

HEALTH SAFETY OF FRESH AND PRESERVED SARDINES *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792)

Maja Laco¹, Asmir Aldžić², Huska Jukić^{2*}, Suad Habeš³

¹Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu, Zmaja od Bosne 33-35, 71 000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina

²Visoka zdravstvena škola, Univerzitet u Bihaću, Nositelja hrvatskog trolista 4, 77 000 Bihać, Bosna i Hercegovina

³Fakultet zdravstvenih studija, Univerzitet u Sarajevu, Bolnička 25, 71 000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Stručni rad

Sažetak

Mikrobiološkom analizom odredili smo prisutnost određenih vrsta bakterija u konzerviranoj sardini. Ukupan broj uzoraka konzervirane sardine je bio 33 kupljenih u Sarajevu u različitim općinama Kantona Sarajevo (Stari grad, Centar, Novo Sarajevo, Novi Grad, i Ilidža).

Uzorkovano je ukupno 8 uzoraka svježe sardine (n=8) radi analize prisutnosti mikroorganizama. Sardine (*Sardina pilchardus* Walbaum, 1792) su nakon ulova transportirane do Zavoda za javno zdravstvo FBiH gdje je vršena analiza.

Na osnovu mikrobiološke analize svježe sardine izvršili smo izolaciju i identifikaciju slijedećih bakterijskih vrsta: *Clostridium* spp., *Enterobacteriaceae* i *Salmonella* spp., dok se kod konzervirane sardine izvršila izolacija i identifikacija za slijedeće bakterijske vrste: aerobne mezofilne bakterije, *Listeria* spp. i *Clostridium* spp.

Od 33 uzorka konzerviranih sardina nakon određene inkubacije izolirali smo aerobne mezofilne bakterije i nakon određenih razrjeđenja kod određenih sardina njihov broj je bio veći od MDK.

Aerobne mezofilne izolirane su na ukupno 27 uzoraka konzerviranih sardine i njihov broj bio je veći od MDK (<1cfu/g), a 6 uzoraka je imao manji broj od MDK. U slučaju da nema kolonija za izbrojati umjesto nula pišemo <10 cfu/g. Najveći broj je 519 CFU/g, a najmanji <10 cfu/g.

Nakon inkubacije *Listeria* spp. i *Clostridium* spp. nisu izolirane u 33 uzorka konzerviranih sardina. *Listeria* spp. nije dozvoljena u 25 g ispitivanog uzorka, dok *Clostridium* spp. iznosi <1cfu/g za sve 33 konzerve sardine.

Mikrobiološkom analizom osam svježih sardina u periodu od svibnja do srpnja 2015. iz ribarnica na području sljedećih općina grada Sarajeva: Centar, Novi Grad, Stari Grad i Novo Sarajevo, izvršila se izolacija i identifikacija sljedećih bakterija: *Salmonella* spp., *Enterobacteriaceae* i *Clostridium* spp. Iz osam uzoraka svježe sardine *Salmonella* spp. nije izolirana u 25 g svježe sardine.

Ključne riječi: izolacija, identifikacija, mikroorganizmi, konzervirana sardina, svježa sardina

Uvod

Srdela *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) se smatra kraljicom riba. Spada u plave ribe. Prerađevine dobivene preradom pojedinih vrsta riba odgovarajućim tehnološkim postupkom koji obuhvaća i toplotnu obradu (sterilizacija) ribljih konzervi pakovanih u hermetički zatvorene limenke na temperaturi od najmanje 100 °C. Za proizvodnju ribljih konzervi može se upotrijebiti samo riba koja ispunjava propisane uslove kvaliteta i higijenske ispravnosti. Ne smije se upotrebljavati glava, oči, škrge, peraja i utroba riba. U proizvodnji konzervi od ribljeg mesa poznato je više grupa, kao što su: riblje konzerve u slanom rastvoru, riblje konzerve u ulju, konzerve od dimljene ribe u ulju, konzerve od blanširane ribe u ulju, riblje konzerve u paradajz sosu, konzerve od ribe sa povrćem, konzerve od ribe sa povrćem u paradajz sosu, konzerve od ribe sa povrćem u različitim sosovima i riblje paštete (Adak i sur., 2002; Bem i sur., 1991).

Uzročnici su kvarenja hrane mikroorganizmi, pa za održanje kvalitete hrane treba suzbiti njihovu

aktivnost. Metodama konzerviranja mikroorganizmi se ubijaju ili uklanjaju iz hrane ili se pak stvaraju uvjeti nepovoljni za njihov rast i razvoj (hlađenje, smrzavanje, koncentriranje, sušenje, konzerviranje prirodnim konzervansima, biološko konzerviranje) (Burger i sur., 2005).

Konzerviranje dodacima podrazumijeva primjenu prirodnih ili kemijskih konzervansa koji bitno ne utječu na organoleptička svojstva. Prirodni su oni konzervansi koji su i sami hrana (šećer, sol, ocat, alkohol) i koji stvaraju nepovoljne uvjete za mikrobnu aktivnost, a obično se kombiniraju s pasterizacijom. Kemijski su konzervansi tvari koje, dodane u vrlo malim koncentracijama, sprečavaju mikrobnu aktivnost ili uništavaju mikroorganizme (Cho i sur., 2005).

Ciljevi istraživanja

- Dokazati zdravstvenu ispravnost konzervirane i svježe sardine *Sardina pilchardus* Walbaum, 1792 na području grada Sarajeva.

- Izvršiti izolaciju i identifikaciju mikroorganizama u konzerviranoj i svježoj sardini *Sardina pilchardus* Walbaum, 1792.

Materijali i metode istraživanja

Materijali

Uzorkovano je ukupno 33 uzorka ribljih konzervi - sardina (n=33) i 8 uzoraka svježih sardine (n=8) radi analize prisutnosti mikroorganizama. Srdele (*Sardina pilchardus* Walbaum, 1792) bile su izlovljene u Jadranskom moru na teritoriju Republike Hrvatske i prerađene u konzerve u hrvatskim tvrtkama za preradu ribe. Sardine su bile pakirane u hermetički zatvorene limenke neto mase 90 g, 100 g, 115 g i 125 g. Ostale zemlje porijekla sardina su Filipini, Thailand i Brazil. Najčešće vrste uzoraka bile su "Sardina u biljnom ulju", "Sardina u umaku od "rajčice", "Sardina u maslinovom ulju", "Sardina sa povrćem" i "Sardina sa limunom". Konzervirane sardine kupljene su u različitim trgovinama kao i svježi uzorci sardine kupljeni u ribarnicama na području općine Stari Grad, Centar, Novi grad, Novo Sarajevo i Ilidža.

Metode

Postupak rada i određivanje zdravstvene ispravnosti sardine izvodio se u Zavodu za javno zdravstvo Federacije Bosne i Hercegovine na odjelu za Mikrobiološku kontrolu hrane gdje su uzorci dostavljeni. Laboratoriji su akreditirani prema normi EN/IEC 17025.

Mikrobiološke analize zasnivale su se na izolaciji i identifikaciji slijedećih bakterijskih vrsta: *Clostridium* spp., *Enterobacteriaceae* i *Salmonella* spp., te aerobne mezofilne bakterije, *Listeria* spp. i *Clostridium* spp.

Rezultati istraživanja

Mikrobiološka analiza konzervirane sardine

Konzervirane sardine inkubirale su se devet dana (inkubacija traje od 7 do 10 dana) na 37 °C i nakon inkubacije izvršila se izolacija i identifikacija slijedećih bakterija: *Clostridium* spp., *Listeria* spp. i aerobne mezofilne bakterije na hranjivim selektivnim podlogama.

Izolacija i identifikacija *Clostridium* spp.

Priprema uzorka za izolaciju i identifikaciju *Clostridium* spp. odvija se na slijedeći način: Jedan

gram ili 1 ml uzorka se pomiješa s 9 ml fiziološkog rastvora. Vodeno kupatilo zagrijavamo na temperaturu od 80 °C i epruvetu s uzorkom zagrijati na 10 minuta. Zagrijanu epruvetu ohladiti pod mlazom vode i u ohlađenu epruvetu nasuti pripremljeni Sulfatni agar. Izmiješati nekoliko puta danu epruvetu i ostaviti na inkubacija od 3 do 5 dana na 37 °C. Ako je uzorak pozitivan na *Clostridium* spp. Uočiti ćemo crne kolonije izrasle u dnu epruvete (striktni anaerob). Potrebno je pripremiti preparat po Gramu: Gram+ sporogeni štapići. Za dokaz anaerobioze crne kolonije se presijavaju na Krvni agar (KA) i inkubiraju aerobno 24 sata na 37 °C i anaerobno 48 sati na 37 °C. Kolonije trebaju rasti samo u anaerobnim uvjetima (Karačašević, 1987; Duraković, 1996; Arsenijević i sur., 1999; Govedarica i sur., 1995; Ha, 1996).

Izolacija i identifikacija *Listeria monocytogenes*

Mikroorganizmi rastu na čvrstim selektivnim podlogama u obliku kolonija i posjeduju karakteristične morfološke, fiziološke i biokemijske osobine koje se dokazuju određenim testovima u skladu s ISO 11290. Otkrivanje *Listeria monocytogenes* zahtjeva uzastopne faze:

Primarno obogaćivanje selektivnog tečnog medija (podloge) sa smanjenom koncentracijom agenasa. Inokulacija u 1 ml ili 1 g uzorka u 9 ml DFB (Demi Fraser Broth Base) i dobiva omjer (1:10) ispitivanog uzorka na primarno obogaćenu selektivnu podlogu. Inkubacija traje 24 sata na 30 °C.

Sekundarno obogaćivanje sa selektivno obogaćenom podlogom uz visoku koncentraciju agenasa. Poslije inkubacije, inokulum od 0,1 ml unosimo u sekundarno obogaćenu podlogu (LFB) volumena 10 ml. Inkubacija traje 48 h na 35 °C do 37 °C.

Presijavanje i identifikacija: Kultura koja je zasijana na primarnu selektivnu podlogu nakon inkubacije zasijava se na čvrstu selektivnu podlogu (Oxford agar- OA) na kojem rastu kolonije odvojene jedna od druge. Sa sekundarno selektivne podloge nakon inkubacije presijavamo na PALCAM agar. Kolonije koje izrastu su karakteristične boje. Na Oxford agaru nakon inkubacije (18 h do 24 h) rastu karakteristične kolonije za koje se sumnja da se radi o *Listeria* spp., one su male promjera 1 mm, sive i okružene crnim aureolom. Poslije 48 h kolonije postaju tamnije s mogućim sivim sjajem i promjera 2 mm s crnim aureolom i dubljim centrom. PALCAM agar, inkubacija se provodi 24 h u termostatu na 37 °C i 1 sat pod aerobnim uslovima na zraku. Ploče zasijane dobivaju rozu boju do purpurne. Poslije inkubacije, ako se radi o *Listeria* spp. kolonije su sive, a ponekad i maslinasto zelene boje s crnom aureolom, promjera

1,5 mm do 2 mm. Nakon 48 h inkubacije kolonije *Listeria* spp. postaju zelene boje s istim promjerom, aureolom i udubljenjem.

Dokazivanje *Listeria* spp.: Odabranu koloniju presijati na tripton soya yeast extract agar (TSYEA) i inkubirati 18 h do 24 h na 37 °C. Tipične kolonije su od 1 mm do 2 mm i pojedinačne.

Katalaza je još jedna od metoda koje se koriste za dokazivanje *Listeria* spp. Kap hydrogen peroksisa s kolonijom *Listeria* spp. rezultira pjenušavošću i to je pozitivna reakcija.

Bojenje po gramu se radi za dokazivanje da li se radi o *Listeria* spp.

Hemoliza: Ako su morfološke, fizičke i katalaza indikativne reakcije na *Listeria* spp. onda sljedeći korak za identifikaciju je hemoliza. Koloniju s TSA presijati na krvni agar na 37 °C u period od 24 h. U slučaju da se radi o *Listeria monocytogenes* uske zone su zeleno svijetle sto upućuje na beta hemolizu i ona je karakteristična za danu vrstu.

CAMP test: CAMP-pozitivan na *Listeria monocytogenes*, tako što se kolonija zasijala pod pravim kutom na beta-hemolitički *Staphylococcus aureus*. Napomena strelicu obliku zone pojačane hemolize ukazuje pozitivan CAMP test. Ako se ne pojavi strelica ili tzv. sjekira upućuje da se ne radi o *Listeria monocytogenes* (Karakašević, 1987, Duraković, 1996, Govedarica i sar., 1995, Ha, 1996).

Izolacija i identifikacija aerobnih mezofilnih bakterija

Određivanje broja bakterija u konzerviranoj sardini vrše se brojanjem kolonija izraslih na hranjivom agaru (HA). Ovako se određuje broj živih bakterija u određenom volumenu konzerviranih sardina najčešće u 1 ml. Postupak je isti kao pri određivanju ukupnog broja bakterija u vodi za piće. Razlika je samo u tome što se bakterije broje u konzerviranoj sardini koje je razrijeđeno s fiziološkom otopinom 1: 100 i 1: 1.000, a prema potrebi i u razrjeđenjima 1: 10.000 i 1: 100.000. Potom se 1 ml konzervirane sardine uzorka prenese u sterilne Petrijeve zdjelice. U Petrijeve zdjelice se doda pripremljen i na 45 °C ohlađen hranjivi agar. Agar se s razblaženjem uzorka oprezno promiješa laganim pokretanjem petrijevki na stolu. Kada se agar ohladi i stvrdne, stave se petrijevke u termostat na 37 °C / 24-48 sati. Nakon inkubacije broje se porasle kolonije u pločama gdje ih je više od 50, a manje od 300. Broj kolonija se pomnoži s razrjeđenjem i dobije broj bakterija u 1 ml. Izračunavanje broja bakterija iz uzorka (CFU-Colony forming unit) "jedinice koje tvore kolonije". Utvrđivanje ukupnog broja bakterija u ribi utvrđuju se direktnim ili indirektnim metodama. Direktne

metode su brojanje bakterija na čvrstom hranilištu i mikroskopske metode.

Klasična metoda: Pojam klasična metoda podrazumijeva prosuđivanje broja bakterija na standardnom čvrstom hranilištu u Petrijevim zdjelicama nakon inkubacije uzoraka na temperaturi od 30 °C kroz 72 h. Svaka porasla kolonija može se razviti ili iz pojedinačne bakterijske stanice ili iz nakupine pojedinačnih bakterijskih stanica. Radi usporedivosti rezultata, dogovorom je usvojeno da svaka kolonija predstavlja jednu bakterijsku stanicu. Tako se broj bakterija u uzorku izračunava na osnovi broja poraslih kolonija prema formuli:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d}$$

N = broj bakterija u mililitru ispitivanog uzorka

Σ C = suma svih poraslih kolonija na svim izbrojivim Petrijevim zdjelicama

n1 = broj Petrijevih zdjelica u prvom izbrojivom razrjeđenju

n2 = broj Petrijevih zdjelica u drugom izbrojivom razrjeđenju

d = prvo izbrojivo razrjeđenje

Klasična metoda, u gotovo svim državama, smatra se referentnom metodom za određivanje ukupnog broja bakterija u hrani. Zbog statusa referentne metode, klasičnom metodom procjenjuje se točnost i svih ostalih metoda za utvrđivanje ukupnog broja bakterija. Glavni nedostaci klasične metode su izrazito dugo vrijeme potrebno za dobivanje rezultata i neprikladnost metode u analizi velikog broja uzoraka mlijeka. Metode za utvrđivanje bakterija u ribi često se dijele i na kvalitativne i kvantitativne. Kvalitativnim metodama dokazuje se samo prisustvo određenih bakterijskih vrsta, a direktnim kvantitativnim metodama utvrđuje se broj prisutnih bakterija. Za razliku od direktnih, indirektnim kvantitativnim metodama prosuđuje se broj bakterija na osnovi njihovih metaboličkih produkata. Prosuđivanje broja bakterija utvrđuje se najčešće mjerenjem količine ATP-a, piruvata, enzima ili toksina (Karakašević, 1987; Duraković, 1996; Govedarica i sur., 1995; Ha, 1996).

Mikrobiološka analiza svježe srdele

Na osnovu mikrobiološke analize svježe sardine izvršili smo izolaciju i identifikaciju sljedećih bakterijskih vrsta: *Clostridium* spp., *Enterobacteria* i *Salmonella* spp.

Izolacija i identifikacija *Salmonella* spp.

Detekcija *Salmonella* spp. zahtjeva četiri sukcesivne faze:

1. Prethodno obogaćenje u neselektivnom tečnom hranljivom mediju

Prije upotrebe peptonsku vodu temperirati na sobnoj temperaturi. U 25 g homogeniziranog uzorka dodati 225 ml sterilizirane puferirane peptonske vode.

Tikvice se zatim stavljaju na mješalicu tokom 15 min., nakon čega se inkubiraju tokom 18±2h na temperaturi od 37 ±1 °C.

2. Obogaćenje u selektivnom tečnom hranljivom mediju

Kultura dobivena u 5.5.1. se inokuliše u Rappaport-Vassiliadis hranljivu podlogu sa sojom (RVS bujon) i Muller-Kauffmann tetratonat/novobiocin bujon (MKTTn bujon). Prije nego se pristupi inokulaciji bujona (RVS bujon) i (MKTTn bujon) razlivenog u epruvete, iste je potrebno premjestiti iz hladnjaka za čuvanje pripremljenih mikrobioloških podloga na sobnu temperaturu u cilju temperiranja, te izvršiti njihovo obilježavanje upotrebom marker flomastera. U mikrobiološke epruvete se otpipetira, pomoću sterilne pipete po 10 ml RVS bujona i po 10 mL MKTTn bujona. Ovaj volumen RVS bujona se inokulira mikropipetom sa 0,1 mL inokuluma iz Erlenmeyerove tikvice (puferirana peptonska voda, nakon inkubacije), dok se volumen MKTTn bujona inokulira istim inokulumom u količini od 1 mL. Zatim se epruveta zatvori i izvrši se homogenizacija razrjeđenja uzorka miješanjem epruvete upotrebom vortex mješalice. Nakon inokulacije MKTTn bujon se inkubira na temperaturi od 37±1 °C/24±3 h, dok se RVS bujon inkubira na temperaturi od 41,5±1 °C/24±3 h (Karaklašević, 1987; Duraković, 1996; Govedarica i sur., 1995; Ha, 1996).

3. Selektivno zasijavanje i identifikacija

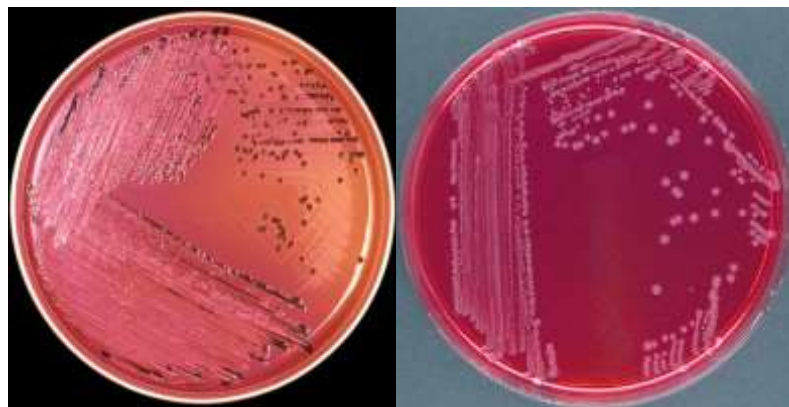
Nakon inkubacije tečnih medija, iz kultura, u laminaru, vrši se zasijavanje ezom na dvije čvrste selektivne hranljive podloge iz prethodno obogaćenih bujona. Zasijavaju se ksiloza lizin deoksiholat agar (XLD) i još jedan agar komplementaran XLD-u, a to je SS agar. Prije upotrebe, selektivne ploče temperirati na sobnoj temperaturi, te izvršiti njihovo obilježavanje upotrebom vodootpornog marker flomastera.

Inokulacija se vrši pomoću eze te se ploče inkubiraju tokom 24±3 h na temperaturi od 37±1 °C. Nakon inokulacije ezom poklopljene ploče XLD i SS agara se ostave kratko vrijeme na sobnoj temperaturi i nakon toga se odlažu u inkubator obavezno okrenute na poklopac. Dozvoljeno je slaganje Petrijevih ploča jedna na drugu, ali maksimalno do 6 ploča. Za svaku seriju ploča koje su urađene istog dana obavezno je označiti datum i vrijeme početka inkubacije i sve naredne korake do finalnog procesa očitavanja (Karaklašević, 1987; Duraković, 1996; Govedarica i sur., 1995; Ha, 1996).

4. Nakon inkubacije ispitati ploče na prisustvo tipičnih i sumnjivih kolonija

Tipične kolonije *Salmonella* spp. izrasle na XLD podlozi imaju crni centar s blago transparentnom zonom crvenkaste boje. *Salmonella* spp. H₂S negativni sojevi (npr. *Salmonella paratifi* A) izrasle na XLD su roza boje sa tamnijim roza obojenim centrom. Laktoza pozitivne *Salmonella* spp. izrasle na XLD agaru su žute, s ili bez nijanse crne boje (Slika 1).

Tipične kolonije *Salmonella* spp. izrasle na SS podlozi su neprozirne i roza boje. Neki laktoza i/ili saharoza fermentirajući organizmi koji takođe izrastu na navedenom agaru, lako se razlikuju zbog formiranja zelenih kolonija (Karaklašević, 1987; Duraković, 1996; Govedarica i sur., 1995; Ha, 1996).



Slika 1. Tipičan rast *Salmonella* spp. na XLD agaru (lijevo) i SS agaru (Preuzeto: <http://lib.sytu.edu.cn/asm/092-Introduce.htm>)

Fig. 1. Typical growth of *Salmonella* spp. XLD agar (left) and SS agar (<http://lib.sytu.edu.cn/asm/092-Introduce.htm>)

Za potvrđivanje sa svake zasijane čvrste selektivne podloge se uzima najmanje jedna kolonija za koju se smatra da je tipična ili sumnjiva. Odabrane kolonije se zasijavaju po cijeloj površini hranljivog agara na način koji će omogućiti dobro razmnožavanje zasijanih kolonija. Hranljivi agar se inkubira na temperaturi 37±1 °C tokom 24±3 h. Na ovaj način se dobijaju čiste kulture za biokemijsku i serološku potvrđivanje.

Biokemijska potvrđivanje

Biokemijsko ispitivanje podrazumijeva (Tablica 1) reakciju razgradnje glukoze na kosom TSI (Triple sugar iron) agaru uz stvaranje gasa i H₂S, reakciju razlaganja uree, reakciju dekarboksilacije lizina, Vogues-Proskauer test, reakciju stvaranja indola i reakciju dokazivanja β-galaktozidaze.

- **Test na trostruki šećer (TSI):**

Ubodnom ezom zasijati trostruki šećer prvo po kosini, a zatim ubodom u dubini agara. Inkubirati 24±3 h/37±1 °C

- **Test na urea agar**

Zasijati kosinu agara, inkubirati 37±1 °C/24±3 h i ispitivati u intervalima. U slučaju pozitivne reakcije, razlaganjem uree oslobađa se amonijak, koji mijenja boju fenola od crvene do ružičaste i kasnije do ciklama boje. Ova reakcija je često vidljiva nakon 2-4 sata. SALMONELLA NEG (100%)

- **Test na L-lizin dekarboksilni medij**

Inokulaciju izvršiti točno ispod površine tečne hranljive podloge. Inkubirati na 37±1 °C/24±3. Zamućenost i ružičasta boja poslije inkubacije označavaju pozitivnu reakciju. Žuta boja označava negativnu reakciju. SALMONELLA POZ (94,6%)

- **Test na β-galaktozidazu**

Ezom preneti sumnjivu koloniju u epruvetu koja sadrži 0,25 ml fiziološkog rastvora. Dodati 1 kap toluena i promućkati. Staviti epruvetu u vodeno kupatilo podešeno na 37 °C i ostaviti nekoliko minuta. Dodati 0,25 ml reagensa za dokazivanje β-galaktozidaze, promiješati i vratiti epruvetu u vodeno kupatilo na 37±1 °C/24±3 h. Epruvetu ispitivati u vremenskim intervalima. Reakcija je vidljiva poslije 20 min. Žuta boja označava pozitivnu reakciju. Ovaj test je moguće izvesti i pomoću komercijalno kupljenih ONPG diskova koji se koriste za dokazivanje prisutnosti β-GALAKTOZIDAZE, enzima prisutnog u laktoza fermentirajućim organizmima. Diskove koristiti prema uputama proizvođača. SALMONELLA NEG (98,5%)

- **VP test (Voges-Proskauer reakcija)**

Ezom preneti sumnjivu koloniju u sterilnu epruvetu koja sadrži 3 ml VP medija. Inkubirati 37±1 °C/24±3 h. Nakon inkubacije dodati po 2 kapi kreatinskog rastvora, 3 kapi 1-naftol etanolskog rastvora i po 2 kapi KOH rastvora. Epruvetu promućkati poslije dodavanja svakog reagensa. Pojava roza do svijetlo crvene boje u roku od 15 minuta označava pozitivnu reakciju. SALMONELLA NEG (100%)

- **Dokazivanje indola**

Inokulirati ispitujuću koloniju u epruvetu koja sadrži 5 ml tripton/triptofan hranljive podloge. Inkubirati 37±1 °C/24±3 h te nakon inkubacije dodati po 1 ml Kovačevog reagensa. Pojava crvenog prstena označava pozitivnu reakciju. Žuto smeđi prsten označava negativnu reakciju. SALMONELLA NEG (98,9%)

Tablica 1. Rezultati *Salmonella* spp. na biohemijskom nizu
Table 1. Results of the *Salmonella* spp. on the biochemical row

| Test | Rezultati | % Salmonella sojeva koji pokazuju reakciju |
|-----------------------------------|---------------------------------|--|
| TSI glukoza (produkcija kiseline) | + (žuto dno) | 100 |
| TSI glukoza (produkcija gasa) | + (pukotine) | 91,9 |
| TSI laktoza | - (crvena kosina) | 99,2* |
| TSI saharoza | - (crvena kosina) | 99,5 |
| TSI H ₂ S | + (crna boja) | 91,6 |
| Urea test | - (žuta ili narandžasta boja) | 100 |
| Lizin-dekarboksilaza test | + (purpurna boja i zamućenje) | 94,6 |
| Beta-galaktozidaza test | - (nema promjene boje-bezbojno) | 98,5 |
| VP test | - (žuta boja) | 100 |
| Indol test | - (žuto-smeđi prsten) | 98,9 |

Serološka potvrđivanje i serotipizacija

Detekcija prisustva *Salmonella* spp., O-, Vi- i H-antigena vrši se slajd aglutinacijom na predmetnom stakalcu s odgovarajućim antiserumima. Aglutinacija se vrši selekcijom čistih kolonija i nakon što su auto-aglutinirajući sojevi eliminirani. Upotreba antiseruma se vrši prema uputama proizvođača.

• Ispitivanje O-, Vi- i H- antigena

Koristeći jednu čistu koloniju (a za koju je prethodno utvrđeno da nije auto-aglutinirajuća), na prethodno opisani način izvršiti testiranje, uz primjenu antiseruma O i Vi umjesto fiziološkog rastvora. Ukoliko se primijeti stvaranje grudvica ili krpica reakcija se smatra pozitivnom. Inokulirati u polučvrsti hranjivi agar čistu koloniju (za koju je prethodno utvrđeno da nije auto-aglutinirajuća), te inkubirati na 37 ± 1 °C/24±3h. Nakon inkubacije ponoviti prethodno opisani postupak s primjenom H-antiserumom. Ukoliko se primijeti stvaranje grudvica ili krpica reakcija se smatra pozitivnom.

Ukoliko su potvrđivački testovi bili negativni, smatra se da nije potvrđeno prisustvo *Salmonella* spp. u odgovarajućem razrjeđenju ispitujućeg uzorka, što ovlašteno lice evidentira u predviđenim rubrikama Kartona uzorka i Radnog naloga, zajedno s datumom očitavanja te verifikacijom potpisom. Ukoliko su potvrđivački testovi bili pozitivni, smatra se da je potvrđeno prisustvo *Salmonella* spp. u odgovarajućem razrjeđenju ispitujućeg uzorka, što ovlašteno lice evidentira u predviđenim rubrikama Kartona uzorka i Radnog naloga, zajedno s datumom

očitanja te verifikacijom potpisom. Svi datumi inokulacije selektivnih i neselektivnih medija kao i izvođenja potvrđivačkih testova ispitivač evidentira i verificira svojim potpisom u za to predviđene rubrike (Karaklašević, 1987; Duraković, 1996; Govedarica i sur., 1995; Ha, 1996).

Izolacija i identifikacija *Enterobacteriaceae*

U dvije sterilne Petrijeve posude prebaciti sterilnom pipetom po 1 ml ispitnog uzorka, ako je uzorak tekućina, ili 1 ml početne suspenzije u slučaju uzoraka druge konzistencije. Uzeti dvije druge sterilne Petrijeve ploče i koristeći nove sterilne pipete prebaciti u svaku ploču po 1 ml prvog decimalnog razrjeđenja (10^{-1}) ispitivanog uzorka, ako je uzorak tekućina, ili 1 ml prvog decimalnog razrjeđenja početne suspenzije (10^{-2}) u slučaju uzoraka druge konzistencije. Ponoviti opisani postupak s narednim razrjeđenjem, koristeći novu sterilnu pipetu za svako razrjeđenje. U svaku petrijevu posudu izliti 10 ml medija podloge violet red glukoza žučne podloge ohlađen na 44 do 47 °C u vodenom kupatilu. Vrijeme koje prođe između inokulacije Petrijevih posuda i trenutka kada se podloga izlije ne smije biti duže od 15 minuta. Nakon potpunog stvrdnjavanja smjese dodati pokrovni sloj od 15 ml ljubičasto crvene glukozne podloge, ohlađene na 44 do 47 °C u vodenom kupatilu, kako bi se spriječio rast i postigli polu-anaerobni uvjeti. Ostaviti da se podloga stvrdne. Preokrenuti ploče i inkubirati u inkubatoru na 37 °C 24h ±2h (Slika 2) (Karaklašević, 1987; Duraković, 1996; Govedarica i sur., 1995; Ha, 1996).



Slika 2. *Enterobacteriaceae* na hranjivoj selektivnoj podlozi VRBG (Foto: Laco, 2015)

Fig. 2. *Enterobacteriaceae* on nourishing selective base VRBG (Photo: Laco, 2015)

Karakteristične kolonije su ružičaste do crvene ili ljubičaste (s ili bez precipitacijskih krugova). Odabrati ploče koje sadrže manje od 150

karakterističnih kolonija, prebrojati te kolonije, a zatim nasumice odaberati pet takvih kolonija za subkultivaciju za biokemijske potvrđne testove.

Određene *Enterobacteriaceae* mogu izazvati dekolorizaciju njihovih kolonija i podloge. Stoga, kada nisu prisutne karakteristične kolonije, izaberite pet bjelkastih kolonija za potvrdu. Razmažite na pločice hranjivog agara svaku od kolonija odabranih za potvrđivanje. Inkubirajte ploče na 37 °C, 24h ±2 h. Odaberite jednu dobro izoliranu koloniju sa svake inkubirane pločice za biokemijske potvrđne testove.

Biokemijski potvrđni testovi za *Enterobacteriaceae*

Reakcija oksidaze: Pomoću eze ili staklenim štapićem uzeti dio svake dobro izolirane kolonije i razmazati na filter papir navlažen reagensom oksidaze ili na komercijalno dostupni disk. Smatrajte da je test negativan ako boja filter papira ne potamni u roku od 10 sekundi. Pridržavajte se uputa proizvođača za gotove diskove (Slika 3).



Slika 3. Oxidase test (Foto: Laco, 2015)
Fig. 3. The test of oxidase (Photo: Laco, 2015)

Test fermentacije: Ubodite pomoću eze, iste odabrane kolonije koje su dale negativan test oksidaze u epruvete s glukoznim agarom. Inkubirati ove epruvete na 37 °C, 24 h ±2 h. Ako se žuta boja razvija kroz sadržaj epruvete,

smatrajte reakciju pozitivnom (Slika 4). Kolonije koje su oksidaza negativne i glukoza pozitivne potvrđene su kao *Enterobacteriaceae*. Rezultati se izražavaju kao broj kolonija (CFU) u volumenu uzorka hrane.



Slika 4. Test fermentacije (Foto: Laco, 2015)
Fig. 4. The test of fermentation (Photo: Laco, 2015)

Nakon mikrobiološke analize u konzerviranoj sardini došli smo do bitnih rezultata. Radila se izolacija i identifikacija na slijedeće bakterijske vrste: aerobne mezofilne bakterije, *Listeria* spp. i *Clostridium* spp. Od 33 uzorka konzerviranih sardina nakon određene inkubacije izolirali smo aerobne mezofilne bakterije i nakon određenih razrjeđenja kod određenih sardina njihov broj je bio veći od MDK.

Aerobne mezofilne izolirane su na ukupno 27 uzoraka konzerviranih sardine i njihov broj bio je veći od MDK (<1cfu/g), a 6 uzoraka je imao manji broj od MDK. U slučaju da nema kolonija za izbrojati umjesto nula pišemo <10 cfu/g. Najveći broj je 519 CFU/g a najmanji <10 cfu/g. Nakon inkubacije *Listeria* spp. i *Clostridium* spp. nisu izolirane u 33 uzorka konzerviranih sardina.

Listeria spp. nije dozvoljena u 25 g ispitivanog uzorka, dok *Clostridium* spp. iznosi <1cfu/g za sve 33 konzerve sardine.

Mikrobiološkom analizom osam svježih sardina u periodu od svibnja do srpnja 2015. iz ribarnica na području sljedećih općina grada Sarajeva: Centar, Novi Grad, Stari Grad i Novo Sarajevo, izvršila se izolacija i identifikacija sljedećih bakterija: *Salmonella* spp., *Enterobacteriaceae* i *Clostridium*

spp. Iz osam uzoraka svježe sardine *Salmonella* spp. nije izolirana u 25 g svježe sardine.

Enterobacteriaceae su izolirane iz svih osam uzoraka svježe sardine, ali njihov broj cfu/g nije prelazio MDK koji iznosi 10^3 cfu/g. Najveći broj kolonija izbrojan na VRBG selektivnom hranjivom agaru iznosio je 206 cfu/g, a najmanji 1 cfu/g. *Clostridium* spp. nisu izolirane ni u jednom uzorku (n=8) svježih sardine (Tablica 2).

Tablica 2. Ukupan broj bakterija u svježoj sardini

Table 2. Total number of bacteria in fresh sardine

| UKUPAN BROJ BAKTERIJA U SVJEŽOJ SARDINI | | | |
|---|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Broj uzorka | <i>Salmonella</i> spp. | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Clostridium</i> spp. |
| Centar I | Nisu izolovane | 4 | Nisu izolirane |
| Novi Grad | Nisu izolirane | 1 | Nisu izolirane |
| Stari Grad I | Nisu izolirane | 3 | Nisu izolirane |
| Stari Grad II | Nisu izolirane | 1 | Nisu izolirane |
| Centar II | Nisu izolirane | 206 | Nisu izolirane |
| Novo Sarajevo I | Nisu izolirane | 58 | Nisu izolirane |
| Novo Sarajevo II | Nisu izolirane | 6 | Nisu izolirane |
| Ilidža | Nisu izolirane | 74 | Nisu izolirane |
| MDK | n.n. u 25 g | 10^3cfu/g | 10^3cfu/g |

Rasprava

Najčešće bakterije koje se prenose sardinom su: *Clostridium botulinum* (neurotoksin-botulin; *Vibrio cholerae* (kolera), *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes* (kanalizacijski mulj), *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, *Shigella* spp. (fekalno), *Salmonella* spp. (onečišćena voda). Efikasna sanitacija započinje sa smanjenjem kontaminacije u sirovinama, vodi, zraku i zalihama. Ako su tvornica i oprema u njoj dizajnirani u skladu s higijenskim standardima čišćenje je lakše, a kontaminacija je smanjena. Rad utrošen na čišćenje se može smanjiti upotrebom mobilnih ili centraliziranih sistema za čišćenje koji koriste visoki tlak ili paru, a u velikim tvornicama mogu biti korišteni CIP sistemi. Efikasnost sanitarnog programa se može procijeniti preko uspostavljanja standarda koji služe kao smjernice, vizualne inspekcije i laboratorijskih testova (Adak i sur., 2002; Burger i sur., 2005).

Na Odjelu za mikrobiološku analizu hrane, vode i predmeta opće upotrebe 33 uzorka konzervi sardine su se držale na inkubaciji u termostatu devet dana na 37 °C. Nakon inkubacije zasijali su se uzorci konzervi sardine na određene selektivne hranjive podloge izvršila se izolacije i identifikacija za slijedeće bakterijske vrste: aerobne mezofilne bakterija, *Listeria* spp. i *Clostridium* spp., propisane u skladu s odredbama Pravilnika o mikrobiološkim kriterijima za hranu životinjskog porijekla ("Službene

novine FBiH", br. 80/12) (11). *Listeria* spp. i *Clostridium* spp. nisu izolirane ni u jednom uzorku konzervirane sardine. Npr. spore bakterija *C. botulinum* su široko rasprostranjene u prirodi. Spore su prisutne kako u digestivnom traktu sisavaca i ptica tako i unutrašnjim organima riba.

Uzorak se smatra zdravstveno ispravnim (konzervirana sardina), ako je MDK <1cfu/g za *Clostridium* spp. i u 25 g n.n. *Listeria* spp. Aerobne mezofilne bakterije <1cfu/g, a aerobne mezofilne bakterije izolirane su u svih 27 uzoraka i njihov MDK bio je >1cfu/g. Najveći broj izoliranih kolonija aerobnih mezofilnih bakterija iznosio je 519 CFU/g. MDK za aerobne mezofilne bakterije je <1cfu/g. Možemo reći da je 27 uzoraka zdravstveno neispravno. Aerobne mezofilne bakterije se najčešće izoliraju iz konzerviranih sardina zbog kontaminacija u toku samog transporta i ljudski faktor je neizostavan u toku samog pakiranja.

Potrebe za konzervama od riba, gledano u dužem vremenskom periodu, nastaju u slučaju rata, elementarnih nepogoda, kao i pri utjecaju tržišta. Tada se, među ostalim namirnicama, skladište i relativno velike količine trajnih konzervi. U svim tim slučajevima ekonomski razlozi diktiraju da se rok skladištenja konzervi što više produži. Tome se suprotstavljaju faktori biotske i abiotske prirode koji dovode do gubitka kvaliteta, biološke i hranjive vrijednosti i kvara, uzrokujući skraćivanje roka skladištenja konzervi (Burger i sur., 2005; Cho i sur., 2005; Govedarica i sur., 1995).

Prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu životinjskog porijekla ("Službene novine FBiH", br. 80/12) (Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu životinjskog porijekla ("Službene novine FBiH", br. 80/12). za svježu srdelu izvršila se izolacija i identifikacija za sljedeće vrste: *Salmonella* spp., *Enterobacteriaceae* i *Clostridium* spp. Operativna procedura opisuje aktivnosti i odgovornosti tokom provođenja ispitnog postupka i izrade izvještaja o detekciji tj. prisustvu *Salmonella* spp, kultivacijom na mikrobiološkim podlogama u Odjelu za mikrobiologiju namirnica, voda i predmeta opće upotrebe SZE ZZJZFBiH. Uz kompletnu primarnu i sekundarnu obradu za *Salmonella* spp. i *Enterobacteriaceae* prema „ISO 6579:2005“ dokazali smo da broj CFU/g je $<10^3$ cfu/g. Najveći broj kolonija na VRBG selektivnoj hranjivoj podlozi za *Enterobacteriaceae* je 206 cfu/g. *Salmonella* spp. i *Clostridium* spp. nisu izolirane. Pravilnik nalaže da MDK u 25 g n.n. za *Salmonella* spp., i *Clostridium* spp., MDK <1 cfu/g.

U Maroku na Veterinarskom univerzitetu 2007. godine izvršila se detekcija na *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp. i *Clostridium* spp. za svježe sardine. Rezultati su bili sljedeći: izolirane su *Enterobacteriaceae* na VRBG selektivnoj hranjivoj podlozi i to u broju $2,8 \times 10^3$ cfu/g, $3,9 \times 10^3$ cfu/g. *Salmonella* spp. i *Clostridium* spp. nisu bile detektirane.

Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu životinjskog porijekla ("Službene novine FBiH", br. 80/12), kojim se služe u BiH isti je u Hrvatskoj, Srbiji i Crnoj Gori gdje su kriteriji i granične vrijednosti za sve namirnice sukladne. U laboratorijima služimo se danim Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu koji je opće prihvaćen i u praksi.

Na osnovu mikrobioloških analiza svježa sardina je zdravstveno ispravna dok konzervirana nije za 27 uzoraka i izolirane su aerobne mezofilne bakterije i nakon ponavljanja uzorkovanja čiji je MDK >1 cfu/g.

U cilju smanjenja kontaminacije trebalo bi razmotriti sljedeća pitanja: Trebalo bi osigurati odgovarajući skladišni prostor za sirovine i drugi materijal. S neodgavarajućim skladišnim prostorom može se javiti kontaminacija od strane materijala za pakovanje. Dovoljno prostora je također potrebno i za temeljan pregled sirovina zbog toga što strana tijela mogu pratiti taj materijal. Odvojeni materijal koji je kontaminiran bi trebalo da bude spašen i očišćen kako bi se spriječilo širenje prijenosnika kontaminacije. Može se pojaviti i gnjilež na sirovinama kada se one nalaze u istom skladišnom prostoru sa sredstvima za čišćenje i održavanje. Trebalo bi odabrati poseban skladišni prostor za finalne proizvode. Nedostatak prostora može nametnuti i potrebu da se u tu svrhu koriste i proizvodni pogoni.

Zaključci

U našim istraživanjima analizirane su konzervirane i svježe sardine *Sardina pilchardus* Walbaum, 1792. na području Kantona Sarajevo. Ukupno je bilo 33 konzerve sardina i 8 uzoraka svježih srdela.

Zdravstvena ispravnost sastojala se iz mikrobiološke analize iz danih uzoraka konzerviranih i svježih sardina.

Dokazivanje zdravstvene ispravnosti konzervirane i svježe sardine odradila se u Zavodu za javno zdravstvo Federacije Bosne i Hercegovine u Sarajevu.

Izvršili smo izolaciju i identifikaciju mikroorganizama u konzerviranoj i svježoj sardini *Sardina pilchardus* Walbaum, 1792.

U 19 konzerviranih sardina izolirale su se aerobne mezofilne bakterije čiji je broj kolonija (cfu/g) bio veći od MDK. *Listeria* spp. i *Clostridium* spp. nisu bile izolirane.

Nakon mikrobiološke analize svježih sardina za sljedeće bakterije: *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp. i *Clostridium* spp., nismo izolirali dane bakterijske vrste u svježoj sardini na hranjivim selektivnim podlogama.

Literatura

- Adak et al. (2002): Trends in indigenous foodborne disease and deaths. *England and Wales Gut* 51, 832-841.
- Arsenijević, N. et al. (1999): Opšta mikrobiologija, Udžbenik za studente medicine, Savremena Administracija, Beograd.
- Bem, Z., Adamič, J. (1991): Mikrobiologija mesa i proizvoda od mesa. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
- Burger, J., Stern, A. H., Gochfeld, M. (2005): Mercury in commercial fish. Optimizing individual choices to reduce risk. *Environ. Health Perspect.* 113, 266-271.
- Cho, M. H., Bae, E. K., Ha, S. D., Park, Y. S., Mok, C. K., Hong, K. P., Kim, S. P., Park, J. Y. (2005): Evaluation of dry rehydratable film method for enumeration of microorganisms in meat, dairy and fishery products. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37, 294-300.
- Duraković, S. (1996): Primijenjena mikrobiologija. Prehrambeno-tehnološki inženjering. Zagreb.
- Govedarica, M., Jarak, M. (1995): Opšta mikrobiologija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Institut za ratarstvo i povrtarstvo.
- Ha, S. D. (1996): Evaluation of dryfilm method for isolation of microorganisms from foods. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 178-184.
- Karakašević, B. (1987): Mikrobiologija i parazitologija. Medicinska knjiga. Beograd.
- Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu životinjskog porijekla ("Službene novine FBiH", br. 80/12).

HEALTH SAFETY OF FRESH AND PRESERVED SARDINES *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792)

Maja Laco¹, Asmir Aldžić², Huska Jukić^{2*}, Suad Habeš³

¹Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Sarajevo, Zmaja od Bosne 33-35, 71 000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

²High Medical School, University of Bihac, Nositelja hrvatskog trolista 4, 77 000 Bihac, Bosnia and Herzegovina

³Faculty of Health Studies, University of Sarajevo, Bolnicka 25, 71 000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Professional paper

Summary

Sardine *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792), considered as the queen of fish, belongs to oily fish. Products obtained by processing of certain fish species by appropriate technological process which includes heat treatment (sterilization) of canned fish packed in hermetically sealed cans at a temperature of at least 100 °C. Only fish that meets the requirements of quality and hygienic safety can be used for the production of canned fish. We can't use the head, eyes, gills, fins and viscera of fish. Several groups, such as canned fish in brine, canned fish in oil, canned smoked fish oil, blanched canned fish in oil, canned fish in tomato sauce, canned fish with vegetables, canned fish with vegetables in tomato sauce, canned fish with vegetables in different sauces and fish pate, are known in the manufacture of canned fish meat.

We determined the presence of certain types of bacteria in canned sardines by microbiological analysis. The total number of canned sardines' samples was 33, purchased in Sarajevo in many different municipalities of the Sarajevo Canton (Old City, Center, New Sarajevo, Novi Grad, and Ilidza).

A total of 8 fresh sardines (n=8) was sampled in order to analyze the presence of microorganisms. Sardines (*Sardina pilchardus* Walbaum, 1792), after the catch, were transported to the Institute of Public Health, where analysis was performed.

On the basis of microbiological analysis of fresh sardines we performed isolation and identification of the following species: *Clostridium* spp., *Enterobacteriaceae* and *Salmonella* spp.

Keywords: isolation, identification of microorganisms, canned sardines, fresh sardines