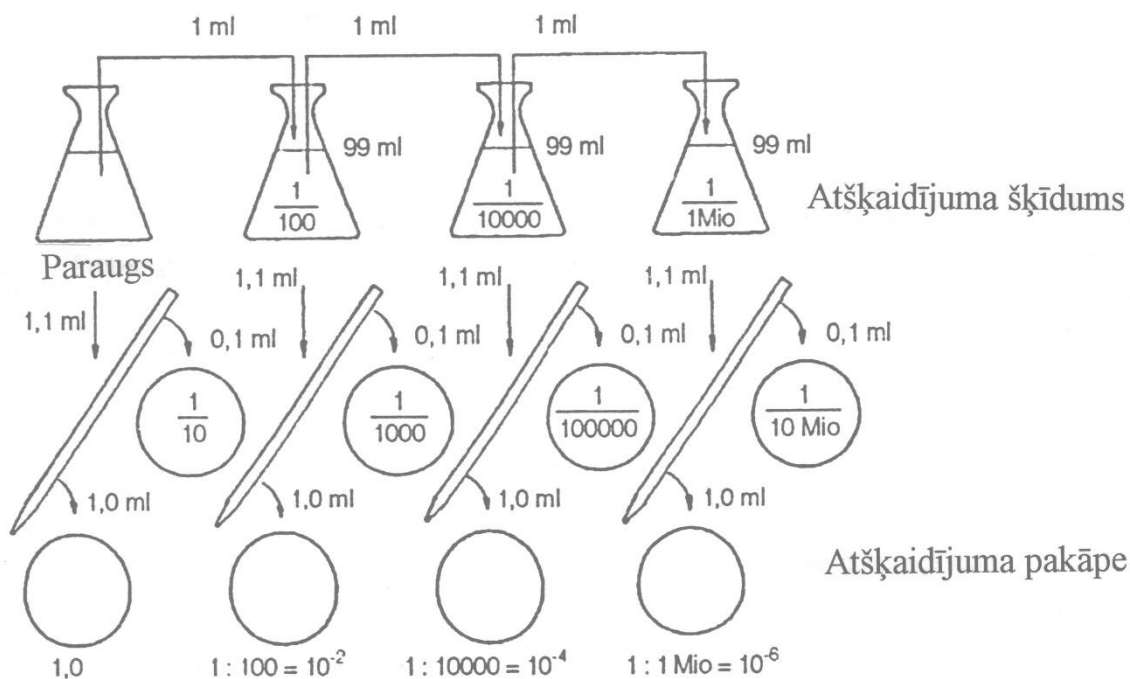
Uzsējumu sagatavošana:

1. Ja nepieciešams sagatavo analizējamā produkta atšķaidījumu (skatīt atšķaidījuma gatavošanas shēmu Nr. 7, Nr. 8 vai Nr. 9);
2. Atkausē iepriekš sagatavotas sterilas agarizētās barotnes un sagatavo Petri plates;
3. Ar sterilu pipeti uz 2 Petri platēm uznes 1 ml produkta vai tā atšķaidījumu.

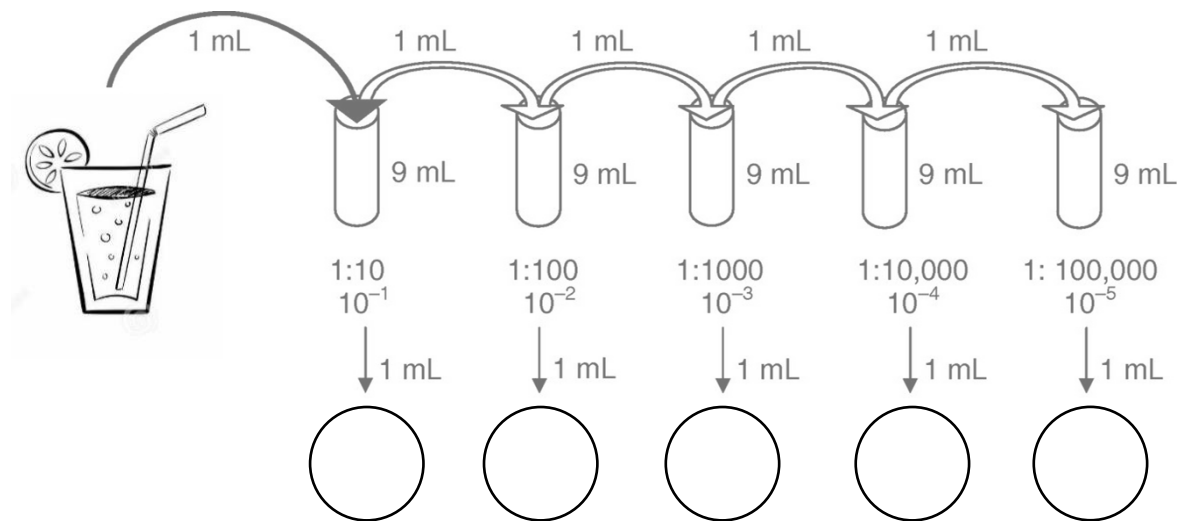
ievēro!

- ✓ 1 ml atšķaidījuma pakāpē 10^{-1} atbilst 0.1 g vai 0.1 ml produkta.
- ✓ Ja uzsējumu veic no vairākām atšķaidījuma pakāpēm, tad ar vienu pipeti drīkst ņemt paraugu sākot no lielākā atšķaidījuma:
 $10^5 \longrightarrow 10^4 \longrightarrow 10^3 \longrightarrow 10^2 \longrightarrow 10$
- ✓ Pēc pārtikas produkta attiecīgās atšķaidījuma pakāpes uznesto materiālu rūpīgi izklidē (sajauc) Petri platē ar 12-15 ml agarizētas barotnes, kas iepriekš atšķīdināta ūdens vannā un atdzesēta līdz 47 °C.
- ✓ Ja nosaka aerobos mikroorganismus, tad pirmkārt uzlej uz Petri plates barotni, lai tā sacietētu un pēc tam uzsēj sagatavoto produkta atšķaidījumu.
- ✓ Ja produktos nosaka mezofilos aerobos un fakultatīvi anaerobos mikroorganismus (MAFAM), tad pirmkārt uz Petri platēm uznes sagatavoto atšķaidījumu, pēc tam materiālas uzlej atšķīdinātu un atdzesētu barotni.

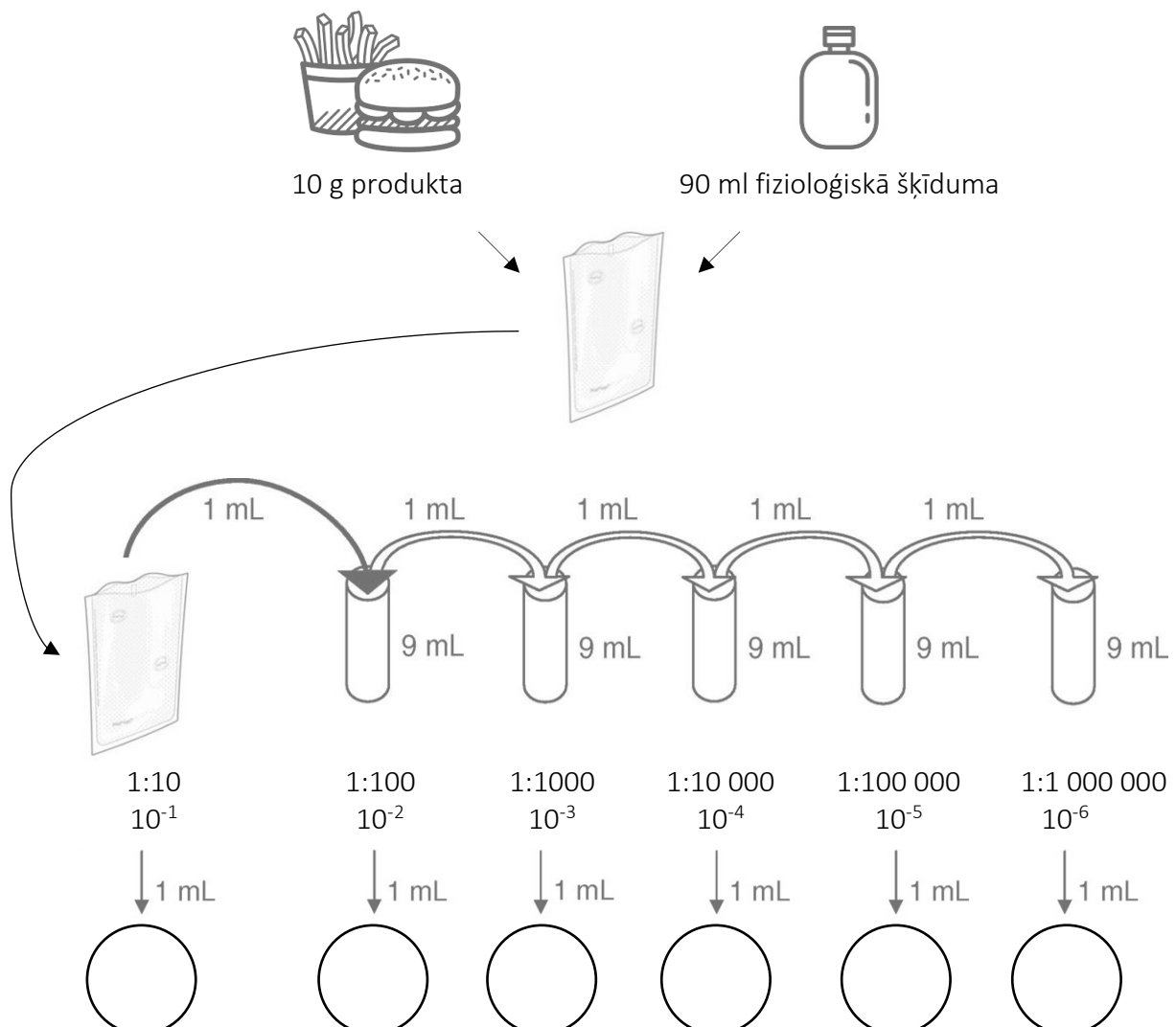
Atšķaidījuma gatavošanas no šķidriem produktiem shēma Nr. 7 (atšķaidījums pudelītēs)



Atšķaidījuma gatavošanas no šķidriem produktiem shēma Nr. 8
(atšķaidījums mēģenēs)



Atšķaidījumu gatavošana no šķidriem un sausiem produktiem shēma Nr. 9
(atšķaidījums mēģenēs)

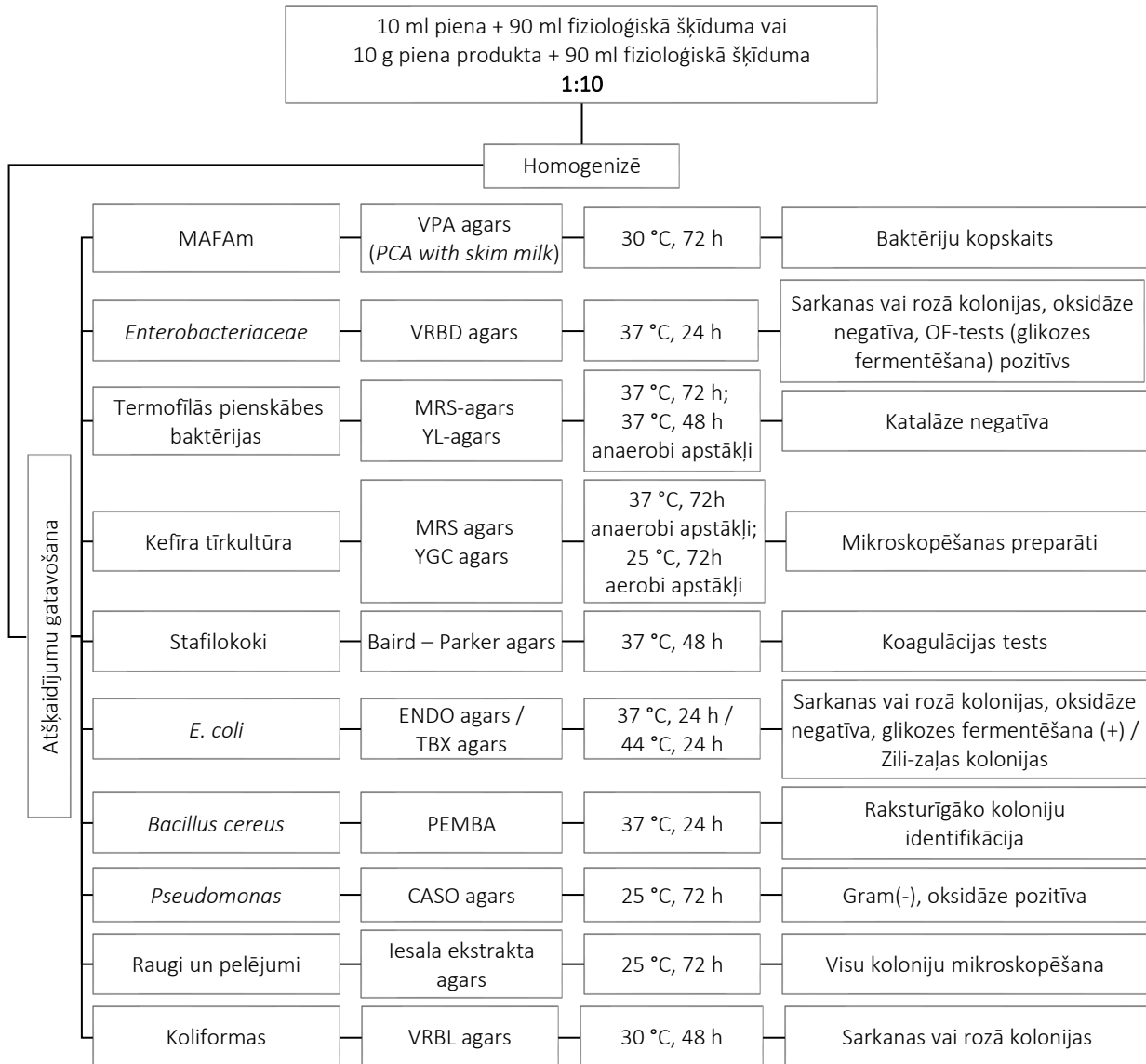


6 Piena produktu mikrobioloģiskā kontrole

Mikroorganismi	Pasterizēts piens	Sterilizēts piens	Sausais piens, kazeīns, sausās sūkalas	Jogurts	Kefīrs	Pasterizēts krējums	Sviests	Siers, sūkalas	Kausētais siers	Biezpiens	Svaigais siers	Saldējums
MAFam	x	x	x	-	-	x	x	x/-	x	-	x	x
Enterobaktērijas	x	-	x	x	x	x	x**/-	x/-	-	x	x	x
<i>E. coli</i>	x	-	-	x	-	x	x	x	x	x	x	-
<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	x/-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	x	-	-	x	x	x	x	x	x	x
Termofilās pienskābes baktērijas	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-
Tipiskie kefīra mikroorganismi	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	x/-*	-	-	x/-	-	x/-	-	-	-	-
Koliformu skaits vai klātbūtne	-	-	x	-	-	-	-	-	-	x	x	x/-
Raugi, pelējumi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Salmonella</i> spp.	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

* ja produktu nelietos nozares blakusproduktos; **LR likumdošanā

Mikroorganismu noteikšanas shēma piena produktos



Piena mikrobioloģiskā kontrole

Darba mērķis: iepazīties un apgūt piena bakterioloģiskas pārbaudes metodes.

Darba pamatojums:

Piens ir viens no pilnvērtīgākajiem uztura produktiem un tai pašā laikā ir labvēlīga vide mikroorganismu attīstībai. Galvenais piena mikroorganismu piesārņošanās avots ir dzīvnieka organisms, slaucamās iekārtas, apkalpojošais personāls, gaiss un barība. Lai iegūtu labas kvalitātes pienu, nepieciešams līdz minimumam samazināt iespējas mikroorganismu iekļūšanai tajā ieguves, uzglabāšanas un transportēšanas laikā. Piena mikrofloras izpētē uzmanība jāveltī ne tikai kvantitatīvam, bet arī kvalitatīvam sastāvam. Neievērojot sanitāri – higiēniskos apstākļus, pienā iekļūst zarnu grupas baktērijas, sviestskābes,

pūšanas baktērijas, raugi un pelējumi, kas izsauc piena un piena produktu bojāšanos.

Darba gaita:

1. Parauga ņemšana.
Bakterioloģiskiem pētījumiem pienu rūpīgi samaisa un kopparaugu ņem apjomā 500 cm³ sterilā kolbā. Izmēra temperatūru un atdzesē līdz 6 °C. Mikrobioloģiskām analīzēm ņem no kopparauga 50 – 60 cm³.
2. Baktēriju kopskaita noteikšanai iesaka šādus atšķaidījumus (shēma Nr. 7):
 - ✓ svaigi slauktam pienam – 1:10000; 1:100000; 1: 1000000;
 - ✓ pasterizētam pienam – 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000;

3. Pa 1 ml no attiecīgā atšķaidījuma uzsēj uz 3 paralēlām Petri platēm un uzlej katra barotni apjomā 12–15 ml, 45°C temperatūrā. Pēc barotnes uzliesšanas rūpīgi tajā iejauc trauciņā esošo paraugu.
4. Rezultātu apkopošana.
Baktēriju kopskaita un fizioloģisko grupu noteikšanu veic pēc formulas:

$$X = \frac{a \cdot b}{c}, \text{ kur}$$

- a – izaugušo koloniju skaits Petri trauciņā;
 b – atšķaidījuma pakāpe;
 c – uzsēto Petri trauciņu skaits;
 x – koloniju veidojošo vienību skaits 1 ml paraugā.

ievēro!

- ✓ Baktēriju skaita noteikšanai jāizvēlas tās Petri plates, kuros izaugušo koloniju skaits nav mazāks par 50 un lielāks par 300.

Piena pasterizācijas efekta noteikšana

Darba mērķis: noteikt pasterizācijas ietekmi uz piena mikrofloras kvalitatīvo un kvantitatīvo sastāvu.

Darba pamatojums:

No piena piegādātājiem savāktais piens satur vairāk mikroorganismu kā paredzēts pēc Latvijas Valsts standarta. Lai uzlabotu piena mikrobioloģiskos rādītājus, piena pārstrādes uzņēmumos pienu termiski apstrādā jeb pasterizē. Pasterizāciju veic ar nolūku, lai iznīcinātu produkta patogēnos mikroorganismus, samazinātu baktēriju kopskaitu tajā un inaktivētu fermentus – peroksidāzi, lipāzi, galaktāzi. Pielietojot termisko apstrādi, piena uzturvērtība nedrīkst samazināties, tāpēc piena rūpniecībā lieto četras termiskās apstrādes veidus:

- ✓ ilgstošā pasterizācija – iztur pienu 30 min 63-65 °C temperatūrā;
- ✓ īslaicīgā pasterizācija – iztur pienu 15-20 s 72-76 °C temperatūrā. Šādu režīmu izmanto dzeramā piena un piena pasterizācijai, kuru tālāk izmanto biezpiena un siera ražošanai;
- ✓ momentāna pasterizācija – pienu uzkarsē līdz 85 °C un iztur 2-3 s. Režīms paredzēts saldā krējuma pasterizācijai, kā arī skābpiena produktu un piena konservu ražošanai izmantotajam pienam;
- ✓ piena apstrāde augstā temperatūrā (*UHT* jeb *ultra high temperature*) – iztur 3-5 s 135-138 °C temperatūrā;
- ✓ tīrkultūru un ierauga gatavošanai pienu pasterizē 95-96 °C temperatūrā 30 min.

Darba gaita:

1. Piena pasterizācijas efekta noteikšanai paraugu ņem pirms un pēc pasterizācijas, 50 ml sterilā kolbā. Baktēriju kopskaita noteikšanai pienam pirms pasterizācijas ņem šādus atšķaidījumus – 1:100, 1:1000, 1:10000; pēc pasterizācijas – 1:10, 1:100.
2. Pasterizāciju veic 85-87 °C temperatūrā 5 min, tad pienu atdzesē līdz 6±2 °C.
3. Pienskābo baktēriju, proteolītisko baktēriju, koliformas baktēriju, kā arī raugu un pelējumu uzsējumu gatavošanu skatīt shēmā Nr. 7, 8 un 9.
4. Rezultātu apkopojums.
Aprēķina KVV (koloniju veidojošo vienību) skaitu 1 ml pirms un pēc piena pasterizācijas, izmantojot formulu:

$$X = \frac{a \cdot b}{c}, \text{ kur}$$

- a – izaugušo koloniju skaits Petri platē;
 b – atšķaidījuma pakāpe;
 c – uzsēto Petri plašu skaits;
 x – koloniju veidojošo vienību skaits 1ml paraugā.

ievēro!

- ✓ Pasterizācijas efekts ir sasniegts, ja pēc pasterizācijas ņemta piena paraugā atlikušās mikrofloras daudzums nepārsniedz 0,01% no sākotnējā.

Ierauga kvalitātes pārbaude

Darba mērķis: pārbaudīt piena rūpniecībā lietojamo ieraugu kvalitāti.

Darba pamatojums:

Ieraugu gatavošanai lieto pienu atbilstošu pēc Latvijas Valsts standarta, 1. klase ar blīvumu ne mazāku kā $1,028 \text{ g cm}^{-3}$. Pienu attīra piena attīrītājā un rūpīgi filtrē caur filtru. Laboratorijas ierauga gatavošanai lieto tikai sterilizētu pienu. Ierauga kvalitāti pārbauda organoleptiski, pēc aktivitātes un gatavojot krāsotu preparātu pārbauda mikroskopiski blakus mikrofloras klātbūtni.

Darba gaita:

1. Ierauga aktivitātes pārbaude. Ierauga aktivitāti nosaka pēc piena sarecēšanas laika, pievienojot 5% tīrkultūru ieraudzējamam piena daudzumam. Pienaskābes streptokoku ieraugs sarecina pienu ne ilgāk kā 7 stundās, pienaskābes nūjiņu ieraugs – 6 stundās.

2. Šķīdros ieraugu kvalitātes noteikšana:

- ✓ pagatavo fiksēto krāsoto preparātu pēc shēmas nr. 4. Apskata 10 redzes laukos. Preparātā nedrīkst būt pienaskābes baktēriju šūnu konglomerāti (salipumi), kā arī blakus mikroflora.
- ✓ Gram(+) un Gram(-) mikroorganismu noteikšanu skatīt shēmā nr. 5.
- ✓ sporu veidotāju klātbūtnes noteikšanu skatīt shēmā nr. 6.

3. Rezultātu apkopošana.

Noformējot protokolu jāizvērtē un jāapraksta:

- ✓ ierauga kvalitāte;
- ✓ mikroskopiskais preparāts;
- ✓ ierauga mikrofloras kvalitātes izvērtējums.

Sviestskābes baktēriju noteikšana pienā

Darba mērķis: apgūt sviestskābes baktēriju noteikšanas metodes piena produktos.

Darba pamatojums:

Sviestskābās rūgšanas izraisītājas baktērijas pieder pie *Clostridium* ģints. Tās ir nūjiņveida tipiski anaerobās sporu veidotājas baktērijas. Sviestskābes baktērijas plaši sastopamas augsnē, uz augiem, piesārņotās ūdenskrātuvēs. Sviestskābo baktēriju klātbūtne pārtikas produktos ir nevēlama parādība, jo izsauc produktu bojāšanos, veidojot nepatīkamu rūgtu garšu un aromātu, kā arī rada novirzes tehnoloģiskā procesa norisē. Pienā sviestskābes baktērijas iekļūst, ja piena ieguvē nav ievēroti sanitāri-higiēniskie apstākļi.

Darba gaita:

1. Sagatavo atšķaidījumus 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 un ienes pa 1 ml mēģenēs ar sterila piena barotni vai arī hidrolizētā piena barotni ar 1% glikozes piedevu. Pēc parauga ienešanas mēģenes uzkarsē ūdens vannā līdz 85°C un iztur 10 minūtes. Ievieto termostatā 30°C temperatūrā uz 72 h.

2. Sviestskābes baktērijas nosaka pēc sekojošām pazīmēm:

- ✓ gāzes veidošanās;
- ✓ sviestskābes smaržas;
- ✓ mikroskopējot preparātā redzamos nūjiņveida vāļīšu formas sporu veidotājas baktērijas, kas krāsojumā ar jodu dod pozitīvu reakciju uz granulozi.

3. Sviestskābo baktēriju krāsošana: Uz priekšmetstikliņa uzliek pilienus pētāmā materiāla un pievieno 1 pilienus Lugola šķīduma. Uzliek segstikliņu. Šūnās saskatāmās sporas un zilā krāsā nokrāsotie granulozes ieslēgumi.

4. Rezultātu apkopojums:

- ✓ jāizvērtē iegūtie rezultāti;
- ✓ jāuzzīmē mikroorganismi, kas saskatāmi mikroskopēšanai sagatavotā preparātā;
- ✓ kopsavilkums par iegūtiem rezultātiem jānodod secinājumu veidā.

Sausā piena mikrobioloģiskā kontrole

Darba mērķis.

Iepazīties ar sauso piena produktu mikrobioloģiskās kontroles metodēm.

Darba gaita

1. Sausā sterilā slēgtā traukā iesver 10 g sausā piena.
2. Iesvaru pārnes sterilā maisiņā un pievieno 37-40 °C siltu fizioloģisko šķīdumu, sajauc homogenizatorā līdz sausais piens ir izšķīdis.
3. No sagatavotā materiāla gatavo atšķaidījumus (shēma Nr. 8)
 - ✓ 1:10, 1:100; 1:1000 – MAFAM noteikšanai uz VPA (*Plate count agar with skim milk*) barotnes,
 - ✓ 1:10, 1:100 – proteolītisko baktēriju noteikšanai uz VPA (*Plate count agar with skim milk*) barotnes,
 - ✓ 1:10, 1:100 – *E. coli* klātbūtnes noteikšanai uz Keslera un Endo barotnes;
 - ✓ 1:10, 1:100; 1:1000 – pienskābes baktēriju noteikšanai uz *MRS agar* barotnes.
4. Ūdens vannā izšķīdina sterilās agarizētās barotnes.
5. Petri platēs ielej 1 ml katra atšķaidījuma un izklidē (sajauc) ar 12-15 ml ūdens vannā atšķīdinātu barotni 47 °C temperatūrā.
6. Uzsējumus inkubē termostatā 30-35 °C, 48 h.

7. Rezultātu apkopojums:

- ✓ MAFAM, pienskābes un proteolītisko baktēriju daudzumu aprēķina pēc formulas:

$$X = \frac{a \cdot b}{c}, \text{ kur}$$

- a – izaugušo koloniju skaits Petri platē;
b – atšķaidījuma pakāpe;
c – uzsēto Petri plašu skaits;
X – koloniju veidojošo vienību skaits 1 g produkta.

- ✓ *E. coli* formu baktēriju preparātus sagatavo izmantojot krāsošanas metodi pēc Grama (shēma Nr. 5),
- ✓ jāizvērtē iegūtie rezultāti,
- ✓ jāuzzīmē mikroorganismi, kas saskatāmi mikroskopēšanai sagatavotā preparātā,
- ✓ iegūtos rezultātus apkopo darba protokolā un izdara secinājumus.

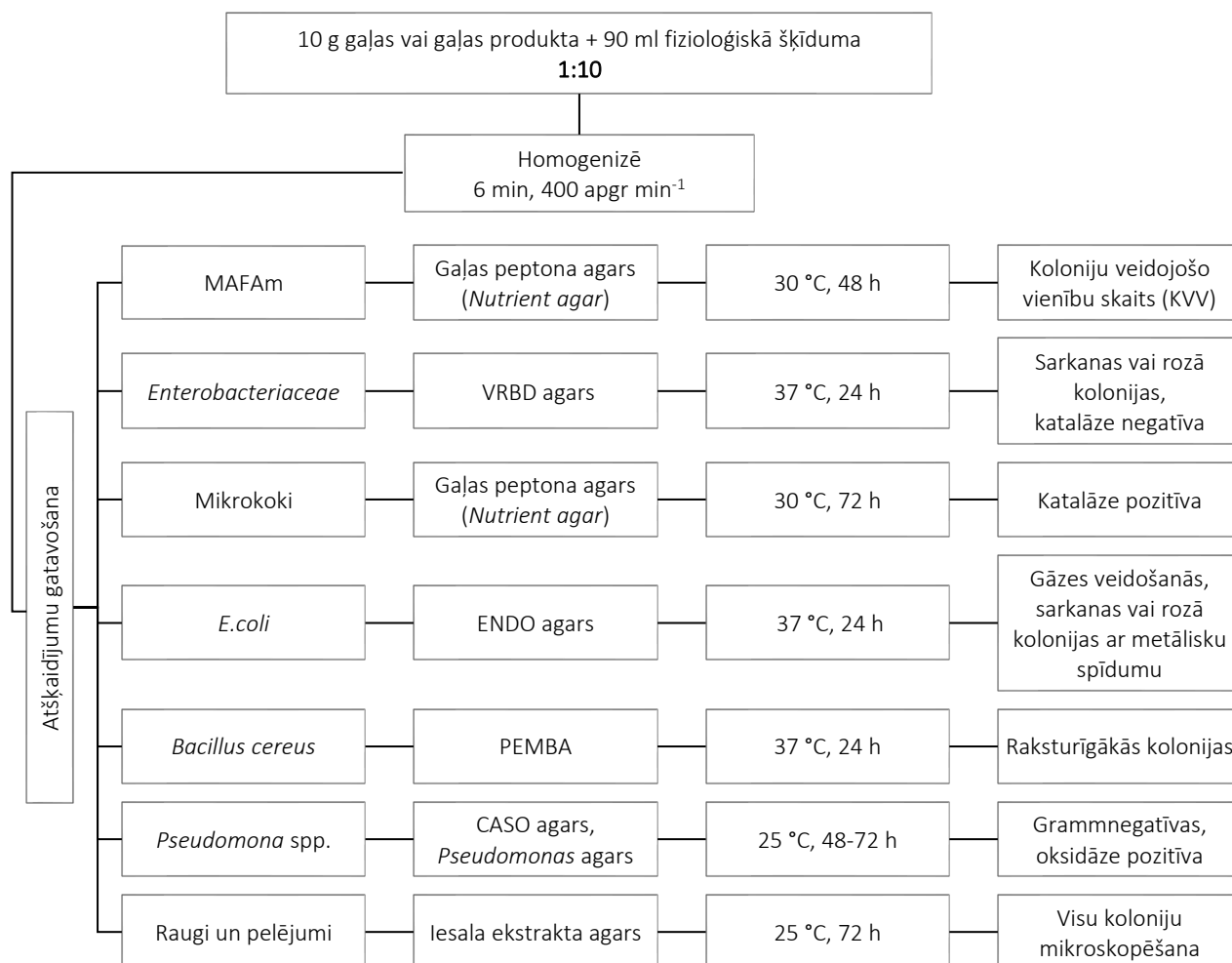
ievēro!

- ✓ Proteolītiskās baktērijas vājpiena agara barotnē apkārt kolonijām veido gaišu caurspīdīgu zonu.

7 Gaļas un gaļas produktu mikrobioloģiskās kontrole

Mikroorganismi	Svaiga gaļa	Svaiga gaļa vakuuma iepakojumā	Mājputnu svaiga gaļa	Maltā gaļa	Liesas gaļas desas	Kveldināta desa	Vārīta desa, šķiņķis	Pusžāvēta desa	Jēla izejviela konserviem
Aerobie mezofilie mikroorganismi	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Enterobacteriaceae</i>	x	x	x	x	x	x	-	-	x
Pienskābes baktērijas	-	x	-	x	x	-	x	-	-
<i>Pseudomonas</i>	x	x	-	x	x	-	x	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	x	-	-	-	-	-	x
<i>E. coli</i>	-	-	x	x	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	-	-	x	x	x	-	x	x	-
Sulfitreducējošas klostrīdijas	-	-	-	x	-	-	-	-	-
<i>Campylobacterium</i>	-	-	x	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	x	-	x	x	-	-	x	x	-

Mikroorganismu noteikšanas shēma gaļā un gaļas produktos



8 Olu produktu mikrobioloģiskās kontrole

Olu produkti var būt šķidri, koncentrēti, kaltēti, kristalizēti, saldēti un dziļi saldēti.

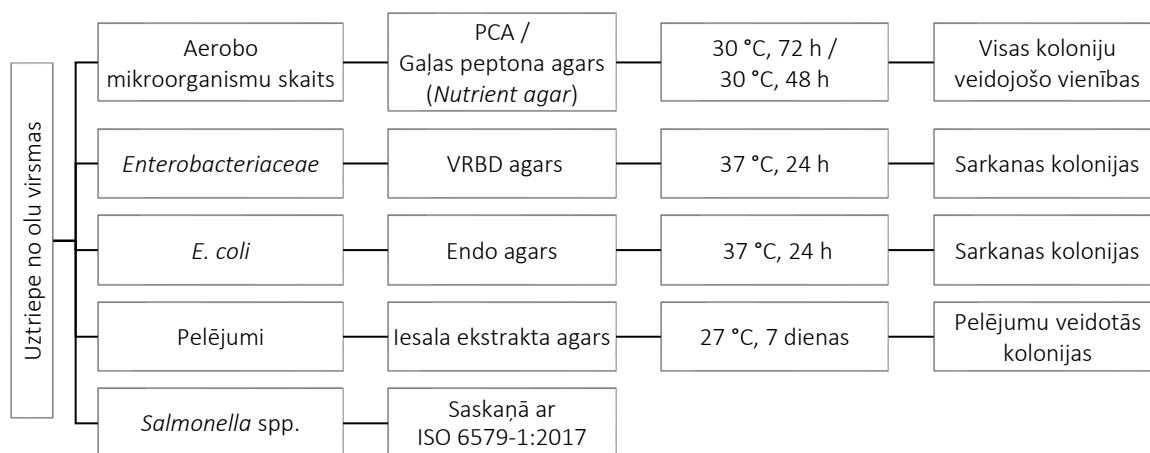
Svaigos olu produktos galvenokārt sastopami *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* ģints, kā arī vairākas *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismi.

Olu mikrobiālo bojāšanos izsauc *Enterobacteriaceae* dzimtas baktērijas, *Pseudomonaden*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* *Micrococcus*, kā arī pelējumi.

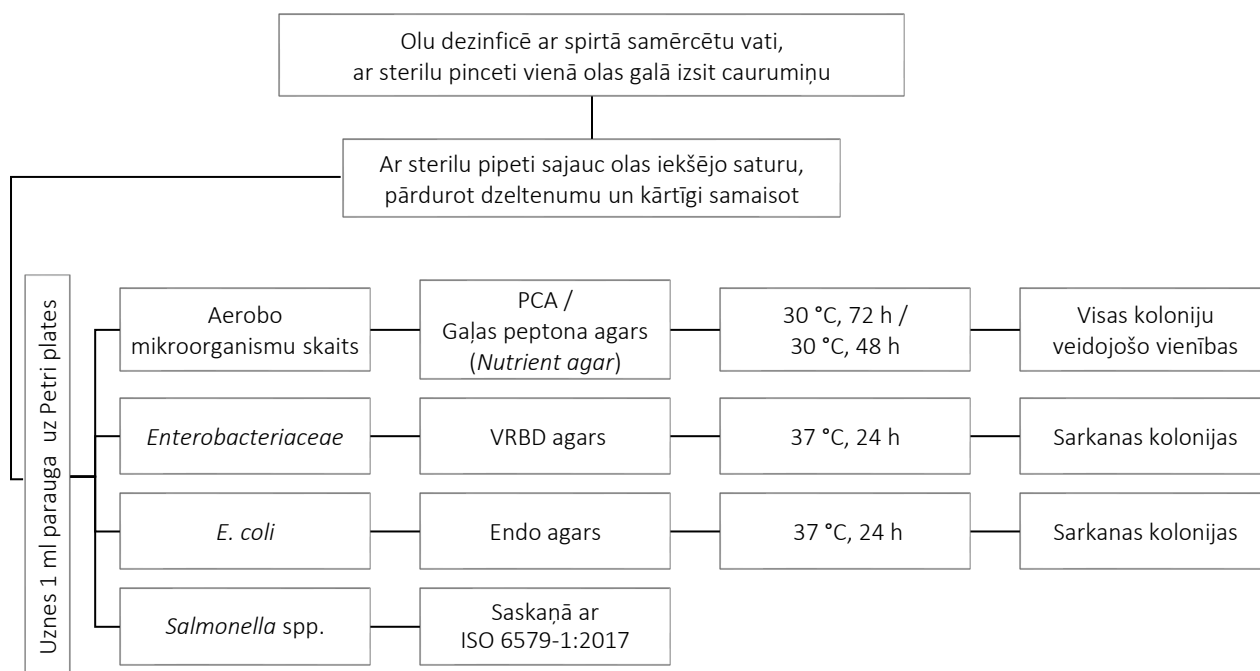
No patogēnajiem un toksīnus veidojošajiem sastopami – *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Yersenia enterocolitica*.

Olu mikrobioloģiskā testēšana

1) Olu virsmas mikrobioloģiskās analīzes



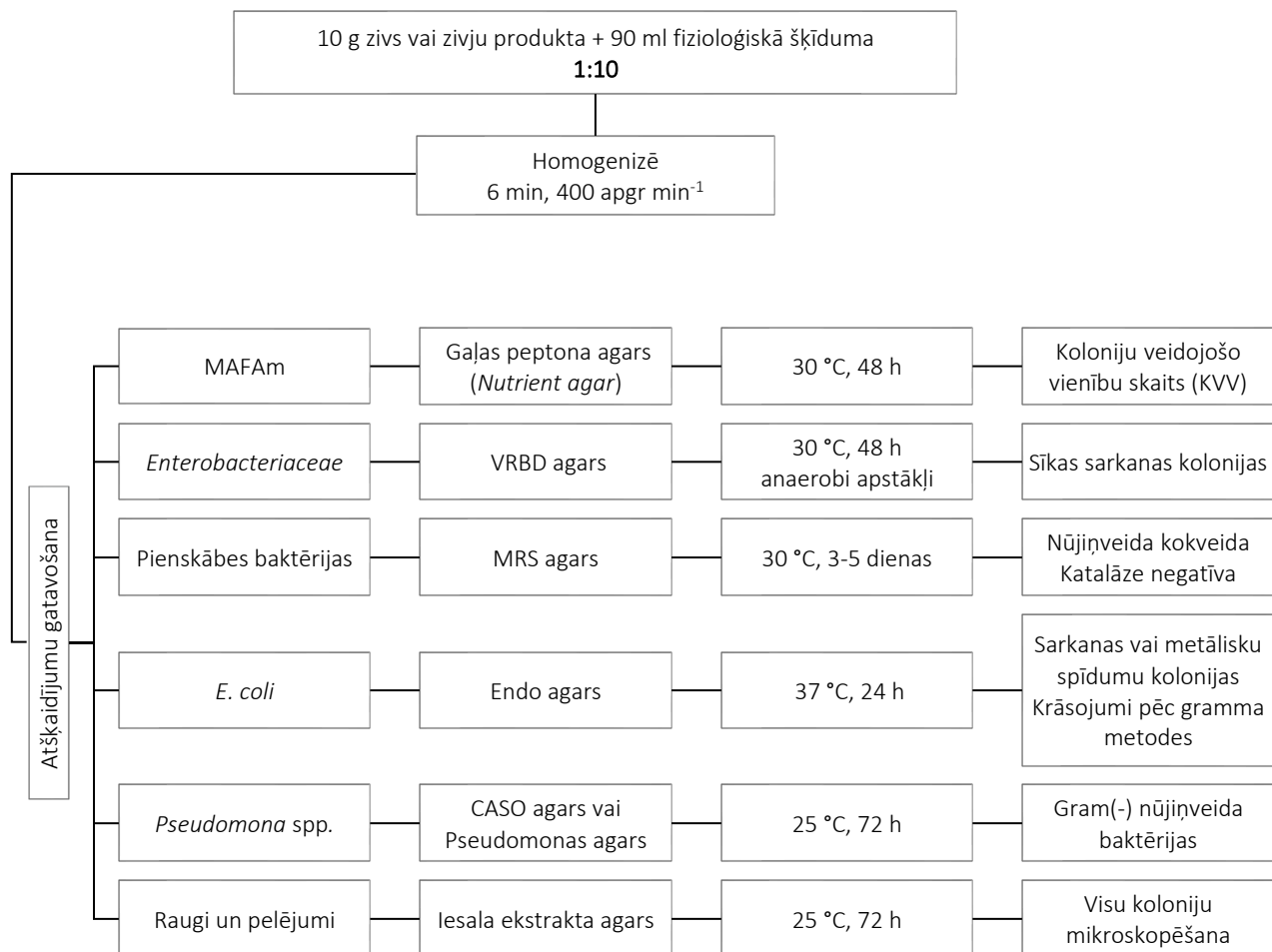
2) Olu iekšējā satura (baltuma un dzeltenuma) mikrobioloģiskās analīzes



9 Zivju un zivju produktu mikrobioloģiskās kontrole

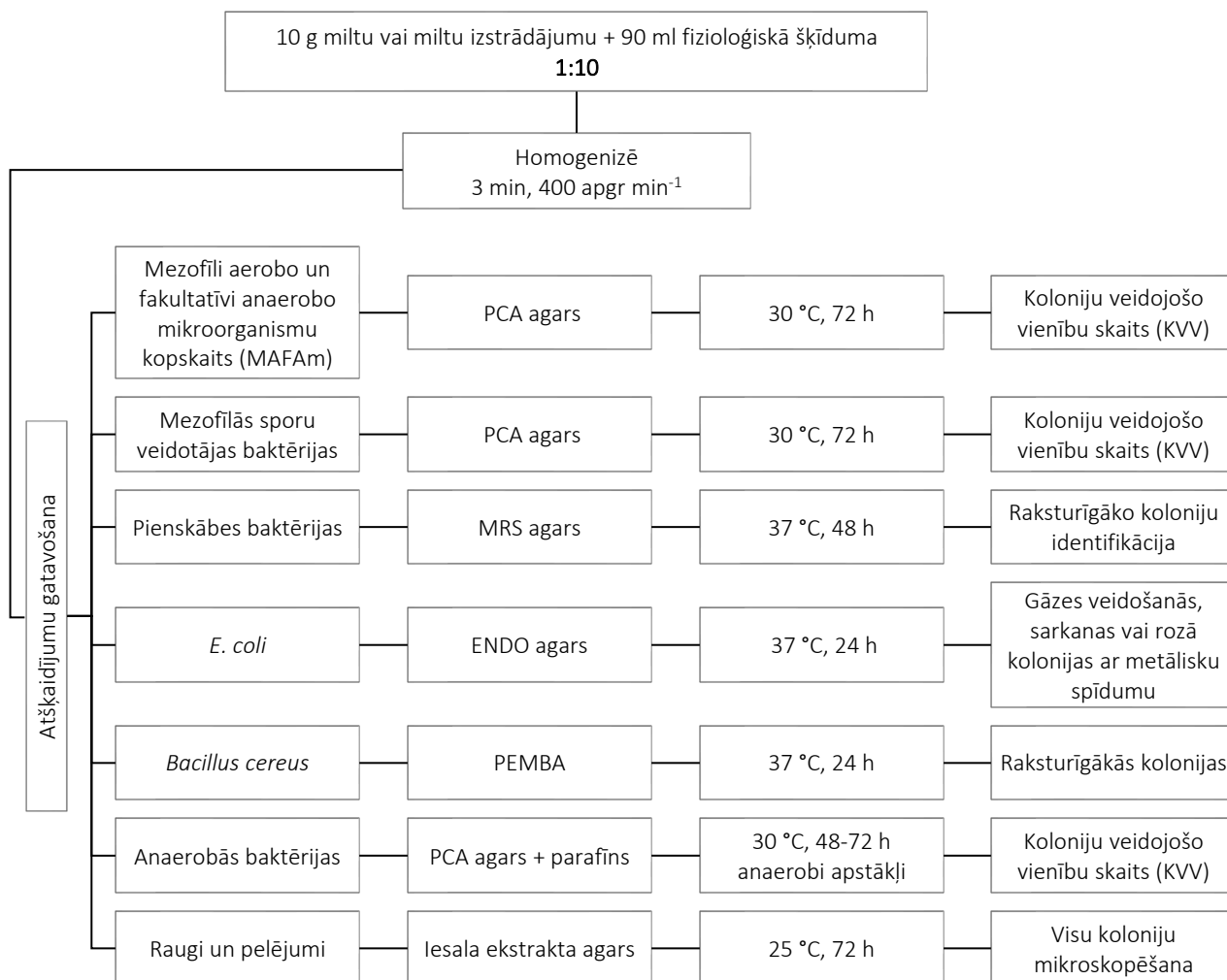
Mikroorganismi	Svaigas zivis	Kūpinātas zivis	Marinētas zivis, zivis želejā
Aerobie mezofilie mikroorganismi	×	×	×
<i>Enterobacteriaceae</i>	×	×	-
Pienskābes baktērijas	×	×	×
<i>Pseudomona</i> spp.	×	×	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	×	-
<i>E. coli</i>	-	×	-
Raugi un pelējumi	-	×	×
<i>Bacillus</i> ģints mezofilās sporu veidotājas	-	×	×
Mezofilās <i>Clostridium</i>	-	×	×
<i>Clostridium perfringens</i>	-	×	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	×	×	-

Mikroorganismu noteikšanas shēma zivīs un zivs produktos



10 Graudu, maizes un konditorejas izstrādājumu mikrobioloģiskā kontrole

Mikroorganismu noteikšanas shēma miltiem un miltu izstrādājumiem



Sporu veidotāju baktēriju noteikšana kviešu maizes izstrādājumos

Darba mērķis: iepazīties ar kviešu maizes bakterioloģiskām izpētes metodēm un, izejot no iegūtiem rezultātiem, dot tās kvalitātes vērtējumu.

Darba uzdevums: noteikt sporu veidotāju klātbūtni maizes izstrādājumos

Darba gaita:

- No baltmaizes parauga ar sterilu skalpeli izgriež 10-20 g paraugu;
- Ievieto sterilā maisiņā un pievieno 90-80 ml fizioloģiskā šķīduma un maisa homogenizatorā 3-5 min;
- Sagatavo atšķaidījumus 1:10, 1:100, 1:1000 (skatīti shēmu Nr. 9);
- No atšķaidījumiem gatavo uzsējumu pa 1 ml 3 paralēlās mēģenēs ar gaļas peptona buljonu, inkubē termostatā 30 °C 48 h;
- Papildus sagatavo baltmaizes paraugu – baltmaizi sagriež 2-3 cm garumā, kurus ievieto Petri platē un sterilizē;
- Pēc atdzesēšanas uz katra baltmaizes parauga uznes 10 ml materiāla no mēģenēm, kurās novērojama rūgšana;
- Petri plates ar sagatavotajiem uzsējumiem inkubē termostatā 35-37 °C temperatūrā 48 h;
- Rezultātu apkopošana:
 - ✓ Ja uz baltmaizes parauga novērojama specifiska augļu smarža un apglumējums, nosaka *Bacillus mesentericus* titru atkarībā no atšķaidījuma –
 1:10 piesārņotības pakāpe neliela;
 1:100 piesārņotības pakāpe vidēja;
 1:1000 paraugs sliktas kvalitātes;
 - ✓ No baltmaizes parauga apglumējuma gatavo mikroskopēšanas paraugu, izmantojot sporu krāsošanas metodi nr. 6, mikroskopā jābūt saskatāmām sporu veidotājām baktērijām.

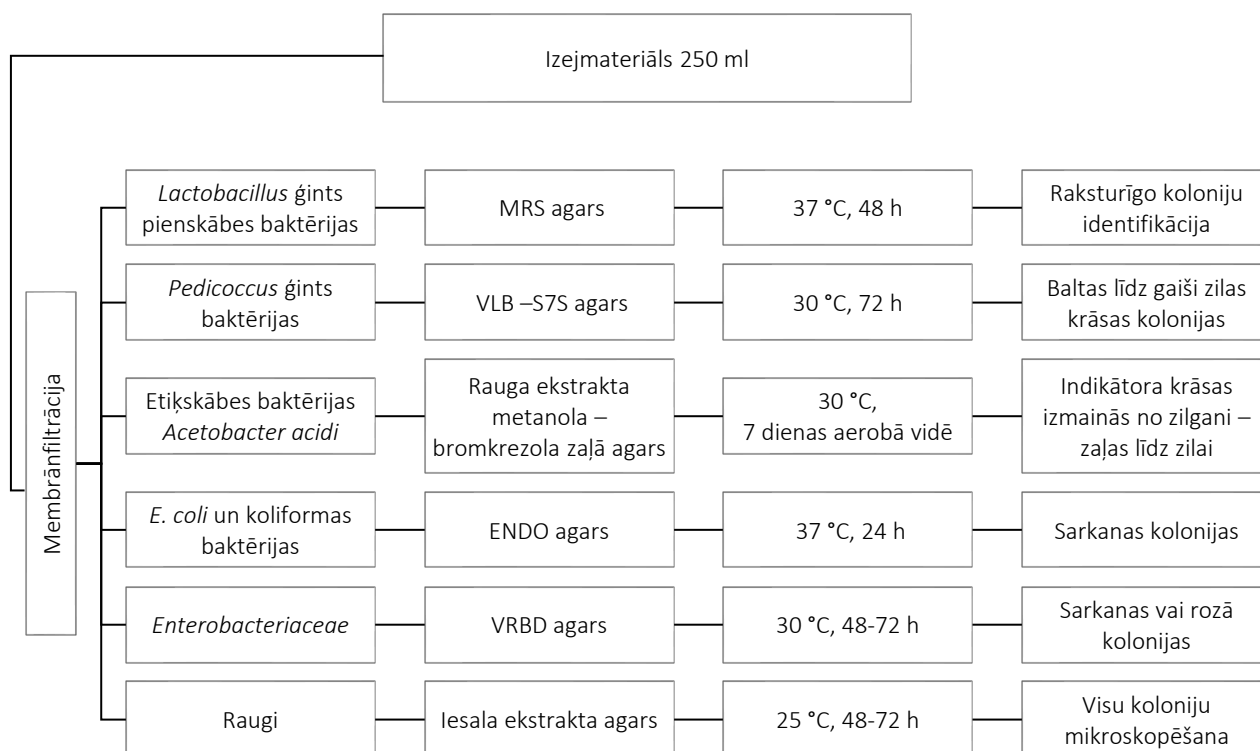
11 Alus mikrobioloģiskā kontrole

Alus no mikrobiālās drošības viedokļa ir relatīvi stabils produkts. Mikroorganismu attīstību alū ierobežo zemā pH vērtība, redokspotenciāls, alkohola un CO₂ saturs, kā arī apiņu rūgtvielas, kam piemīt bakteriostatiska iedarbība uz Gram(+) baktērijām.

Alū no mikrobioloģiskajiem rādītājiem nosaka šādus mikroorganismus:

- ✓ *Lactobacillus* ģints pienskābes baktērijas;
- ✓ *Pedicoccus* ģints baktērijas;
- ✓ Etiķskābes baktērijas – *Acetobacter acidi*;
- ✓ *Enterobacteriaceae*;
- ✓ *Escherichia coli*;
- ✓ Savvaļas neselekcionētos raugus – *Hansenula*, *Pichia*, *Candida*, *Brettanomyces*.

Mikroorganismu noteikšanas shēma alum



Tīrkultūras raugu un savvaļas neselekcionēto raugu identificēšana

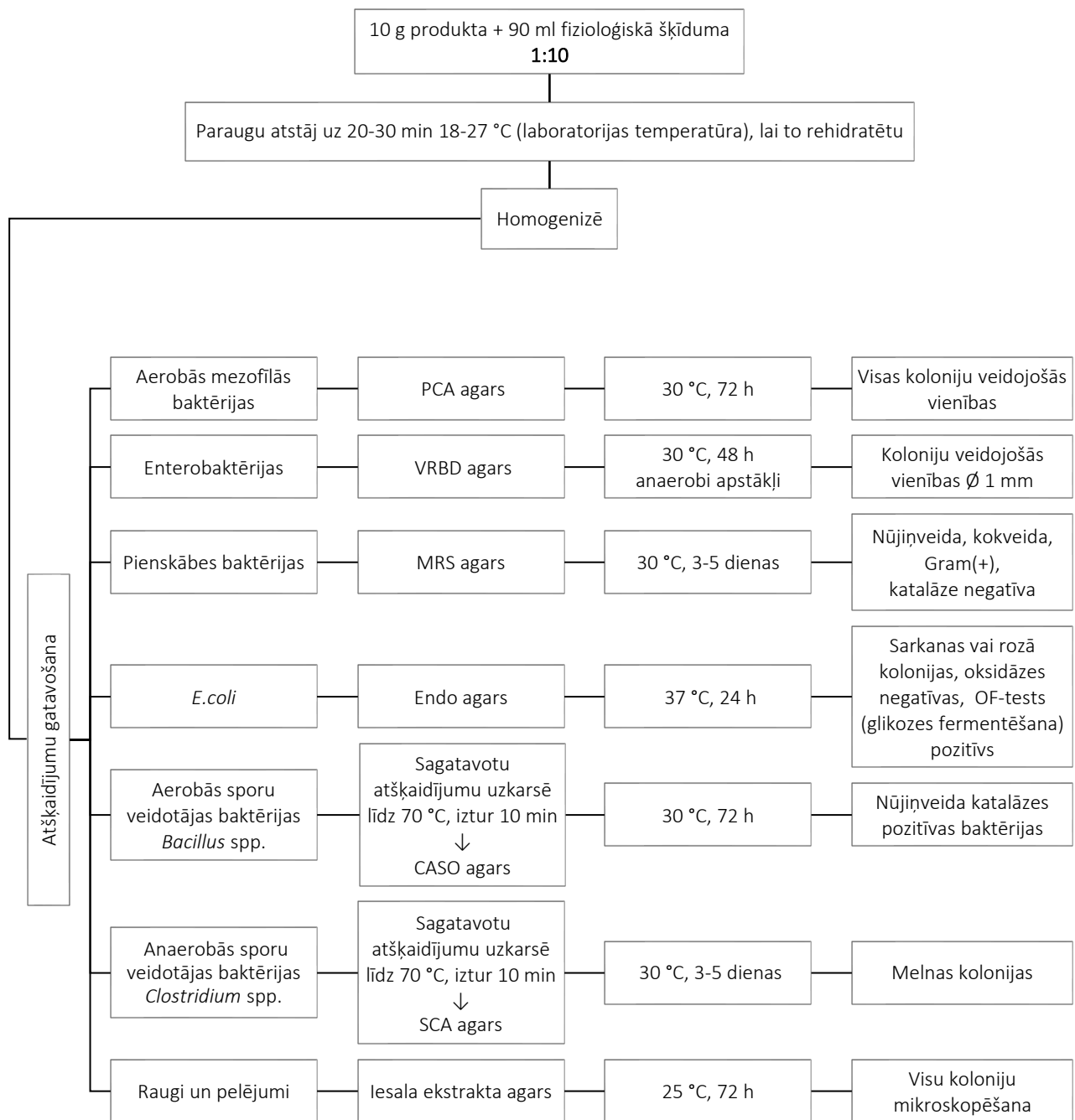
Mikroorganismu veidi	Iesala agars	Lizīna agars	Kristālvioletā agars
Alus rauga tīrkultūra	×	-	-
<i>Saccharomyces</i> dzimtas raugi kā blakus mikroflora	×	-	×
Raugi, kas nepieder <i>Saccharomyces</i> dzimtai	×	×	-

legaumē!

- ✓ *Saccharomyces* dzimtai nepiederošie raugi vienīgie attīstās lizīna agara barotnē.
- ✓ *Saccharomyces* dzimtas un savvaļas jeb nekultivētie raugi attīstās kristālvioletā agara barotnē.

12 Sauso augu valsts izcelsmes pārtikas produktu mikrobioloģiskā kontrole

Mikroorganismu noteikšanas shēma sausajiem produktiem

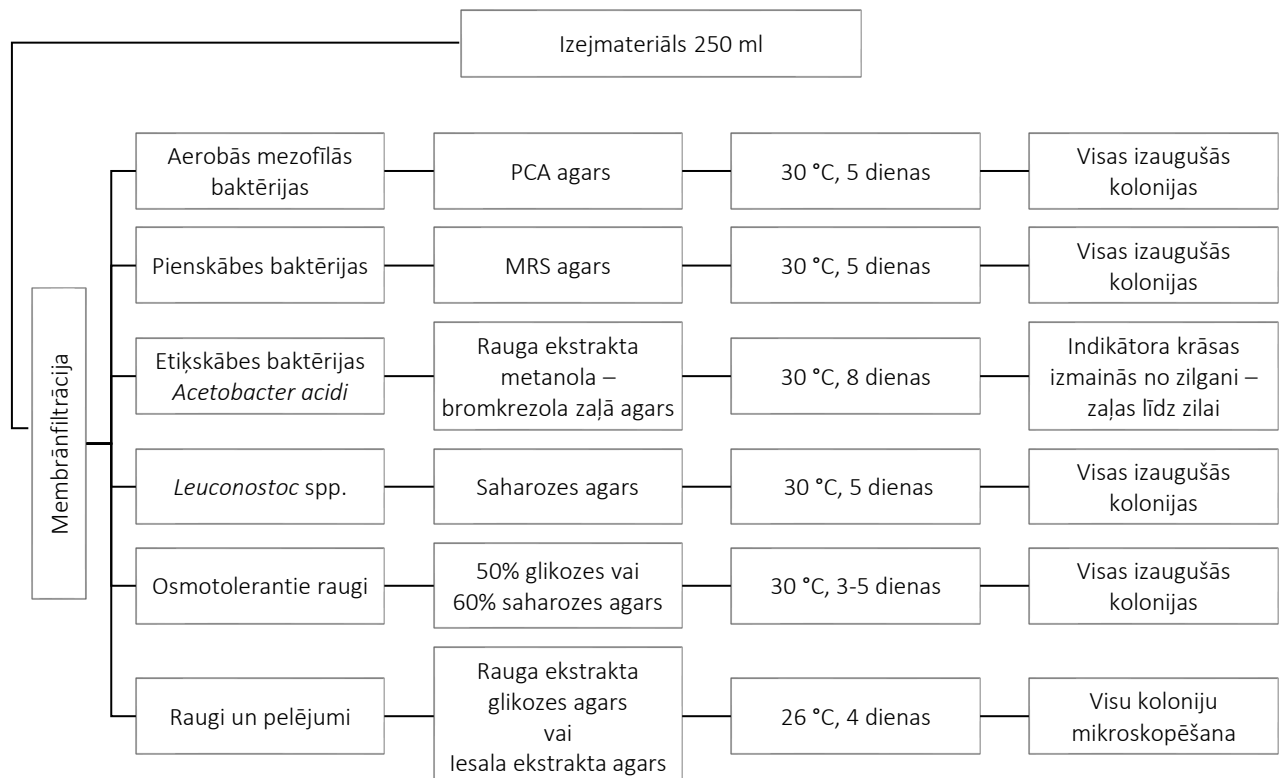


13 Sulu un bezalkoholisko dzērienu mikrobioloģiskā kontrole

Sulā un bezalkoholiskos dzērienos nosaka:

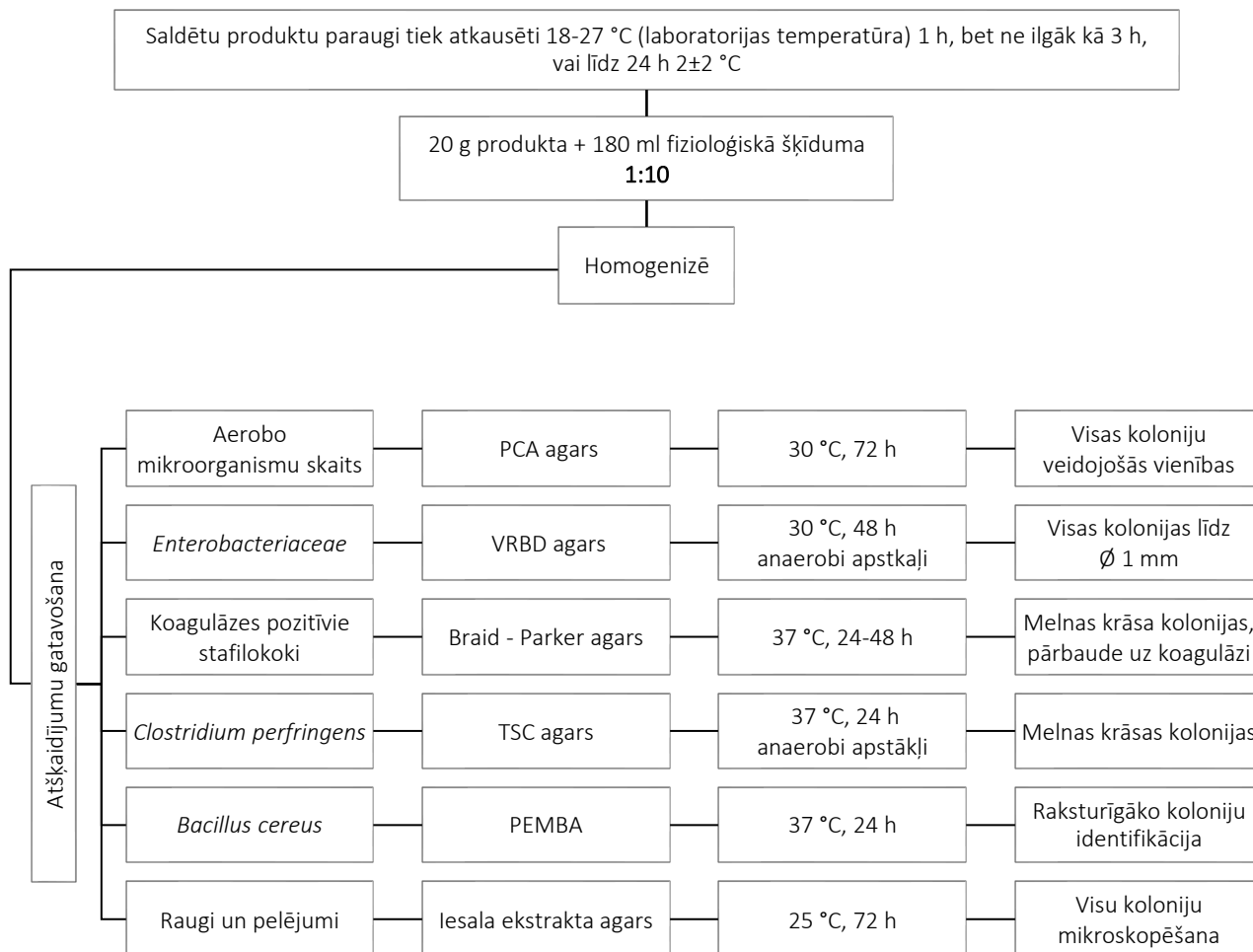
- ✓ aerobās mezofilās baktērijas;
- ✓ etiķskābās baktērijas;
- ✓ pienskābes baktērijas;
- ✓ *Leuconostoc* spp.;
- ✓ raugus un pelējumus;
- ✓ osmoofilos raugus.

Mikroorganismu noteikšanas shēma dzērieniem



14 Saldēto pārtikas produktu mikrobioloģiskā kontrole

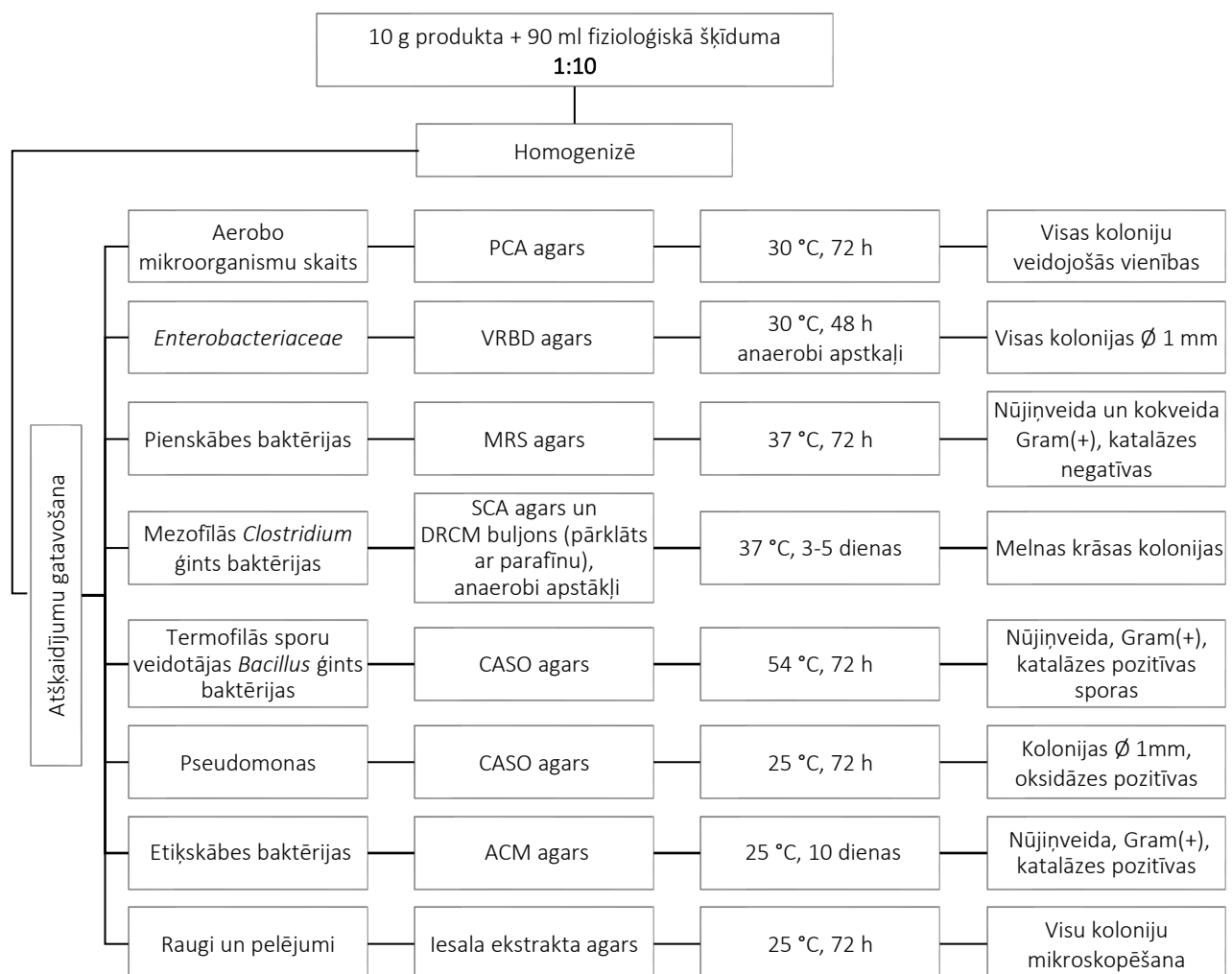
Mikroorganismu noteikšanas shēma saldētajiem produktiem



15 Majonēzes, kečupu un gatavo salātu (konservētu un svaigi gatavotu) mikrobioloģiskā kontrole

Mikroorganismi	Majonēze	Salāti pH < 4,5	Salāti pH > 4,5	Jauktie salāti	Kečups	Salātu mērces	Pasterizēti e salāti
Aerobi mezofīlie fakultatīvi anaerobie mikroorganismi	-	-	x	x	x	-	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	-	-	x	x	-	-	-
Raugi un pelējumi	x	x	x	x	x	x	-
<i>Pseudomona</i> spp.	-	-	-	x	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	x	-	-	-
Pienskābes baktērijas	x	x	x	x	x	x	-
Enterokoki	-	-	-	-	-	-	-
Etiķskābes baktērijas	-	-	-	-	x	-	-
<i>Bacillus</i> spp.	-	-	-	-	x	-	x
<i>Clostridium</i> spp.	-	-	-	-	-	-	x

Mikroorganismu noteikšanas shēma majonēzei, kečupam un gatavajiem salātiem



16 Paraugu noņemšana, sagatavošana un rezultātu interpretācija saskaņā ar ISO standartiem un Regulu (EK) Nr. 2073/2005

16.1 STANDARTI

Nacionālie (LVS), adaptētie Eiropas (EN) un starptautiskie (ISO, IEC) standarti pieejami Latvijas Nacionālās standartizācijas institūcijas „Latvijas standarts” (LVS) standartu katalogā.

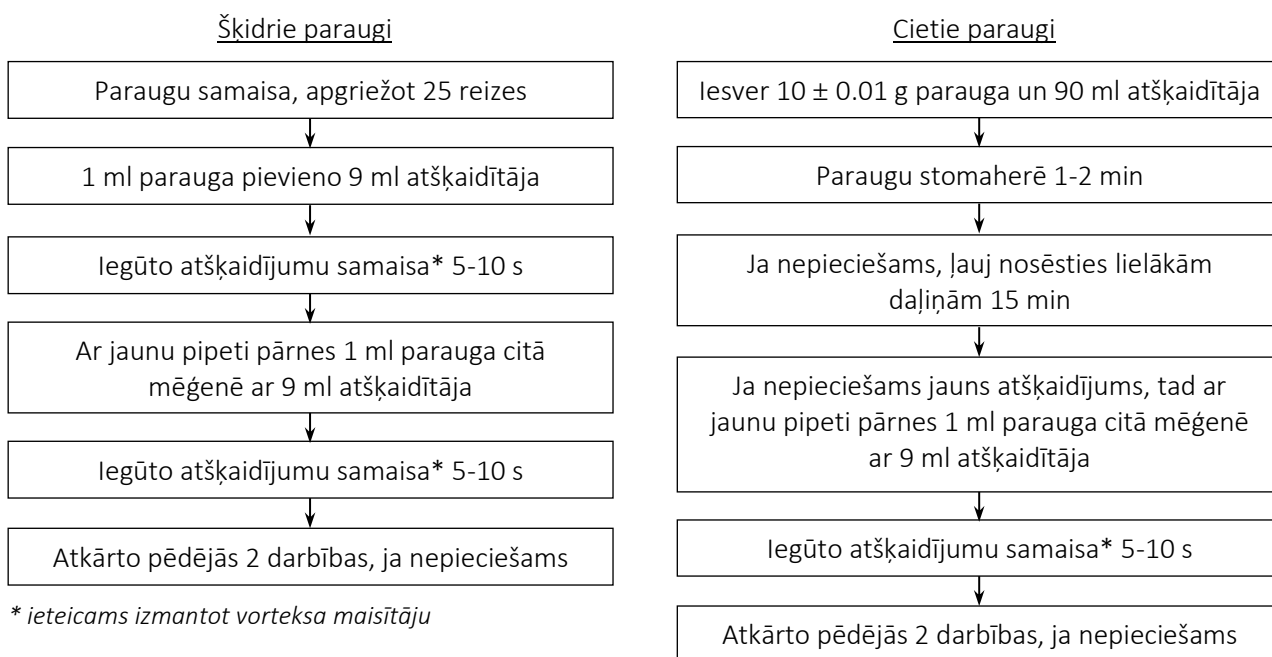
Standarti, kas attiecas uz mikrobioloģisko testēšanu, atrodami ICS grupas 07 MATEMĀTIKA. DABASZINĀTNES apakšgrupā 07.100 Mikrobioloģija, kas sīkāk iedalīta šādi:

- » 07.100.01 Mikrobioloģija. Vispārīgi
- » 07.100.10 Medicīniskā mikrobioloģija
- » 07.100.20 Īdens mikrobioloģija
- » 07.100.30 Pārtikas mikrobioloģija
- » 07.100.40 Kosmētikas mikrobioloģija
- » 07.100.99 Citi ar mikrobioloģiju saistīti standarti

16.2 PARAUGU SAGATAVOŠANA MIKROBIOLOĢISKAI TESTĒŠANAI (LVS EN ISO 6887)

LVS EN ISO 6887-1:2017 - Pārtikas ķēdes mikrobioloģija. Testēšanas paraugu, sākotnējās suspensijas un decimālšķīdumu sagatavošana mikrobioloģiskām pārbaudēm.

1.daļa: Vispārīgi noteikumi sākotnējās suspensijas un decimālšķīdumu sagatavošanai



* ieteicams izmantot vorteksa maisītāju

ievēro!

Tā kā testējamie pārtikas produkti ir dažādi (heterogēni, šķidri, sausi, cieti, saldēti, ar augstu tauku saturu, ar palielinātu vides skābumu), to sagatavošana analīzēm un izmantojamais atšķaidītājs var būt atšķirīgi.

Sīkāk par katru pārtikas produktu grupas paraugu noņemšanu un sagatavošanu mikrobioloģijas analīzēm aprakstīts pārējās šī standarta daļās:

- » LVS EN ISO 6887-2:2017 – 2.daļa: Īpaši noteikumi gaļu un gaļas izstrādājumu sagatavošanai;

- » LVS EN ISO 6887-3:2017 – 3.daļa: Īpaši noteikumi zivis un zivju izstrādājumu sagatavošanai;
- » LVS EN ISO 6887-4:2017 – 4.daļa: Īpaši noteikumi dažādu izstrādājumu sagatavošanai ;
- » LVS EN ISO 6887-5:2011 – 5. daļa: Īpaši noteikumi piena un piena izstrādājumu sagatavošanai;
- » LVS EN ISO 6887-6:2013 – 6. daļa: Īpaši noteikumi paraugu sagatavošanai, kas ņemti no ražošanas sākumstadijas.

Daži piemēri no specifiskām prasībām paraugu sagatavošanā:

- » skābai produkcijai jāizmanto atšķaidītājs, ar kuru var nodrošināt neitrālu pH (izmanto NaOH, K₂PO₄),
- » produktiem ar augstu tauku saturu (virs 20%) izmanto atšķaidītāju ar pievienotu sorbitāna monooleātu (Tween 80),
- » cietus un sausus produktus vienā reizē homogenizē ne ilgāk par 2,5 min,
- » sausus produktus pirms homogenizēšanas atstāj uz 20-30 min 18-27 °C (laboratorijas temperatūra),

- » saldēti produktu paraugi jāatkausē 1 h, bet ne ilgāk kā 3 h, 18-27 °C (laboratorijas temperatūra) vai līdz 24 h 2±2 °C,
- » lai testētu šokolādi, nepieciešams atšķaidītāju uzsildīt līdz 40 °C, paraugu kopā ar atšķaidītāju atstāj istabas temperatūrā 20-80 min, lai paraugu sašķidrinātu, tad homogenizē,
- » sviesta analīzei 10 g parauga iztur ūdens vannā 45 °C līdz viss paraugs ir izkusis, tad pievieno atšķaidītāju.

16.3 REZULTĀTU APRĒĶINS (LVS EN ISO 7218)

LVS EN ISO 7218:2007 - Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija. Vispārīgās prasības un norādījumi mikrobioloģiskām pārbaudēm.

Produkta 1 g vai 1 ml esošo KVV skaitu (no 2 Petri platēm) aprēķina pēc formulas:

$$N = \frac{\sum c}{V \times 1,1 \times d}, \text{ kur}$$

$\sum c$ – koloniju summa divās uzskaitītās platēs no diviem secīgiem atkārtojumiem (10 – 300 KVV);

V – platēs izsētais tilpums;

d – atšķaidījums, kurā iegūts pirmais koloniju skaits ($d=1$, kad tiek izmantots neatšķaidīts paraugs).

Noapaļo rezultātu līdz 2 zīmēm: < 5 – uz leju, 5 un > 5 – uz augšu.

Rezultātu izsaka kā 1,0 – 9,9 ar 10 attiecīgajā pakāpē.

Piemērs:

- pirmajā atšķaidījumā (10^{-2}): 168 kolonijas
- otrajā atšķaidījumā (10^{-3}): 14 kolonijas

$$N = \frac{\sum c}{V \times 1,1 \times d} = \frac{168+14}{1 \times 1,1 \times 10^{-2}} = \frac{182}{0.011} = 16\,545$$

Noapaļojot iegūto iznākumu līdz 2 zīmēm, mikroorganismu skaits produktā ir 17 000 jeb $1,7 \cdot 10^4$ KVV g⁻¹ vai ml⁻¹.

Produkta 1 g vai 1 ml esošo KVV skaitu (no visām Petri platēm) aprēķina pēc formulas:

$$N = \frac{\sum c}{V \times (n_1 + 0.1 \cdot n_2) \times d}, \text{ kur}$$

$\sum c$ – koloniju summa visās uzskaitītās platēs no diviem secīgiem atkārtojumiem (10 – 300 KVV);

V – platēs izsētais tilpums;

n_1 – uzskaitīto plašu skaits 1. atkārtojumā;

n_2 – uzskaitīto plašu skaits 2. atkārtojumā;

d – atšķaidījums, kurā iegūts pirmais koloniju skaits.

Noapaļo rezultātu līdz 2 zīmēm: < 5 – uz leju, 5 un > 5 – uz augšu.

Rezultātu izsaka kā 1,0 – 9,9 ar 10 attiecīgajā pakāpē.

Piemērs:

- pirmajā atšķaidījumā (10^{-2}): 168 un 215 kolonijas
- otrajā atšķaidījumā (10^{-3}): 14 un 25 kolonijas

$$N = \frac{\sum c}{V \times (n_1 + 0.1 \cdot n_2) \times d} = \frac{168+215+14+25}{1 \times (2+0.1 \cdot 2) \times 10^{-2}} = \frac{422}{0.022} = 19\,182$$

Noapaļojot iegūto iznākumu līdz 2 zīmēm, mikroorganismu skaits produktā ir 19 000 jeb $1,9 \cdot 10^4$ KVV g⁻¹ vai ml⁻¹.

Aprēķini, ja mazs koloniju skaits (< 10)

Ja uzskaitītais koloniju skaits 1 platē ir **4 – 10**, tad aprēķinus veic pēc šāda piemēra:

(10⁻¹) 8 kolonijas

(10⁻²) 0 kolonijas

$$N = \frac{8}{1 \times 1,1 \times 0,1} = 72,72 \text{ jeb } 7,3 \cdot 10^1 \text{ KVV g}^{-1}$$

Ja koloniju skaits ir **1 – 3**, rezultātu precizitāte ir pārāk zema un rezultātu izsaka kā "mikroorganismi ir konstatēti, bet < 4·d g⁻¹ vai ml⁻¹"

Piemērs:

(10⁻¹) 3 kolonijas

(10⁻²) 0 kolonijas

Rezultāts = < 4·10¹ KVV g⁻¹ vai ml⁻¹

16.4 PARAUGU ŅEMŠANAS PLĀNS

Visbiežāk mikrobioloģiskajām pārbaudēm izmanto divu un trīs atribūtklašu paraugu ņemšanas plānus. **Regulā (EK) Nr. 2073/2005** divu un trīs atribūtklašu paraugu ņemšanas plāni ir lietoti šādā veidā:

- » divu klašu paraugu ņemšanas plānā analizējamais paraugs iedala divās kategorijās: apmierinošie un neapmierinošie, pamatojoties uz vienu robežvērtību "m=M";
- » trīs klašu paraugu ņemšanas plānā analizējamais paraugs iedala trijās kategorijās: apmierinoši, pieņemami un neapmierinoši. Trīs klašu paraugu ņemšanas plānu izmanto, ja ir pieņemams, ka daži paraugi pārsniedz zemāko robežvērtību (m), ciktāl netiek pārsniegts piesārņojuma riska līmenis (M).

Divu klašu paraugu ņemšanas plāns

- | | |
|---|--|
| n | nepieciešamais testējamo paraugu skaits |
| m | pieļaujamais limits/norma; 0, ja piesārņojums nav pieļaujams |
| c | maksimāli pieļaujamais paraugu skaits, kas drīkst būt pozitīvi |

Piemērs

Salmonella piena produktos

n = 5 m = nav 25 g c = 0

No partijas testē 5 paraugus, katra parauga apjoms ir 25 g. *Salmonella* klātbūtne nedrīkst būt nevienā no 5 paraugiem, citādi partija ir bojāta un nederīga.

Ja platēs nav koloniju, rezultātu izsaka kā "< 1/d KVV ml⁻¹ vai < 1/d KVV g⁻¹"

Piemērs:

d = 10⁰ = 1 (rezultāts < 1 KVV ml⁻¹)

d = 10⁻¹ = 0.1 (rezultāts < 10 KVV ml⁻¹) utml.

Ja uzskaitē veikta tikai vienā atšķaidījumā:

$$N = \frac{C}{V \times d}, \text{ kur}$$

C – koloniju skaits platē;

V – platē iesētais tilpums;

d – atšķaidīšanas faktors.

Trīs klašu paraugu ņemšanas plāns

- | | |
|---|--|
| n | nepieciešamais testējamo paraugu skaits |
| m | pieļaujamais limits/norma; piesārņojums virs šī limita nav vēlams, bet reizēm ir pieļaujams |
| M | nepieļaujams piesārņojums virs šī limita; partija ir nederīga, ja vairāk par 1 paraugu pārsniedz šo limitu |
| c | maksimāli pieļaujamais pieņemamo paraugu skaits (piesārņojums robežās no m līdz M) |

Piemērs

Fekālo koliformu un mikroorganismu kopskaits gliemenēs

Fekālās koliformas

n = 5 m = 10 M = 100 c = 2

Mikroorganismu kopskaits

n = 5 m = 5×10⁴ M = 5×10⁵ c = 2

No partijas testē 5 paraugus, katra parauga apjoms ir 1 g. Ja atrastas vairāk nekā 100 fekālās koliformas un vairāk nekā 5×10⁴ kopējo mikroorganismu vismaz 1 paraugā, tad partija ir nederīga. Ja vairāk nekā 2 paraugi satur 10-20 fekālās koliformas un vairāk nekā 2 paraugos mikroorganismu kopskaits ir 5×10⁴ – 5×10⁵, tad partija ir nederīga. Ja 1 vai 2 paraugi satur 10-20 fekālās koliformas un 1 vai 2 paraugos mikroorganismu kopskaits ir 5×10⁴ – 5×10⁵, tad partija ir pieņemama, bet nav vēlama (saskaņā ar labas ražošanas praksi). Ideālā situācijā visiem paraugiem nedrīkst pārsniegt 10 fekālās koliformu un 5×10⁴ kopējo mikroorganismu skaitu.

17 Mikroorganismu identifikācija līdz sugai

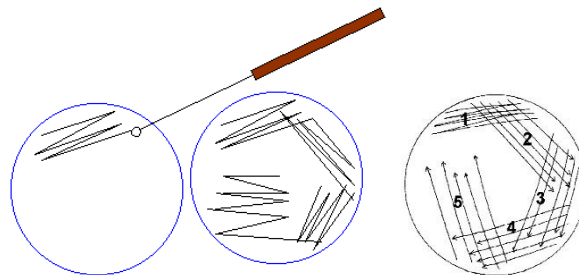
Lai veiktu mikroorganismu identificēšanu ar dažādiem specializētiem identifikācijas testiem, vispirms jānoskaidro mikroorganisma piederība dzimtai, lai izvēlētos atbilstošo sugas identifikācijas testa metodi.

Darba gaita:

- 1) veic mikroorganisma izolēšanu no Petri plates, lai iegūtu tīrkultūru – izmanto vienu koloniju, kuru audzē uz jaunas Petri plates:
 - ✓ jaunā Petri platē ielej sašķidrinātu atbilstīgu barotni un atstāj sacietēt,
 - ✓ ar sterilu cilpiņu pārnes testējamo mikroorganismu koloniju uz sagatavoto Petri plati un viegli zīmē pa agaru virsmu zig-zag tehnikā (36. att.), necaurdurot agaru,
 - ✓ inkubē atbilstošā temperatūrā optimālo laika periodu;
- 2) veic šūnu morfoloģisko analīzi mikroskopā un krāsošanu pēc Grama metodes (shēma nr. 5);
- 3) pārbauda mikroorganisma reakciju ar katalāzes vai oksidāzes testu:
 - ✓ katalāzes testā nosaka, vai mikroorganismam ir katalāzes enzīms, kas

ūdeņraža peroksīdu šķel par ūdeni un skābekli, veidojas gāzes burbulīši ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$);

- ✓ oksidāzes testā nosaka, vai mikroorganismam ir elpošanas enzīms citohroms C, kas ar oksidāzes reaģentu veido tumši violetu krāsu;



36. att. Mikroorganisma izolēšana (streak plating)

- 4) ar sterilu cilpiņu pārnes testējamo mikroorganismu koloniju uz sagatavoto Petri plati un viegli
- 5) izvēlas atbilstošo specializēto identifikācijas testu, lai noteiktu mikroorganisma sugu.

Gram(+) baktēriju izvērtēšana identifikācijai

- | | |
|---|---|
| (1) Šūnu forma – sfēriska (kokkveida) | (2) |
| Šūnu forma – nūjiņveida | (3) |
| (2) Katalāzes pozitīvas | <i>Staphylococcus, Micrococcus</i> |
| Katalāzes negatīvas | <i>Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus</i> |
| (3) Katalāzes pozitīvas | (4) |
| Katalāzes negatīvas | <i>Lactobacillus</i> |
| (4) Aerobos apstākļos veido sporas | <i>Bacillus</i> |
| Sporas neveido | <i>Brevibacterium</i> u.c. sugas |

Gram(–) baktēriju izvērtēšana identifikācijai

- | | |
|--|---------------------------------|
| (1) Oksidāzes pozitīvas | (2) |
| Oksidāzes negatīvas | (6) |
| (2) Obligāti aerobas | (3) |
| Fakultatīvi anaerobas | <i>Aeromonas</i> |
| (3) Kustīgas | <i>Pseudomonas, Alcaligenes</i> |
| Nekustīgas | (4) |
| (4) Kolonijas dzeltenas | <i>Flavobacterium</i> |
| Kolonijas nav pigmentētas | (5) |
| (5) Hidrolizē glikozi | <i>Psychrobacter*</i> |
| Nehidrolizē glikozi | <i>Moraxsella*</i> |
| (6) Obligāti aerobas, nekustīgas | <i>Acinetobacter*</i> |
| Fakultatīvi anaerobas, kustīgas | <i>Enterobacteriaceae</i> |

* pēc šūnu formas bieži ir kokkveidīgas

Mikroorganismu identifikācija ar API testu

Metodes būtība:

1. Uz agarizētās barotnes no izaugušām kolonijām veidojošām vienībām noņem materiālu un, lietojot atšķaidījumu un Lindnera metodi, izdala attiecīgo mikroorganismu tīrkultūras veidā.
2. API uzsēšanas šķidrumā sagatavo mikroorganismu šūnu suspensiju atbilstoši metodes instrukcijai. *Densimat* densitometrā mēra suspensijā ienesto šūnu koncentrāciju.
3. Suspensiju iepilda API matricas stripa iedobēs. Uzsējums rehidrē substrātu un sākas mikroorganismu metabolisms.
4. Matricu noslēdz, ievieto termostatā un inkubē mikroorganisma augšanai optimālajos apstākļos.
5. Pēc noteiktā inkubācijas laika novēro krāsas vai duļķainības izmaiņas, kas rodas mikroorganismu izdalīto metabolītu rezultātā.
6. No bioķīmisko reakciju rezultātiem (37., 38. att.) – izmaiņas katra stripa iedobē – veido ciparu kodu (39., 40. att.), kas tiek lietots kā pamats identifikācijai.
7. Ciparu kodu ievada datorā, kurā ir API ID sistēmas elektroniskā kodu grāmata.
8. Ekrānā parādās identificētā mikroorganisma nosaukums, tā biotips, kā arī iegūto rezultātu ticamības koeficients.



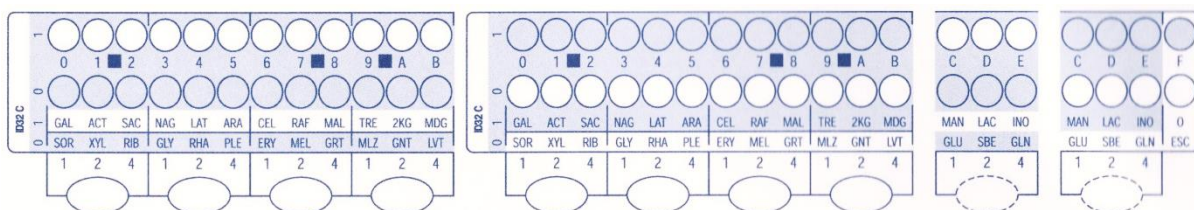
37. att. API 50 CH testa strips ar mikroorganismu veidotām bioķīmiskām reakcijām



38. att. API ID 32 C identifikācijas strips ar raugu veidotām bioķīmiskām reakcijām

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
48 h 24 h																																																		
	0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXVL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INJ	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG

39. att. API 50 CH mikroorganismu identifikācijas rezultātu lapa



40. att. API ID 32 C raugu identifikācijas rezultātu lapa

Metodes soli:

1. API matricas pamatni kodē ar parauga numuru un datumu.
2. Matricas pamatnes iedobēs iepilda 5 ml destilēta ūdens, lai novērstu API stripa izžūšanu.
3. Matricas pamatnē ievieto API stripu.
4. Atver atbilstīgās barotnes ampulu, nolaužot plastmasas vāciņu un ampulas galu.
5. Sagatavo mikroorganisma suspensiju un inokulē stripa iedobju slēgto daļu (41., 42. att.).



41. att. API testa matricas stripa iedobes daļas



42. att. API stripa iedobes iepildīšana pienskābes baktēriju identifikācijai

6. Stripu uzpildot nedaudz saliec slīpi, lai atvieglotu inokulāta iekļūšanu iedobes slēgtajā

Suspensijas sagatavošana pienskābes baktēriju identifikācijai

1. Atvērtu API 50 CHL Medium barotni ievieto densitometrā un ar sterilu cilpiņu ienes tajā testējamo pienskābes baktērijas tīrkultūru līdz 2 McF (McFarlanda) vienībām, kārtīgi izmaisa.
2. Ar automātisko pipeti piepilda visas API stripa iedobes (ja nepieciešams, stripu drīkst sagāzt, lai nepieļautu gaisa burbulīšus piepildītā iedobē).
3. Katrā iedobē tās atvērtajā daļā iepilina 1 pilienu minerāleļļas, lai radītu fakultatīvi anaerobus apstākļus.
4. Inkubē 37 °C temperatūrā 24 h (pirmā pārbaude), tad vēl 24 h (otrā pārbaude, kopā inkubācija 48 h).
5. Nolasa katra testa rezultātus (pozitīvs – krāsas maiņa no zilās uz dzeltenu vai negatīvs – nav krāsas maiņas (zila krāsa)) un tos pieraksta (39. att.).
6. Izmantojot APIweb™ aplikāciju, ievada ciparu kodu un pieraksta identificētās pienskābes baktērijas nosaukumu.

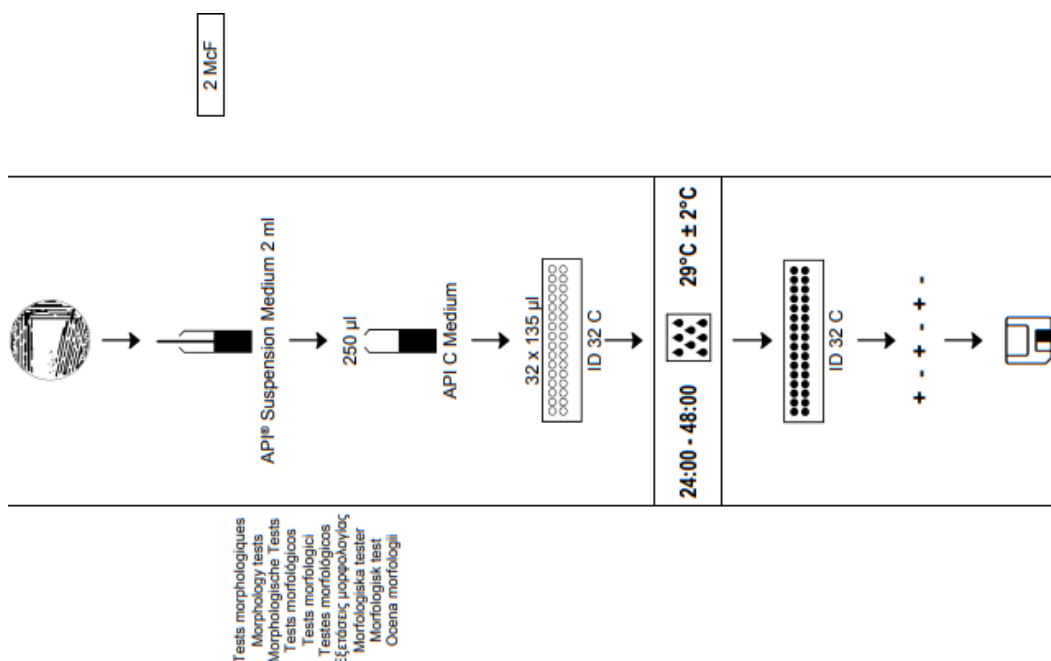
daļā un izvairītos no gaisa burbulīšu iekļūšanas tajā. Uzpildot ļauj inokulātam tecēt gar iedobes sānu malu.

7. Uz pamatnes uzliec vāciņu, nosedzot API stripu, un inkubē optimālā temperatūrā norādīto laika periodu.

Suspensijas sagatavošana raugu identifikācijai

1. Atver API suspensijas barotni 2 ml, ievieto to densitometrā un ar sterilu cilpiņu ienes testējamo rauga tīrkultūru līdz 2 McF (McFarlanda) vienībām, kārtīgi izmaisa.
2. No sagatavotās rauga tīrkultūras suspensijas ņem 250 µl un pievieno tos API C barotnei, sajauc.
3. Ar automātisko pipeti katrā API testa stripa iedobē iepilda precīzi 135 µl no API C barotnes, kurā ienesta rauga tīrkultūra,
4. Inkubē 30 °C temperatūrā 24 h (pirmā pārbaude), pēc tam vēl 24 h (otrā pārbaude, kopā inkubācija 48 h).
5. Nolasa katra testa rezultātus (pozitīvs – iedobē novērojams saduļļojums vai negatīvs – saduļļojuma nav) un tos pieraksta (40. att.).
6. Izmantojot APIweb™ aplikāciju, ievada ciparu kodu un pieraksta identificētā rauga nosaukumu.

Raugu, *Lactobacillus spp.* un *Bacillus spp.* identifikācijas API testa shematiskais attēlojums



Raugu identifikācija (ID 32 C)

Izmantotā literatūra

1. API 50 CHB/E Medium *Bacillus* and related genera / *Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae*. Pieejams: https://www.mediray.co.nz/media/15798/om_biomerieux_test-kits_ot-50430_package_insert-50430.pdf
2. API 50 CHL Medium *Lactobacillus* and related genera. Pieejams: https://www.mediray.co.nz/media/15797/om_biomerieux_test-kits_ot-50410_package_insert-50410.pdf
3. API ID 32 C Identification system for yeasts. Pieejams: https://www.mediray.co.nz/media/15793/om_biomerieux_test-kits_ot-32200_package_insert-32200.pdf
4. Bell C., Neaves P., Williams A.P. (2005) Food Microbiology and laboratory practice. Blackwell Science, Oxford. 324 p.
5. Bumgart J. (2004) Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Behr's Verlag, Hamburg; Auflage: 5. 897 S.
6. Debevere J., Devlieghere F., Samapundo S. (2006) Practical course Food Microbiology. International Course in Food Science and Nutritional. University of Gent. 27 p.
7. Hutkin R.W. (2016) Microbiology and Technology of Fermented Foods. - USA, Blackwell Publishing, Ames: 2nd edition. – 616 p.
8. Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A. (2005) Modern Food Microbiology. Springer, New York: 7th edition, 790 p.
9. Krämer J. (2016) Lebensmittel-Mikrobiologie. UTB, Stuttgart; Auflage: 7. 400 S.
10. Lazdiņš M. (2000) Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas elementi. LU Bioloģijas fakultāte, Rīga. Pieejams: <http://skolai.daba.lv/liis/biotehnologijas/>
11. LVS EN ISO 6887-1:2017 - Pārtikas ķēdes mikrobioloģija. Testēšanas paraugu, sākotnējās suspensijas un decimālšķīdumu sagatavošana mikrobioloģiskām pārbaudēm.
12. LVS EN ISO 7218:2007 - Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija. Vispārīgās prasības un norādījumi mikrobioloģiskām pārbaudēm.
13. LVS EN ISO/IEC 17025 – Testēšanas un kalibrēšanas laboratoriju kompetences vispārīgās prasības (ISO/IEC 17025:2017)
14. McLandsborough L. (2005) Food Microbiology Laboratory. CRC Press, London. 176 p.
15. Priest F.G., Campbell I. (2002) Brewing Microbiology. Springer, US; 3rd edition. 399 p.
16. Robert T.A., Aecolas J.P. (1996) Dairy starter cultures. VCH, Weinheim; 277 p.
17. Roberts D., Greenwood M. (2003) Practical food microbiology. Blackwell Publishing, Oxford: 3rd edition. 294 p.
18. Schlegel H.G.(1992) Allgemeine Mikrobiologie. Thieme, Stuttgart; Auflage: 7. 634 S.
19. Schmid R.D. (2003) Pocket Guide to Biotechnology and Genetic Engineering. Wiley–VCH, Weinheim. 360 p.
20. Veskus T. (1999) Mikrobioloģija. Tallinna tehnikaulikool, Toiduainete instituut, Tallin. 109 p.
21. Нетрусов А., Егорова М., Захарчук Л. (2005) Практикум по микробиологии, Москва Академия. 598 стр.