

XI. 7. МИКРОБИОЛОШКА АНАЛИЗА ПИВА

Правилником о микробиолошкој исправности намирница у промету прописани су и општи услови у погледу микробиолошких захтева за пиво.

Општи услови које морају испуњавати намирнице у промету, а самим тим и све врсте пива, односе се на врсте микроорганизама које не сме садржати одређена количина узорка и то:

1. бактерија рода *Salmonella* у 25 ml,
2. коагулаза позитивне стафилококе у 0,01ml.
3. сулфиторедукујуће клостридије у 0,01 ml,
4. *Proteus* врсте у 0,001 ml,
5. *Escherichiae coli* у 0,001 ml.

Посебни захтеви су прописани за непастеризовано а посебни за пастеризовано пиво.

Непастеризовано пиво не сме садржати бактерију *Escherichiae coli* у 1 ml. Пастеризовано пиво не сме садржати *Escherichiae coli* у 10 ml, ни коагулаза позитивне стафилококе, сулфиторедукујуће клостридије и *Proteus* врсте у 0,1 ml.

Микробиолошка контрола пива обухвата следеће анализе:

- изоловање и идентификацију бактерија рода *Salmonella* у 25 ml,
- изоловање и идентификацију коагулаза позитивних стафилокока у 0,01 ml или 0,1 ml зависно од врсте пива,
- изоловање и идентификацију сулфиторедукујућих клостридија у 0,01 ml или 0,1 ml зависно од врсте пива,
- изоловање и идентификацију *Proteus* врста у 0,001 ml или у 0,1 ml зависно од врсте пива,
- изоловање и идентификацију *Escherichiae coli* у 0,001 ml, 1 ml или 10 ml зависно од врсте пива.

XI. 7.1. Припрема узорка пива за микробиолошку анализу

Након хомогенизације узорка пива за испитивање, одмери се 150 ml и пренесе у ерленмајер боцу са стакленим куглицама. Садржај се мућка 5 до 10 min како би се отклонио угљен-диоксид.

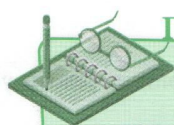
Основно разређење добија се преношењем 1 ml узорка у епрувету са 9 ml стерилног физиолошког раствора. Потребна даља децимална разређења припремају се на исти начин.

XI. 7.2. Изоловање и идентификација *Escherichiae coli*

МАТЕРИЈАЛ



- узорак пива,
- епрувета са брилијантзеленим лактоза-жучним бујоном (46) и Дурхамовом цевчицом,
- љубичасто-црвени жучни агар (36),
- хранљиви агар (2),
- пептонска вода за индол (10),
- подлога за извођење MR огледа (12),
- подлога за извођење VP огледа (12),
- подлога за доказ коришћења цитрата (15).



ПОСТУПАК

Количина потребна за засејавање зависи од врсте производа. За непастеризовано пиво отпипетира се стерилном пипетом 1 ml узорка, а за пастеризовано пиво 10 ml узорка и директно преноси у епрувету са брилијант-зеленим лактоза-жучним бујоном са Дурхамовом цевчицом. Код других намирница користи се 1 ml основног или одређеног децималног разређења.

Засејана подлога се благо промућка и инкубира током 24 до 48 часова при температури од 44 °C. Стварање гаса у цевчици након инкубирања и промена боје подлоге, означавају **позитиван претходни оглед**.

Из епрувета са позитивним претходним огледом езом се пресејава садржај на површину љубичасто-црвеног жучног агара који се затим инкубира 24 до 48 часова на 44 °C ± 1°C. Раст карактеристичних пурпурноцрвених колонија на површини подлоге и налаз грам негативних штапића у микроскопском препарату означава се као **позитиван потврдан оглед**. Колоније сумњиве *E. coli* преносе се на коси агар, инкубирају 24 часа на 37 °C и идентификују кратким биохемијским низом – IMVC огледом.

Културе се пресејавају у пептонску воду за индол, течну подлогу са глукозом за извођење MR и VP огледа и на коси агар за доказивање коришћења цитрата. Подлоге се инкубирају 24 до 48 часова на 37 °C. Након читавања резултата идентификација *E. coli* (завршни оглед) обавља се према табели XI.2.

Табела XI. 2.
КРИТЕРИЈУМИ ЗА
ИДЕНТИФИКАЦИЈУ
E. COLI

| Род | Индол | MR | VP | Simons цитрат |
|--------------------------------|-------|----|----|---------------|
| <i>Escherichiae coli</i> | + | + | - | - |
| <i>Citrobacter</i> | - | + | - | + |
| <i>Klebsiella-enterobacter</i> | - | - | + | + |

XI. 7.3. Изоловање и идентификација коагулаза позитивних стафилокока

Род *Staphylococcus* садржи више врста од којих је за прехранбену технологију и медицину од посебног значаја врста *Staphylococcus aureus*. Сојеви *S. aureus* изазивају алиментарна обољења људи до којих долази конзумирањем хране контаминираним овим бактеријама или већ излученим ентеротоксином.

Као и друге врсте овог рода *S. aureus* спада у веома отпорне бактерије. Сојеви *S. aureus* брзо се размножавају у сланим и слатким намирницама и у њима производе токсичне материје. Због изразите толеранције према натријум-хлориду за изоловање стафилокока из разних средина користе се подлоге са повишеним концентрацијама натријум-хлорида.

Према Правилнику о микробиолошкој исправности намирница, обавезном контролом обухваћене су коагулаза позитивне (патогене) стафилококе.

МАТЕРИЈАЛ



- узорак или припремљено разређење,
- слани бујон (38),
- крвна плазма,
- ETGP агар по Baird-Parkeru (39).

ПОСТУПАК



Према Правилнику о методама обављања микробиолошких анализа и суперанализа животних намирница поступак изловања и идентификације коагулаза позитивних стафилокока обавља се на два начина: претходним засејавањем у слан бујон који служи за обогаћење и накнадним пресејавањем на чврсту подлогу или засејавањем директно на чврсту подлогу.

Ако се коагулаза позитивне стафилококе траже у 1g или 1 ml узорка намирнице, онда се та количина након хомогенизовања засеје у слан бујон.

Ако се коагулаза позитивне стафилококе траже у 0,1 g узорка чврсте намирнице, онда се у слан бујон засеје 1 ml основног разређења узорка.

Епрувете са засејаним сланим бујоном се инкубирају 24 часа на 37 °С. Након инкубирања бујонска култура се езом пресејава на површину ETGP подлоге по Baird-Parker-у.

Када се коагулаза позитивне стафилококе траже у 0,1 ml течне намирнице или 0,01 g чврсте намирнице онда се 0,1 ml течне намирнице или 0,1 ml основног разређења чврсте намирнице засејава без претходног обогаћења на површину ETGP подлоге по Baird-Parker-у.

Код непастеризованог пива засејава се 0,01 ml, а код пастеризованог пива 0,1 ml узорка без претходног обогаћења на површину ETGP подлоге по Baird-Parker-у.

Затим се узорак размазује стерилним штапићем по Дригалском по површини подлоге. Засејана подлога инкубира се 24 до 48 часова на 37 °С.

На ETGP подлози колоније *S. aureus* су црне боје, конвексне и сјајне, са узаном ивицом беле боје. Око колоније образује се прозирна зона.

Израсле колоније, типичне за коагулаза позитивне стафилококе проверавају се на способност коагулисања плазме односно на присуство ензима коагулазе.

Тест коагулаза плазме

Овај тест служи за доказивање ензима коагулазе. Као супстрат користи се свежа или дехидрирана плазма кунића или човека, неразређена или разређена физиолошким раствором у односу 1 : 5.

У три стерилне епрувете сипа се од 0,5 до 1,0 ml плазме. У прву епрувету унесе се култура која се испитује, у другу иста количина познатог коагулаза позитивног стафилокока, а трећа епрувета је контролна. Епрувете се затим инкубирају на 37 °С, а резултати читавају након 2, 4, 6 и 24 часа.

Позитивном реакцијом сматра се потпуна коагулација плазме у првој и другој епрувети, док у трећој епрувети не сме доћи до коагулације.

XI. 7.4. Изоловање и идентификација сулфиторедукујућих кластридија

Присуство кластридија у намирницама указује на фекално загађење и доказ је хигијенске неисправности намирница.

МАТЕРИЈАЛ



- припремљено основно или децимално разређење узорка за испитивање,
- сулфитни агар (34),
- крвни агар (16).





ПОСТУПАК

Пренесе се у стерилну епрувету 1 ml основног или одговарајућег децималног разређења узорка. Епрувета се затим стави у водено купатило 10 min на температури 80 °C. Након тога у епрувету се сипа отопљени сулфитни агар тако да стуб подлоге не буде виши од 14 cm, односно да удаљеност од чепа не буде већа од 1 cm.

Засејана подлога инкубира се 3–5 дана на 37 °C.

Сулфиторедукујуће кластридије у овој подлози расту у облику већих или мањих црних лоптастих колонија. Када су у већем броју, дифузно боје целу подлогу. Услед стварања гаса (H_2S) може доћи до цепања подлоге. Све наведене карактеристике означавају се као **позитиван претходан оглед**.

Потврдан оглед изводи се тако што се од карактеристичних црних колонија направи препарат и обоји по Граму. Истовремено се култура езом преноси на крвни агар и инкубира аеробно 48 часова на 37 °C. Налаз грампозитивних штапићастих бактерија са спорама или без њих у видном пољу и изостанак раста на крвном агару сматра се доказом присуства сулфиторедукујућих кластридија у узорку.



ПИТАЊА И ЗАДАЦИ

1. Шта је пиво?
2. Наведи сировине којима се може заменити део јечменог слада код производње пиварске сладовине.
3. Које супстанце се могу користити код производње пива?
4. Наведи врсте пива у промету.
5. Које услове мора да испуњава пиво које се ставља у промет (према Правилнику о квалитету)?
6. Који параметри одређују физичко-хемијске карактеристике пива?
7. Како се узима узорак пива пуњеног у боце?
8. Како се припрема узорак пива за анализу?
9. Које анализе се раде ради провере квалитета пива?
10. На ком принципу се заснива одређивање алкохола у пиву?
11. На који начин се одређује прави екстракт у пиву?
12. Како се израчунава садржај екстракта у основној сладовини применом Балингове формуле?
13. На шта указује степен преврелости код пива?
14. На ком принципу се заснива одређивање садржаја малтозе у пиву ензимском методом?
15. Шта је биолошка постојаност пива и како се одређује?
16. Које врсте микроорганизама се не смеју налазити у пиву?
17. Који посебни услови се постављају за пастеризовано и непастеризовано пиво у погледу садржаја микроорганизама?
18. Које врсте микробиолошких испитивања треба урадити код непастеризованог и пастеризованог пива како би микробиолошка слика била потпуна?
19. Како се припрема узорак пива за микробиолошка испитивања?
20. На који начин се врши изоловање и идентификација *E. Coli*?
21. Зашто се обављају изоловање и идентификација коагулаза позитивних стафилокока?

