

Mikrobiologie potravin – praktická cvičení II.

Metody stanovení mikroorganismů v potravinách

Cupáková Šárka, Karpíšková Renáta, Necidová Lenka

Předmluva

Mikrobiologie potravin je na Fakultě veterinární hygieny a ekologie VFU Brno vyučována v rámci bakalářského i magisterského studijního programu. Je samozřejmé, že v obou případech jsou na studenty kladeny rozdílné nároky vyplývající z různého zaměření uvedených studijních oborů. Na druhou stranu odlišnost praktické výuky mikrobiologie potravin není natolik významná, aby vyžadovala samostatné studijní materiály, zvláště pro bakalářský a zvláště pro magisterský studijní program. Z tohoto důvodu jsme považovaly za účelnější vytvořit jednotný studijní materiál rozdělený do dvou dílů.

Druhý díl – ***Metody stanovení mikroorganismů v potravinách*** je určen pro oba studijní programy a uceleně shrnuje problematiku mikrobiologie potravin, tj. odběr a zpracování vzorků, metody používané při kvantifikaci mikroorganismů a standardní kultivační techniky stanovení indikátorových, technologicky významných a patogenních mikroorganismů v potravinách. Celá problematika je doplněna o stanovení reziduí inhibičních látek v surovinách a potravinách živočišného původu, mikrobiologické vyšetření pitné vody, mikrobiologické hodnocení obalů a obalových materiálů a další doplňkové metody. Uváděné metodiky jsou v souladu s mezinárodně platnými vyšetřovacími postupy (ČSN ISO, resp. ČSN EN ISO). V případě, že dané stanovení není standardizováno příslušnou normou či jiným předpisem, je uveden postup obvykle používaný v rámci České republiky. Samostatná kapitola je věnována stručnému výkladu nařízení komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny ve znění nařízení komise (ES) č. 1441/2007.

Vhodným studijním doplňkem k tištěným skriptům jsou multimediální učební texty ***Atlas mikrobiologie potravin*** a ***Laboratorní metody v mikrobiologii potravin***, které jsou volně přístupné na internetové adrese: http://fvhe.vfu.cz/sekce_ustavy/uhtml/index.html.

Závěrem bychom rády poděkovaly recenzentkám Prof. Ing. Kateřině Demnerové, CSc. a RNDr. Danuši Lefnerové, Ph.D. za kritické a konstruktivní připomínky, dále doc. MVDr. Bohumíře Janštové, Ph.D., která se podílela na tvorbě obrazové dokumentace a MVDr. Janě Vyhnálkové za cenné rady a komentáře.

Autorky

Obsah

1. ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKŮ K MIKROBIOLOGICKÉMU VYŠETŘENÍ

| | |
|--|-----------|
| 1.1. Odběr vzorků | 11 |
| 1.1.1. Obecné zásady | 11 |
| 1.1.2. Množství odebraného vzorku | 12 |
| 1.1.3. Způsoby odběru vzorků | 12 |
| 1.1.3.1. Kusové materiály | 13 |
| 1.1.3.2. Tekuté a kašovitě materiály | 13 |
| 1.1.3.3. Sypké materiály | 13 |
| 1.1.3.4. Materiály smíšené konzistence | 13 |
| 1.2. Přeprava, příjem a uchovávání vzorků | 15 |
| 1.2.1. Přeprava vzorků | 15 |
| 1.2.2. Příjem a uchovávání vzorků v laboratoři | 15 |
| 1.3. Zpracování vzorků v laboratoři | 16 |
| 1.3.1. Otevírání obalů vzorků | 16 |
| 1.3.2. Navážka vzorku | 17 |
| 1.3.3. Homogenizace vzorku | 18 |
| 1.3.4. Ředění vzorku | 18 |
| 1.3.4.1. Příprava výchozí suspenze | 18 |
| 1.3.4.2. Příprava desetinásobných ředění vzorku | 20 |

2. METODY STANOVENÍ POČTU MIKROORGANISMŮ

| | |
|--|-----------|
| 2.1. Kultivační metody stanovení počtu mikroorganismů | 21 |
| 2.1.1. Stanovení počtu mikroorganismů při použití tekutých půd | 21 |
| 2.1.1.1. Hodnocení a interpretace výsledků | 22 |
| 2.1.2. Stanovení počtu mikroorganismů při použití pevných půd | 24 |
| 2.1.2.1. Vyjádření výsledku – metoda výpočtu | 24 |
| 2.1.2.2. Odhad počtu N_E – méně než 10 kolonií | 26 |
| 2.1.2.3. Odhad počtu N_E – kolonie nepřítomny | 27 |
| 2.1.2.4. Odhad počtu N_E – více než 300 (150) kolonií | 27 |
| 2.1.3. Stanovení počtu mikroorganismů membránovou filtrací | 28 |
| 2.1.3.1. Vyjádření výsledku – vyšetření pitné vody | 28 |
| 2.1.3.2. Vyjádření výsledku – vyšetření ostatních filtrovatelných vzorků | 28 |
| 2.1.4. Sčítací metoda | 29 |
| 2.1.4.1. Kvantitativní sčítání | 29 |
| 2.1.4.2. Kvalitativní sčítání | 29 |
| 2.1.5. Metoda seškrabu | 30 |
| 2.1.6. Otisková metoda | 30 |
| 2.1.6.1. Sklopný otiskový nosič - Hygicult® | 30 |
| 2.1.7. Metoda oplachu | 31 |
| 2.1.8. Metoda výplachu | 31 |
| 2.1.9. Metoda spadu | 32 |
| 2.1.10. Kultivační destičky Petrifilm™ | 32 |
| 2.2. Mikroskopické metody stanovení počtu mikroorganismů | 33 |
| 2.2.1. Vitální barvení kvasinek | 33 |
| 2.2.2. Přímá epifluorescenční filtrační metoda | 34 |
| 2.2.3. Automatická metoda přímého počítání bakterií – BactoScan | 34 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.3. | Nepřímé metody stanovení počtu mikroorganismů | 35 |
| 2.3.1. | Metody založené na redukci barviv | 35 |
| 2.3.2. | Elektrické metody (impedanční měření) | 35 |
| 2.3.3. | Metody založené na průkazu metabolitů | 35 |
| 2.3.3.1. | Limulus test | 36 |
| 2.3.3.2. | Radiometrie – stanovení $^{14}\text{CO}_2$ | 36 |
| 2.3.3.3. | ATP bioluminiscenční metoda | 36 |
| 2.4. | Praktické rady pro provedení kvantitativního vyšetření | 37 |
| 2.4.1. | Volba ředění – porovnání s limitní hodnotou | 37 |
| 2.4.2. | Volba ředění – hodnocení mikrobiální kontaminace | 38 |
| 2.4.3. | Hodnocení a interpretace nestandardních výsledků | 38 |
| 3. | STANOVENÍ INDIKÁTOROVÝCH MIKROORGANISMŮ | 41 |
| 3.1. | Stanovení celkového počtu mikroorganismů | 41 |
| 3.1.1. | Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C – plotnová metoda | 42 |
| 3.1.1.1. | Princip metody | 42 |
| 3.1.1.2. | Postup metody | 42 |
| 3.1.1.3. | Hodnocení výsledků | 42 |
| 3.1.2. | Technika nejvýše pravděpodobného počtu – metoda MPN | 43 |
| 3.1.2.1. | Princip metody | 43 |
| 3.1.2.2. | Postup metody | 43 |
| 3.1.2.3. | Hodnocení výsledků | 43 |
| 3.2. | Stanovení bakterií čeledi <i>Enterobacteriaceae</i> | 44 |
| 3.2.1. | Technika počítání kolonií – plotnová metoda | 44 |
| 3.2.1.1. | Princip metody | 44 |
| 3.2.1.2. | Postup metody | 44 |
| 3.2.1.3. | Konfirmace a hodnocení výsledků | 45 |
| 3.2.2. | Metoda průkazu bakterií čeledi <i>Enterobacteriaceae</i> | 46 |
| 3.2.2.1. | Princip metody | 46 |
| 3.2.2.2. | Postup metody | 47 |
| 3.2.2.3. | Konfirmace a hodnocení výsledků | 47 |
| 3.2.3. | Stanovení počtu technikou nejvýše pravděpodobného počtu s předpomnožením – metoda MPN | 48 |
| 3.2.3.1. | Princip metody | 48 |
| 3.2.3.2. | Postup metody | 48 |
| 3.2.3.3. | Konfirmace a hodnocení výsledků | 49 |
| 3.3. | Stanovení koliformních bakterií | 50 |
| 3.3.1. | Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C | 50 |
| 3.3.1.1. | Princip metody | 50 |
| 3.3.1.2. | Postup metody | 50 |
| 3.3.1.3. | Hodnocení výsledků | 51 |
| 3.4. | Stanovení <i>Escherichia coli</i> | 51 |
| 3.4.1. | Stanovení počtu β -D-glukuronidázopozitivních <i>E. coli</i> | 52 |
| 3.4.1.1. | Princip metody | 52 |
| 3.4.1.2. | Postup metody | 52 |
| 3.4.1.3. | Hodnocení výsledků | 53 |
| 3.5. | Stanovení bakterií <i>Enterococcus</i> spp. | 53 |
| 3.5.1. | Technika počítání kolonií vykultivovaných při 37 °C | 54 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5.1.1. Princip metody | 54 |
| 3.5.1.2. Postup metody | 54 |
| 3.5.1.3. Hodnocení výsledků | 54 |
| 3.6. Stanovení kvasinek a plísní | 55 |
| 3.6.1. Technika počítání kolonií u výrobků s a_w vyšší než 0,95 | 56 |
| 3.6.1.1. Princip metody | 56 |
| 3.6.1.2. Postup metody | 56 |
| 3.6.1.3. Hodnocení výsledků | 56 |
| 3.6.2. Technika počítání kolonií u výrobků s a_w nižší nebo rovnou 0,95..... | 57 |
| 3.6.2.1. Princip metody | 57 |
| 3.6.2.2. Postup metody | 57 |
| 3.6.2.3. Hodnocení výsledků | 58 |
| 3.7. Stanovení mezofilních bakterií mléčného kvašení | 59 |
| 3.7.1. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C | 59 |
| 3.7.1.1. Princip metody | 59 |
| 3.7.1.2. Postup metody | 59 |
| 3.7.1.3. Hodnocení výsledků | 60 |
| 3.8. Stanovení proteolytických a lipolytických mikroorganismů | 61 |
| 3.8.1. Stanovení počtu proteolytických mikroorganismů..... | 61 |
| 3.8.1.1. Princip metody | 61 |
| 3.8.1.2. Postup metody | 61 |
| 3.8.1.3. Hodnocení výsledků | 61 |
| 3.8.2. Stanovení počtu lipolytických a proteolytických mikroorganismů..... | 62 |
| 3.8.2.1. Princip metody | 62 |
| 3.8.2.2. Postup metody | 62 |
| 3.8.2.3. Hodnocení výsledků | 62 |
| 3.9. Stanovení ostatních indikátorových mikroorganismů | 63 |
| 3.9.1. Stanovení psychrotrofních mikroorganismů | 63 |
| 3.9.1.1. Princip metody | 63 |
| 3.9.1.2. Postup metody | 63 |
| 3.9.1.3. Hodnocení výsledků | 64 |
| 3.9.2. Stanovení aerobních a anaerobních sporotvorných bakterií..... | 64 |
| 3.9.2.1. Princip metody | 64 |
| 3.9.2.2. Postup metody | 64 |
| 3.9.2.3. Hodnocení výsledků | 65 |
| 4. STANOVENÍ PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ | 66 |
| A. VÝZNAMNÍ PŮVODCI ALIMENTÁRNÍCH INFEKČÍ A TOXOINFEKČÍ | |
| 4.1. Stanovení bakterií <i>Salmonella</i> spp. | 66 |
| 4.1.1. Metoda průkazu bakterií rodu <i>Salmonella</i> | 67 |
| 4.1.1.1. Princip metody | 67 |
| 4.1.1.2. Postup metody | 67 |
| 4.1.1.3. Konfirmace a hodnocení výsledků | 67 |
| 4.2. Stanovení <i>Campylobacter</i> spp. | 69 |
| 4.2.1. Metoda průkazu termotolerantních druhů rodu <i>Campylobacter</i> | 69 |
| 4.2.1.1. Princip metody | 70 |
| 4.2.1.2. Postup metody | 70 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.1.3. Konfirmace a hodnocení výsledků | 70 |
| 4.3. Stanovení <i>Listeria monocytogenes</i> | 71 |
| 4.3.1. Metoda průkazu <i>Listeria monocytogenes</i> | 72 |
| 4.3.1.1. Princip metody | 72 |
| 4.3.1.2. Postup metody | 72 |
| 4.3.1.3. Konfirmace a hodnocení výsledků | 73 |
| 4.3.2. Metoda stanovení počtu <i>Listeria monocytogenes</i> | 74 |
| 4.3.2.1. Princip metody | 74 |
| 4.3.2.2. Postup metody | 74 |
| 4.3.2.3. Konfirmace a hodnocení výsledků | 75 |
| 4.4. Stanovení <i>Escherichia coli</i> O157 | 76 |
| 4.4.1. Metoda průkazu <i>Escherichia coli</i> O157 | 76 |
| 4.5. Stanovení <i>Cronobacter sakazakii</i> | 77 |
| 4.5.1. Metoda průkazu <i>Cronobacter sakazakii</i> | 77 |
| 4.5.1.1. Princip metody | 77 |
| 4.5.1.2. Postup metody | 78 |
| 4.5.1.3. Konfirmace a hodnocení výsledků | 78 |
| 4.6. Stanovení <i>Clostridium perfringens</i> | 79 |
| 4.6.1. Technika počítání kolonií – plotnová metoda | 80 |
| 4.6.1.1. Princip metody | 80 |
| 4.6.1.2. Postup metody | 80 |
| 4.6.1.3. Konfirmace a hodnocení výsledků | 80 |
| B. VÝZNAMNÍ PŮVODCI ALIMENTÁRNÍCH INTOXIKACÍ | |
| 4.7. Stanovení <i>Staphylococcus aureus</i> | 81 |
| 4.7.1. Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera | 82 |
| 4.7.1.1. Princip metody | 82 |
| 4.7.1.2. Postup metody | 82 |
| 4.7.1.3. Konfirmace a hodnocení výsledků | 82 |
| 4.7.2. Technika s použitím agarové půdy s králičí plazmou a fibrinogenem | 83 |
| 4.8. Stanovení <i>Bacillus cereus</i> | 84 |
| 4.8.1. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C | 84 |
| 4.8.1.1. Princip metody | 84 |
| 4.8.1.2. Postup metody | 84 |
| 4.8.1.3. Konfirmace a hodnocení výsledků | 85 |
| 5. DOPLŇKOVÉ MIKROBIOLOGICKÉ VYŠETŘOVACÍ METODY | 87 |
| 5.1. Stanovení účinku pasterace | 87 |
| 5.1.1. Stanovení vlivu pasterace na mikrobiální obraz mléka | 87 |
| 5.1.1.1. Princip metody | 87 |
| 5.1.1.2. Postup metody | 88 |
| 5.1.1.3. Hodnocení výsledků | 88 |
| 5.2. Mikrobiologické vyšetření čistých mlékařských kultur | 89 |
| 5.2.1. Kvantitativní mikroskopické vyšetření čistých mlékařských kultur | 89 |
| 5.2.1.1. Princip metody | 89 |
| 5.2.1.2. Postup metody | 89 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 5.3. | Mikrobiologické vyšetření pitné vody | 91 |
| 5.3.1. | Odběr vzorků | 91 |
| 5.3.2. | Vlastní rozbor | 91 |
| 5.3.3. | Metody rozboru | 92 |
| 5.4. | Stanovení mikrobiální kontaminace prostředí potravinářských provozů | 94 |
| 5.4.1. | Používané metody | 94 |
| 5.4.2. | Hodnocení výsledků | 95 |
| 5.5. | Mikrobiologické vyšetření obalů a obalových materiálů | 95 |
| 5.5.1. | Odběr vzorků | 96 |
| 5.5.2. | Používané metody | 96 |
| 5.6. | Stanovení reziduí inhibičních látek | 97 |
| 5.6.1. | Plotnové metody | 97 |
| 5.6.1.1. | Příprava testovacích ploten | 97 |
| 5.6.1.2. | Kontrola citlivosti testovacích ploten | 98 |
| 5.6.1.3. | Obecné zásady provedení plotnových metod | 98 |
| 5.6.1.4. | Pracovní postup pro zpracování vzorků | 99 |
| 5.6.1.5. | Hodnocení výsledků | 100 |
| 5.6.2. | Širokospektrální testy | 100 |
| 5.6.2.1. | Test Eclipse 50 | 101 |
| 5.6.2.2. | BR-Test® AS Brilliant | 101 |
| 6. | LEGISLATIVNÍ PŘEDPISY V OBLASTI MIKROBIOLOGIE POTRAVIN | 102 |
| 6.1. | Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 | 102 |
| 6.1.1. | Příloha I | 102 |
| 6.1.2. | Stanovení <i>Listeria monocytogenes</i> | 103 |
| 6.1.3. | Mikrobiologické vyšetření jatečně upravených těl | 104 |
| 6.2. | ČSN 56 9609 – Pravidla správné hygienické a výrobní praxe | 106 |
| 6.3. | Přehled vybraných norem pro mikrobiologické zkoušení potravin | 106 |
| 6.3.1. | Kapitola 1 a 2 | 106 |
| 6.3.2. | Kapitola 3 | 106 |
| 6.3.3. | Kapitola 4 | 107 |
| 6.3.4. | Kapitola 5 | 107 |

1. Odběr a příprava vzorků k mikrobiologickému vyšetření

Každé vyšetření, fyzikální, chemické či mikrobiologické, začíná odběrem vzorků. Na odběr vzorků bezprostředně navazuje jeho přeprava, uchovávání a zpracování v laboratoři. Vždy je třeba mít na paměti, že způsob odběru a přípravy vzorků může významně ovlivnit výsledky provedeného vyšetření.

1.1. Odběr vzorků

Vzorek představuje jednotku výrobku, suroviny nebo jiného zkoušeného materiálu. Může jím být originální spotřebitelské balení, určitý počet kusů u kusových výrobků nebo určitá hmotnost (objem) u nekusových výrobků a surovin. Pro mikrobiologické vyšetření se nejčastěji odebírají vzorky výchozích surovin, pomocných látek, fázové vzorky v průběhu výroby, dále stěry z provozní zařízení, hotové výrobky či skladované potraviny.

Za **vzorkovanou jednotku** se považuje:

- 1 velkoobchodní originální balení (karton, bedna, balík, pytel, paleta atd.),
- 1 upravený celek, jde-li o kusové produkty,
- celá zásilka, jde-li o sypané či jiné volně ložené produkty (odebírání se 5 vzorků z různých částí zásilky),
- 1 nádrž, tank, konev či jiná nádoba, jde-li o produkty tekuté.

1.1.1. Obecné zásady

Odběr vzorků provádí tzv. oprávněná osoba, která je seznámena se zásadami správného vzorkování a nese zodpovědnost za správnost provedení odběru.

Před vlastním odběrem se zkoušené výrobky rozdělí podle senzorických vlastností (vzhledu a vůně) do následujících skupin:

- **1. skupina** – výrobky, u kterých nejsou navenek patrné změny způsobené mikroorganismy,
- **2. skupina** – výrobky, které jsou podle vzhledu podezřelé, že v nich nastaly změny v důsledku nežádoucí mikrobiální činnosti, příp. chemickými či biochemickými pochody,
- **3. skupina** – výrobky, které jsou zjevně zkažené v důsledku činnosti mikroorganismů (např. osliznutí, hnití, plesnivění, kysání). Tato skupina vzorků se běžně pro kontrolní účely mikrobiologicky nevyšetřuje.

U každé skupiny vzorků se provede odběr vzorků odděleně, a to takovým způsobem, aby nemohlo dojít ke kontaminaci a nežádoucím změnám v mikrobiálním složení.

Pokud se současně odebírají vzorky k mikrobiologickému i chemickému vyšetření, odebírají se zásadně nejprve vzorky k vyšetření mikrobiologickému. Jestliže se odebírá pouze jeden vzorek pro mikrobiologické i chemické vyšetření, přepravuje se do laboratoře za podmínek stanovených pro mikrobiologické vyšetření. V laboratoři se v tomto případě provádí nejdříve mikrobiologické vyšetření, pak smyslové a nakonec chemické.

Pokud není odebíráno celé spotřebitelské balení, musí být ke vzorkování použito výhradně sterilní náčiní z koroziivzdorné oceli (sondy, nebozezy, naběračky, lžice, nože, pinzety, atd.) či skla (pipety), které se předem balí do hliníkové fólie a sterilizují v horkovzdušném

sterilizátoru či autoklávu. Kovové nástroje lze při odběru průběžně sterilizovat 70% etanolem a opálením v plameni. Vzorky se odebírají do sterilních, dostatečně velkých vzorkovnic se zabroušenou zátkou, sterilních fólií, polyetylenových sáčků nebo sterilního nepropustného papíru.

Odebrané vzorky musí být řádně označeny pořadovým číslem, kódem kontrolované dodávky či číslem odběrového protokolu tak, aby nemohlo dojít k jejich záměně. V některých případech se vzorek opatří pečeti nebo plombou a označí razítkem organizace, která za výrobky odpovídá. Majitel zboží smí žádat o odběr souběžného vzorku, a to ve stejném počtu a složení jako vzorky odebírané kontrolním orgánem. O odběru musí být vyhotoven protokol o odběru vzorků, v němž jsou uvedeny údaje o době a místu odběru vzorků, jejich druhu a množství, způsobu vzorkování, smyslovém posouzení, konzervaci, atd. Protokol musí být opatřen podpisem osoby provádějící odběr i zástupcem majitele vzorků. Současně se vyplní žádanka o laboratorní vyšetření, ve které je nutno specifikovat, jaká konkrétní vyšetření mají být u vzorku provedena (viz. obr. 2).

1.1.2. Množství odebraného vzorku

Odebraný počet vzorků musí vystihovat celou vyšetřovanou partii tak, aby bylo možno posoudit povahu, stupeň a rozsah mikrobiálního znečištění. Při odběru vzorků pro mikrobiologické vyšetření se neodebírají vzorky průměrné (tj. směsné).

Při úřední kontrole – tj. hodnocení, zda daná šarže (dávka) odpovídá stanoveným mikrobiologickým požadavkům, se odebírá zpravidla 5 vzorků. U vybraných skupin výrobků může být tento počet ještě vyšší (upravuje platná evropská legislativa týkající se mikrobiologických kritérií pro potraviny).

Hmotnost odebraného vzorku musí být dostatečná pro provedení všech předepsaných vyšetření (viz. tab. 1). Odebíráme-li vzorek výrobku ve spotřebitelském balení, potom:

- odebereme 1 spotřebitelské balení, pokud jeho hmotnost (objem) dosahuje požadované hmotnosti;
- pokud hmotnost (objem) spotřebitelského balení výrazně převyšuje potřebné množství, stačí odebrat jako vzorek poměrnou část spotřebitelského balení, nesmí tím však být ohroženo dosažení účelu vyšetření;
- pokud hmotnost (objem) spotřebitelského balení je nižší než požadované množství, odebereme potřebný počet spotřebitelských balení.

Tabulka 1: *Potřebná množství vzorků pro mikrobiologické vyšetření.*

| Druh vzorku | Množství | Druh vzorku | Množství |
|-------------|----------|-------------|----------|
| tekuté | 300 ml | koncentráty | 150 g |
| kašovitě | 250 g | vejce | 3 ks |
| pevné | 300 g | drůbež | 1 ks |
| sušené | 150 g | pitná voda | 500 ml |

1.1.3. Způsoby odběru vzorků

Vzorky v originálním spotřebitelském balení se u všech druhů vzorků odebírají vcelku. V ostatních případech se způsob vzorkování liší podle povahy odebíraného materiálu, počtu odebíraných vzorků a charakteru zařízení, ze kterého se odběr provádí. **Při odběru vzorků do sterilních vzorkovnic je nutno její hrdlo předem opálit plamenem.**

1.1.3.1. Kusové materiály

Drobné kusové výrobky se odebírají po několika kusech z různých míst a hloubek (včetně míst styku s obalem) pomocí sterilní lžice, naběračky, pinzety, atd. Ukládají se do sterilní vzorkovnice nebo se balí do sterilní fólie.

Středně velké a velké kusové výrobky se vzorkují jedním z následujících způsobů:

- výkrojem** – pomocí sterilního nože či pilky se z kusů bochníkového tvaru odebírá výkroj klínovitého tvaru, u kusů čtvercového půdorysu se vedou řezy kolmo na hrany, u výrobků podlouhlého tvaru se vede řez kolmo na podélnou osu. Odebrané vzorky se zabalí do sterilní fólie.
- z vnitřních řezných ploch** – výrobek se sterilně rozkrojí nožem na několik částí a z různých řezných ploch se odeberou v potřebném úhrnném množství dílčí vzorky a přenesou se do sterilní vzorkovnice;
- vzorkovačem** – po odkrojení povrchové vrstvy (0,5 – 1 cm) se z několika míst odebere vývrt sterilním vzorkovačem (nebozezem, sondou) a vytlačí do sterilní vzorkovnice. Výrobky se navrtávají na různých místech do poloviny jejich výšky nebo z jednoho místa různými směry. U tvrdých sýrů se povrch otře etanolem, odebere se vývrt a z něj se odkrojí povrchová vrstva, která se použije k uzavření vzniklého otvoru.

1.1.3.2. Tekuté a kašovitě materiály

Při odběru jednoho vzorku se obsah v nádobě důkladně promíchá a sterilní pipetou nebo sterilní kovovou naběračkou se odpovídající množství přenesou do sterilní vzorkovnice.

Při odběru většího počtu vzorků z velké nádoby nebo nádrže obsah nepromícháváme a vzorky odebereme z různých míst a hloubek nádrže (nejméně ze tří vrstev). Podle účelu vyšetření se vzorky přenesou buď do jedné, nebo do samostatných vzorkovnic.

Dalším způsobem je odběr pomocí vypouštěcího ventilu. Ventil nejprve dezinfikujeme 70% etanolem a opálíme plamenem, poté odpustíme 10 – 100 ml tekutiny a následně napustíme potřebné množství vzorku do sterilní vzorkovnice.

1.1.3.3. Sypké materiály

Dovoluje-li to balení výrobku, obsah nejdříve promícháme sterilním míchadlem nebo naběračkou a sterilní lžicí či naběračkou odebereme z různých míst potřebné množství vzorku, který přeneseme do sterilní vzorkovnice.


Vzorky z velkých balení nebo nebalené (volně ložené) se odebírají z různých míst a hloubek speciálním vzorkovačem. Mimo to se odebírá i vzorek z povrchových vrstev či vrstev, které se přímo dotýkají obalu výrobku.



Obr. 1: Vzorkovač na pevné a pastovité materiály.

1.1.3.4. Materiály smíšené konzistence

Odebírají se všechny složky výrobku, a to v poměru, v jakém jsou ve výrobku zastoupeny. Podle povahy vyšetření se umísťují do jedné nebo do více samostatných sterilních vzorkovnic.

| Inspektorát Hodonín Hubáčkova 1484, Hodonín, 595 01, IČ: 72722727 |  | | | | | | |
|--|---|--------------|----------|-------------|---|----|--|
| Hygienický dozor nad živočišnými produkty Objednávka laboratorního vyšetření Č. 01234 567000 S72000 | | | | | | | |
| Pro: Státní veterinární ústav Hodonín, Jakoubka ze Stříbra 32, 525 00, Hodonín 5 Veterinární inspektor: MVDr. Jan Novák Kód inspektora: S72000 Protokol zašlete na adresu: Krajská veterinární správa pro Jihomoravský kraj, Nejedlého 57, Brno, 648 00 | Údaje laboratoře: labor. protokol přijal datum | | | | | | |
| vzorek č.: 01234 567000 S72044 (1) datum odběru: 23.10.2007 hodina odběru: 09:00 | | | | | | | |
| místo odběru veter. registr. č.: CZ 1234 země: CZ KÚ: 786762 okres: HO název a adresa: Ctibor Švihák – Řezník a uzenář, Koblížkova 135, Mutěnice, 589 00 odběru přítomen zástupce subjektu: p. Švihák | | | | | | | |
| identifikace vzorku/zvířete počet vzorků: 1 datum výroby: 20.10.2007 teplota při odběru: 4 °C popis úpravy: způsob konzervace: chlazení | | | | | | | |
| <table border="1" style="width: 100%;"><tr><th style="text-align: left;">vzorek</th><th style="text-align: left;">množství vz.</th><th style="text-align: left;">jednotka</th></tr><tr><td>TOMV vařené</td><td>5</td><td>ks</td></tr></table> | vzorek | množství vz. | jednotka | TOMV vařené | 5 | ks | |
| vzorek | množství vz. | jednotka | | | | | |
| TOMV vařené | 5 | ks | | | | | |
| nákup služeb pro SVD: ano cena za vzorek (zapláceno majiteli): 0,- Kč důvod vyšetření: běžný hygienický dozor Nařízení ES 2073/2005: 1.3. - Potraviny určené k přímé spotřebě, které nepodporují růst <i>L. monocytogenes</i> ; poznámka: výrobce Ctibor Švihák CZ 5811 | | | | | | | |
| Razítko a podpis veterinárního inspektora | Podpis majitele, u kterého byly vzorky odebrány | | | | | | |
| Slouží jako příloha k protokolu o kontrolním zjištění. | | | | | | | |
| Vyplňuje se 3x – 1x pro KVS, 1x pro majitele, 1x pro laboratoř | | | | | | | |

Obr. 2: Žádanka o laboratorní vyšetření.

1.2. Přeprava, příjem a uchovávání vzorků

Při přepravě a uchovávání vzorků musí být vytvořeny takové podmínky, aby nemohlo dojít k jejich záměně, poškození a znečištění obalů a nežádoucímu působení atmosférických vlivů. Dále je třeba zajistit, aby nenastaly změny v mikrobiálním složení vzorků, tj. aby se mikroorganismy ve vzorku nerozmnožovaly, neodumíraly, aby si podržely životaschopnost a původní početní a druhové zastoupení. Toho lze docílit šetrným omezením nebo zastavením metabolismu mikroorganismů, a to snížením teploty pod růstové minimum nebo ve specifických případech některými chemickými látkami (např. konzervační činidla používaná pro vzorky syrového kravského mléka určeného k vyšetření v centrálních laboratořích).

1.2.1. Přeprava vzorků

Zvláštní pozornost musí být věnována zachování doporučených teplot úchovy v průběhu přepravy jednotlivých druhů vzorků:

- stabilní výrobky – okolní teplota
- čerstvé a chlazené výrobky – rozmezí teplot 0 – 4 °C
- zmrazené a hlubokozmrazené výrobky – teploty pod -18 °C
- pasterované a podobné výrobky – rozmezí teplot 0 – 4 °C
- zkažené jednotky stabilních výrobků – rozmezí teplot 0 – 4 °C
- rychle se kazící potraviny (např. vnitřnosti, čerstvé ryby) – musí být při přepravě uchovávány při teplotě v rozmezí 0 – 2 °C.

K přepravě vzorků se používají různé izotermické obaly s chladicími vložkami nebo s pevným CO₂ (suchý led), dále přenosné chladničky, mrazící boxy, atd. Transportní teplota musí být dodržena po celou dobu přepravy do laboratoře. Vzorky konzerv se přepravují v podmínkách, které vylučují zmrznutí obsahu nebo porušení hermetičnosti obalu. Zkažené jednotky stabilních výrobků musí být přepravovány v ochranných uzavřených obalech. Doba transportu vzorků by neměla přesáhnout 6 hodin.

1.2.2. Příjem a uchovávání vzorků v laboratoři

Při příjmu vzorků v laboratoři se posoudí jejich stav, zkontroluje se, zda souhlasí údaje uvedené v průvodní dokumentaci a provede se záznam o příjmu vzorků do laboratorního deníku. Je-li stav vzorků neuspokojivý, nebo je-li jejich nedostatečné množství, musí laboratoř takové vzorky odmítnout. Obecně musí být o vzorcích přijatých do laboratoře vedena dokumentace tak, aby byl monitorován jejich postup od okamžiku přijetí až do doby zpracování protokolu o výsledku zkoušení.

Zápis do laboratorního deníku musí obsahovat zejména: pořadové číslo záznamu, datum a hodinu příjmu vzorků, druh a množství vzorků, jejich charakteristiku, údaje o vzorkování (datum, způsob vzorkování, konzervace atd.), jméno a adresu majitele vzorků, datum a hodinu zahájení rozboru, způsob přípravy vzorků k rozboru, hmotnost navážek a stupeň ředění, zjištěné mikrobiologické ukazatele, jméno osoby, která vyšetření provedla a případně další nezbytné údaje.

Zpracování vzorků v laboratoři by mělo být zahájeno co nejdříve po příjmu vzorků. Po celou dobu před započítím zkoušení musí být vzorky uchovávány v podmínkách, které brání jakékoli změně v počtu a složení mikroorganismů přítomných ve vzorcích.

Pro jednotlivé druhy vzorků jsou přípustné následující teploty a doby úchovy:

- **stabilní výrobky** – zpracovat co možná nejdříve a před datem ukončení trvanlivosti, uchovávat je lze při okolní teplotě na suchém a chladném místě;
- **čerstvé a chlazené výrobky** – zpracovat nejpozději do 24 hodin po příjmu, uchovávat v rozmezí teplot 0 – 4 °C; je-li nutné dobu úchovy prodloužit, vzorky se co nejrychleji zamrazí na teplotu -18 °C a tato skutečnost se uvede do protokolu o výsledku zkoušení;
- **pasterované a podobné výrobky** – zpracovat co možná nejdříve a před ukončením trvanlivosti, uchovávat v rozmezí teplot 0 – 4 °C;
- **zkažené jednotky stabilních výrobků** – zpracovat co možná nejdříve (nejpozději do 48 hodin), uchovávat v rozmezí teplot 0 – 4 °C. Vyšetření zkažených výrobků se provádí pouze ve zvláštních případech, nikoli v rámci běžné kontroly.

1.3. Zpracování vzorků v laboratoři

Laboratorní zpracování vzorků se skládá z řady na sebe navazujících pracovních kroků, začínajících otevřením obalů vzorků, navážením (odměřením) množství potřebného k vyšetření, homogenizací vzorku, jeho naředěním, očkovaním do živných půd a kultivací. Při stanovení termorezistentních mikroorganismů je součástí zpracování také tepelná inaktivace vzorku. Obecně platí, že doba mezi ukončením přípravy výchozí suspenze a okamžikem, kdy dojde ke kontaktu inokula s živnou půdou nesmí přesáhnout 45 minut.

Aby nedošlo ke kontaminaci okolí a zkušebního vzorku je vhodné pracovat ve zvláštních provozních místnostech nebo v bezpečnostních boxech. Jako první v pořadí se zkouší výrobky obsahující velmi málo mikroorganismů (např. pasterované výrobky) a teprve po nich výrobky s kontaminací vyšší.

1.3.1. Otevírání obalů vzorků

Obal, v němž je výrobek uložen, se musí otevřít tak, aby bylo možno odebrat navážku odpovídající průměrným hodnotám celého vzorku a současně aby nemohlo dojít ke kontaminaci vzorku. Není-li možno pracovat v bezpečnostním boxu, provádějí se všechny pracovní operace v blízkosti plamene.

Před vlastním otevřením se hermeticky uzavřené obaly omyjí detergentem, opláchnou čistou vodou a osuší. Dále je vhodné provést i zkoušku hermetičnosti obalu, a to úplným ponořením konzervy do vody o teplotě 85 °C na dobu 5 – 7 minut, kdy pozorujeme tvorbu vzduchových bublinek na obale. Jinou možností je využití na vývěvu napojeného anaerostatu či exikátoru, do kterého vložíme zkoušený výrobek. Při netěsnosti obalu dochází při podtlaku k unikání obsahu konzervy. Nehermetické obaly se otrou vatovým tamponem namočeným v 70% etanolu, je-li to možné opálí se plamenem. Vzorky tekutých nebo sypkých materiálů se před otevřením promíchají desetinasobným převrácením dnem vzhůru nebo kruhovým pohybem. Vzorky zmrazených výrobků se nechají rozmrazit při teplotě 2 – 5 °C, navážka se zhotoví ihned po rozmrazení, nejdéle do 18 hodin od počátku rozmrazování. Všechny nástroje, které se použijí k otevření obalu (otvírač plechovek, nůžky, nůž, atd.), musí být sterilní.

Vzorkovnice, láhve či původní spotřebitelské balení (mimo konzerv) se v místě styku s uzávěrem otrou tamponem namočeným v 70% etanolu, ožehnou v plameni (dovoluje-li to materiál obalu) nebo se etanol nechá samovolně odpařit. Obal se otevře (odtrhnutím,

sterilním otvíračem na lahve, atd.) hrdlo se znovu opálí a odebere se potřebné množství vzorku.

Při otvírání sáčků a jiných obalů z různých fólií či papíru se obal v místě otevření potře tamponem namočeným do 70% etanolu. Potom se rozstříhne sterilními nůžkami nebo rozřízne sterilním skalpem či nožem a odebere se potřebné množství.

Vzhledově nezměněné konzervy se před otevřením dekontaminují některým z následujících způsobů:

- ***víčko sklenice*** nebo ***horní čelo plechovky*** (protilehlé výtlači) se potře tamponem namočeným v 70% etanolu, tampon se nechá na povrchu a před otevřením konzervy se zapálí. Plechové víčko se otvírá sterilním otvíračem nebo probíjí sterilním průbojníkem v bezprostřední blízkosti hořícího tamponu, průměr nebo délka otvoru musí činit 1 – 3 cm.
- ***gumové a plastové uzávěry*** se rovněž dezinfikují 70% etanolem, ale tampon se nezapaluje;
- při otvírání ***lahví a tub se šroubovacím uzávěrem*** se uzávěr nejprve opálí v plameni, poté odšroubuje a sejme, okraje lahví nebo membrána tuby se opálí, membrána se prorazí sterilním skalpelem.

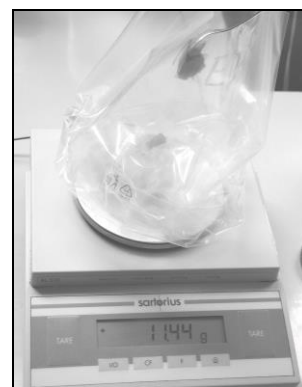
Vzhledově defektní konzervy se ukládají do kovového koše, povrch víčka dekontaminujeme 70% etanolem, ale ***tampon nikdy nezapalujeme***. Po odpaření etanolu se víčko překryje sterilní nálevkou, která musí pokrývat celý povrch. Otvorem nálevky se opatrně sterilním průbojníkem prorazí víčko a vytvoří se velmi malý jehlový otvor. Až z konzervy přestane vycházet plyn a její obsah, odstraníme nálevku, víčko oťžeme sterilním tamponem a průbojníkem rozšíříme otvor. Ihned odebereme potřebnou navážku. Místo nálevky lze použít polyetylenový sáček, do kterého dekontaminovanou konzervu vložíme a sáček u dna konzervy pevně zavážeme. Další postup je shodný.

1.3.2. Navážka vzorku

Odběr navážky se provádí ihned po otevření vzorkovnice nebo obalu vzorku, v bezprostřední blízkosti plamene kahanu, sterilními nástroji (lžíce, pinzeta, skalpel, pipeta atd.) do sterilní nádoby či sterilního homogenizačního sáčku. Nádoby či sáčky se pečlivě označí údaji o analytickém vzorku. Navážka se odebírá tak, aby v ní byly zastoupeny všechny složky vzorku v takovém poměru, v jakém se v něm vyskytují.

Pokud nebylo možno tekuté, kašovitě či sypké vzorky dokonale promíchat před otevřením obalu, musí se asepticky promíchat po jeho otevření, a to sterilní skleněnou tyčinkou či lžící. Tekuté vzorky se odměřují sterilní pipetou z hloubky vzorkovnice, roztok ulpívající na povrchu pipety se nechá stéci k jejímu hrotu a odstraní se otřením o vnitřní stěnu vzorkovnice. Viskózní tekutiny se odstraní otřením povrchu pipety sterilní buničinou.

Hmotnost nebo objem navážky je konkrétně stanoven v příslušných normách pro určitý výrobek nebo metodu rozboru. Obvykle to bývá pro kvantitativní vyšetření 10 g nebo 10 ml, pro přímé očkování tekutého vzorku 1 ml. Pro kvalitativní vyšetření se obvykle odebírá 25 g nebo 25 ml zkoušeného vzorku.



Obr. 3: Navažování vzorku.

1.3.3. Homogenizace vzorku

Homogenizace vzorků pro mikrobiologické vyšetření se provádí nejčastěji v homogenizátoru peristaltického typu (Stomacher) se sterilními sáčky z plastu. Doba homogenizace obvykle trvá 1 – 2 minuty.

Další, méně obvyklý způsob homogenizace, se provádí rotačním homogenizátorem, s regulovatelným počtem otáček vybaveným skleněnými nebo kovovými nádobkami, které jsou sterilizovatelné. Doba homogenizace nesmí přesáhnout 2,5 min.

Pro homogenizaci viskózních nebo hustých tekutých vzorků (např. vaječná melanž) se používá protřepávání se sterilními skleněnými perlami.

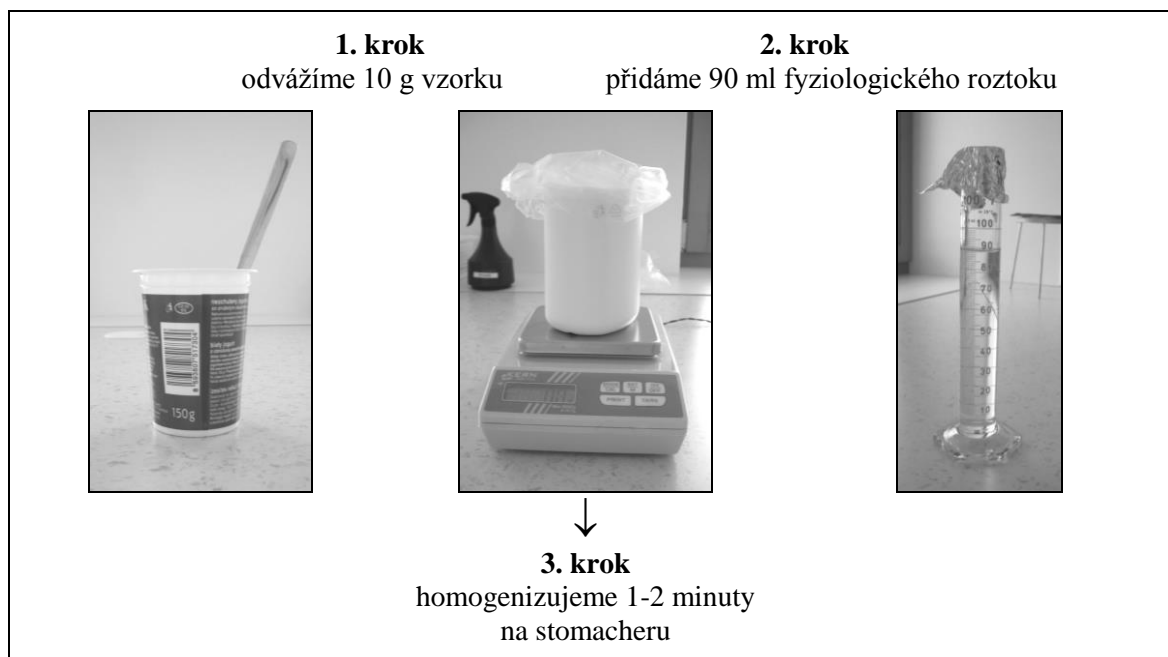


Obr. 4: Stomacher.

1.3.4. Ředění vzorku

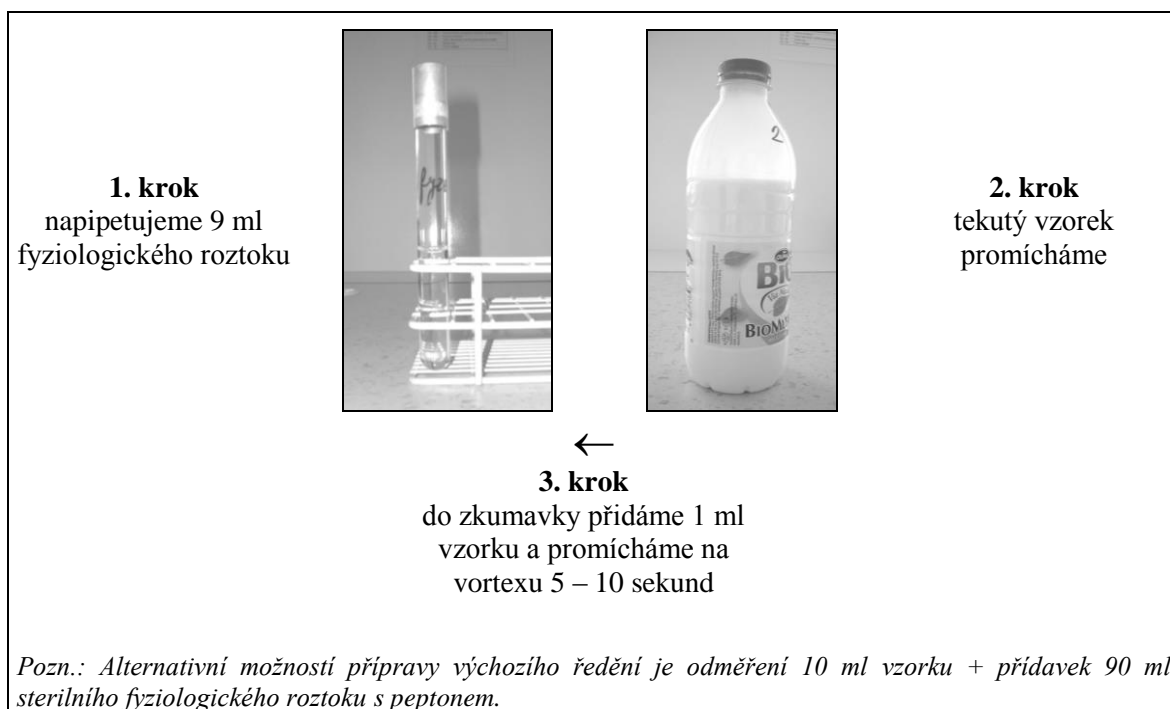
1.3.4.1. Příprava výchozí suspenze

Kvantitativní mikrobiologické vyšetření začíná přípravou výchozí suspenze = primárního ředění vzorku (tj. ředění 10^{-1}), výjimkou je přímé očkování neředěného tekutého vzorku (tj. ředění 10^0). Do sterilní nádoby (u vzorků tekutých) nebo do sterilního sáčku z plastu (u vzorků kašovitých nebo pevných) odvážíme předepsanou hmotnost nebo odměříme objem zkušebního vzorku. Přidáme devítinásobné množství ředícího roztoku vzhledem k hmotnosti či objemu vzorku. Jako ředící médium běžně používáme sterilní fyziologický roztok s peptonem (0,85 % NaCl + 0,1 % peptonu, pH 7). Tekuté vzorky promícháme, pevné a kašovitě vzorky zhomogenizujeme (viz. obr. 5, 6).



Obr. 5: Příprava výchozí suspenze – pevné a kašovitě vzorky.

Aby se zabránilo poškození mikroorganismů prudkými změnami teploty, má být v průběhu popsaných operací teplota ředícího roztoku přibližně shodná s okolní teplotou v laboratoři. Je-li to vzhledem k charakteru vzorku nutné, ponechají se velké částice sedimentovat (max. 15 min).



Obr. 6: Příprava výchozí suspenze – tekuté vzorky.

Při vyšetření ve vodě **nerozpustných práškovitých vzorků**, se nejprve vzorek promíchá s ředícím médiem a takto získaná suspenze se nechá 10 minut odstát a následně se 1 minutu intenzivně protřepává. V případě bobtnavých **vzorků obsahujících škrob** (např. pudink) nejdříve suspendujeme vzorek ve sterilním oleji (opět devítinásobné množství vzhledem k navázce vzorku) a za stálého míchání vzniklou suspenzi přeneseme do ředícího roztoku. Jestliže se jedná o kvalitativní vyšetření (např. průkaz salmonel), zvolíme takový objem půdy pro neselektivní pomnožení, aby se dosáhlo přibližného ředění 1:100.

V případě, že se stanovuje **počet spór**, je třeba výchozí suspenzi (homogenát) bezprostředně po přípravě podrobit záhřevu na příklad při teplotě 80 °C po dobu 10 minut a poté rychle zchladit. Homogenát napipetujeme sterilní pipetou do sterilní zkumavky (obvyklé množství 10 ml). Současně si připravíme druhou – kontrolní zkumavku opět s 10 ml homogenátu a dáme do ní teploměr. Obě zkumavky umístíme do stojánku ve vodní lázni vytemperované na potřebnou teplotu. V průběhu záhřevu sledujeme teplotu v kontrolní zkumavce, jakmile dosáhne potřebné hodnoty (např. 80 °C) začneme odměřovat čas (např. 10 minut). Po ukončení záhřevu zkumavky ihned prudce zchladíme na laboratorní teplotu.

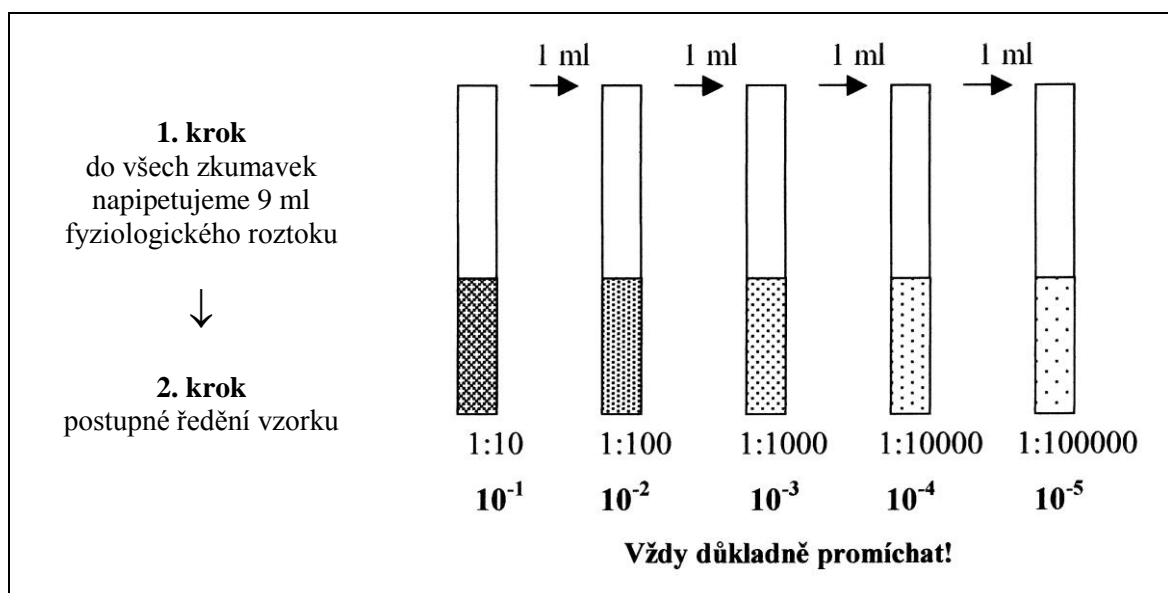
Jestliže vyšetřujeme **vzorky s vysokým obsahem tuku**, potom:

- **tekuté výrobky** (např. smetana ke šlehání) odebíráme skleněnou pipetou nahřátou trojnásobným protažením v plameni, po nasátí vzorku otřeme povrch pipety sterilním tamponem. K ředění vzorku použijeme ředící roztok vytemperovaný na 40 – 45 °C, zbytky tuku ulpělé v pipetě vypláchneme několikanásobným nasátím ředícího roztoku a vyprázdněním pipety.

- pevné tuky (např. máslo, sádlo) odvážíme do vhodné sterilní skleněné nádoby, k přípravě výchozí suspenze použijeme ředící roztok vytemperovaný na 40 – 45 °C. Vzorek necháme rozpustit. V průběhu ředění či před inokulací musíme vzorek vždy důkladně promíchat tak, aby došlo ke spojení vodné a tukové fáze. Alternativní možností je použití ředícího roztoku o laboratorní teplotě a následné rozehřátí vzorku ve vytemperované vodní lázni (teplota max. 45 °C).

1.3.4.2. Příprava desetinásobných ředění vzorku

Při kvantitativním vyšetření následuje příprava dalších desetinásobných ředění vzorku. Nejprve si připravíme potřebný počet zkumavek, do kterých napipetujeme 9 ml sterilního fyziologického roztoku. Do první zkumavky přidáme 1 ml výchozího ředění (10^{-1}), pipetu přitom do výchozí suspenze neponoříme hlouběji než 1 cm. Směs ve zkumavce dobře promícháme na vortexu po dobu 5 – 10 s. Tím jsme připravili ředění 10^{-2} . Do následující zkumavky přidáme 1 ml ředění 10^{-2} , obsah zkumavky opět dobře promícháme a máme ředění 10^{-3} . Tento postup podle potřeby opakujeme (viz. obr. 7). **Pro přípravu každého ředění použijeme jinou sterilní pipetu či sterilní špičku.**



Obr. 7: Příprava desetinásobných ředění vzorku.

2. Metody stanovení počtu mikroorganismů

Většina vyšetření v potravinářské mikrobiologii je zaměřena kvantitativně, tzn. na stanovení počtu vybraného druhu či skupiny mikroorganismů obsažených ve vyšetřovaném vzorku. Počet mikroorganismů lze zjišťovat buď **přímo**, mikroskopicky či kultivačně, anebo **nepřímo**, tyto metody jsou většinou založeny na hodnocení biochemické aktivity mikroorganismů. Metod využitelných pro kvantifikaci mikroorganismů je celá řada, my se zaměříme na ty, které mají pro rutinní mikrobiologické vyšetření potravin největší význam.

2.1. Kultivační metody stanovení počtu mikroorganismů

Princip kultivačních metod spočívá v přenesení mikroorganismů na vhodnou živnou půdu, kde jsou schopny rozmnožování. Na rozdíl od mikroskopického vyšetření tedy zjišťujeme počet živých buněk, a to buď určitého druhu nebo skupiny mikroorganismů. Určitým omezením je, že jedním kultivačním vyšetřením nejsme schopni stanovit všechny mikroorganismy přítomné ve vzorku, protože mají odlišné růstové nároky. Dále je to doba potřebná k provedení kultivačního vyšetření, tj. nejméně 24 hodin. Proto byly vyvinuty různé rychlometody, které lze s úspěchem použít ke stanovení počtu mikroorganismů (např. Petrifilm™), o kterých se v krátkosti zmíníme v závěru této kapitoly.

Mezi **základní techniky** stanovení počtu mikroorganismů patří:

- stanovení počtu při použití tekutých půd (metoda MPN),
- stanovení počtu při použití pevných půd (metoda zalití, metoda roztěru na povrch média),
- stanovení počtu při použití membránových filtrů.

Mimo tyto základní techniky se při vyšetření některých druhů potravin (např. koření, těstoviny, povrchová kontaminace drůbeže), při vyšetření obalů a obalových materiálů, hodnocení mikrobiologického znečištění výrobních ploch a zařízení či při hodnocení účinnosti čištění a desinfekce používají některé **další metody**. Jedná se např. o stěrovou metodu, metodu oplachu, výplachu, spadu či otiskovou metodu.

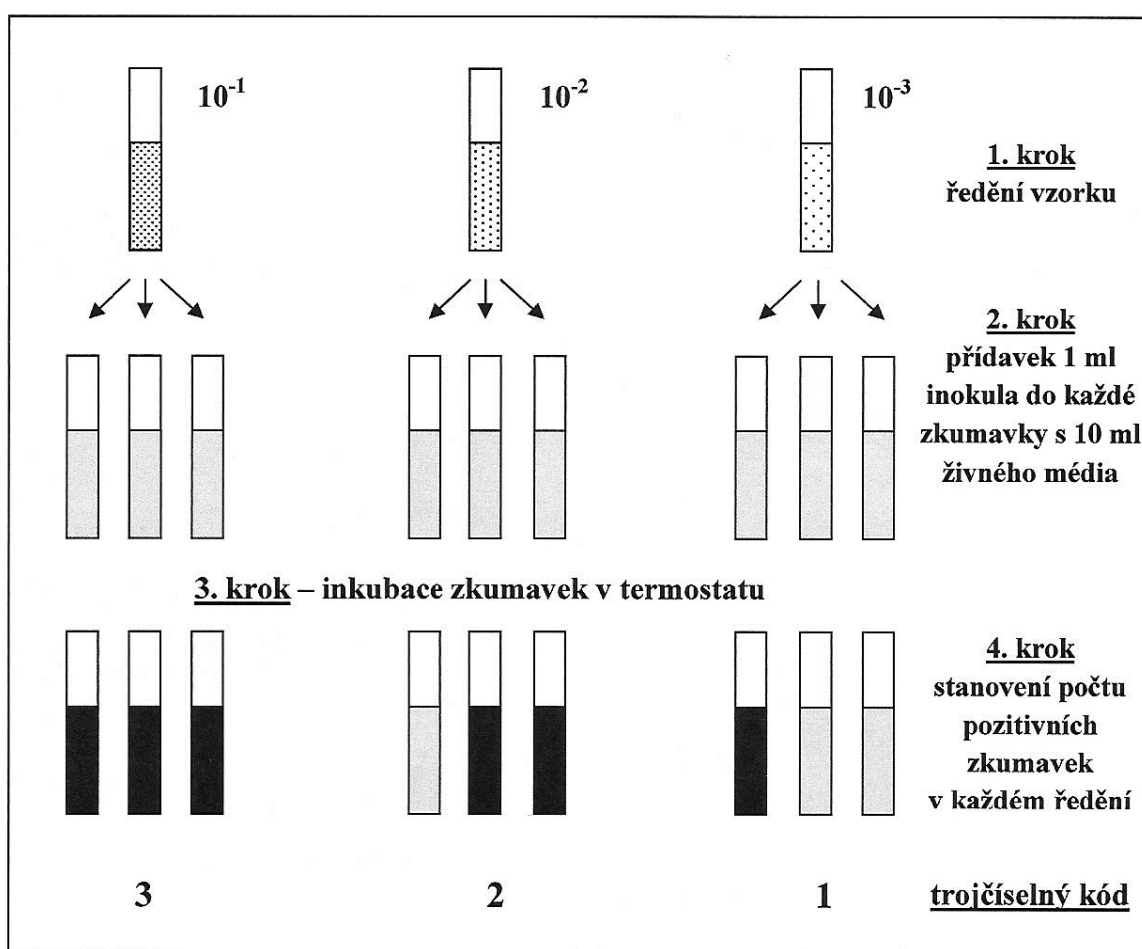
2.1.1. Stanovení počtu mikroorganismů při použití tekutých půd

Ke stanovení počtu mikroorganismů v tekutém prostředí se používá metoda stanovení nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů (metoda MPN, angl. *Most Probable Number*), která je indikována pro stanovení počtu mikroorganismů ve vzorcích, kde se očekává počet menší než 10 bakterií v 1 ml nebo 100 bakterií v 1 g vzorku. Tato metoda je založena na pravděpodobnosti zachytu mikroorganismů ze vzorku. Zkušební vzorky se inokulují do tekuté půdy, jejíž složení obvykle podporuje růst určitého mikroorganismu nebo skupiny mikroorganismů a může obsahovat i látky inhibující růst jiných než cílových mikroorganismů. K určení, zda došlo k růstu cílového mikroorganismu, lze použít různá kritéria (vizuální hodnocení zákalu, tvorba plynu, barevné změny) obvykle s následnou izolací mikroorganismů na selektivní agarovou půdu (např. při stanovení baktérií čeledi *Enterobacteriaceae*). Nejvýše pravděpodobný počet (MPN) se zjistí v tabulkách, kde jsou statisticky vypočtené nejpravděpodobnější hodnoty odpovídající počtu zachytů, tj. počtu pozitivních zkumavek zjištěných po inkubaci.

U vzorků, kde je očekávaná koncentrace mikroorganismů nízká nebo se očekává, že kolísá pouze mírně, je vhodné použít metodu jedné série navzájem shodných zkušebních vzorků, tj. systém založený na jednom ředění vzorku, které je současně inokulováno do série zkumavek (obvykle 10, 15, 20 nebo 25 zkumavek).

Pokud není koncentrace mikroorganismů ve vzorku známa, nebo se očekává, že silně kolísá, volíme metodu několika ředění, která jsou inokulována do série zkumavek. Podle počtu očkovaných zkumavek v každé sérii rozlišujeme test třízkumavkový, pětizkumavkový nebo desetizkumavkový. Používáme-li k odhadu hodnoty MPN tabulky, obvykle očkujeme 3 po sobě jdoucí ředění vzorku. Vzorky odebíráme, zpracujeme a naředíme podle obecných zásad mikrobiologického vyšetření. Souběžně očkujeme stejný počet zkumavek stejným objemem téhož ředění.

Pokud není v odpovídající normě uvedeno jinak, obvykle se přidávají objemy zkušebního vzorku nižší nebo rovné 1 ml k pětinasobnému až desetinásobnému objemu půdy o jednoduché koncentraci. Objemy zkušebního vzorku v rozmezí nad 1 ml do 100 ml se obvykle přidávají k týmž objemům půdy o dvojnásobné koncentraci.



Obr. 8: Základní schéma provedení metody MPN – třízkumavkový test

2.1.1.1. Hodnocení a interpretace výsledků

Hodnotu MPN určujeme na základě počtu pozitivních zkumavek v každém ředění očkované série. Při kultivaci v neselektivních médiích se za pozitivní považují zkumavky se zřetelným projevem růstu (zákal, sediment, povrchová blanka nebo kombinace těchto projevů). V selektivně diagnostických půdách se za předběžně pozitivní považují zkumavky, které jeví změny charakteristické pro růst nebo metabolickou aktivitu

stanovovaného mikroorganismu (např. tvorba plynu, změna barvy média). Přítomnost sledovaných mikroorganismů potvrzujeme dalšími testy a subkultivací na pevnou půdu.

K určení hodnoty MPN můžeme použít 3 různé postupy: a) výpočet podle matematické rovnice, b) určení podle tabulek MPN nebo c) použití specifických počítačových programů. Všechny tyto metody jsou rovnocenné a poskytují validní výsledky.

Při vyhodnocení **metody několika ředění pomocí tabulek MPN** sestavujeme podle počtu pozitivních zkumavek ve třech po sobě jdoucích ředěních tzv. **trojčíselný kód**. Pokud při vyšetření vzorku očkujeme více než tři ředění, provedeme při vyhodnocení výběr „správné“ kombinace tří po sobě jdoucích ředění následujícím způsobem – zaznamenáme všechny vzniklé kombinace pozitivních zkumavek a podle tabulky MPN jim přiřadíme příslušné kategorie (viz tabulka 2, 3). Ke zjištění vlastní hodnoty MPN použijeme:

1. kombinaci tří po sobě jdoucích ředění, která patří do kategorie 1. Pokud více kombinací patří do kategorie 1 použijeme tu, v níž je vyšší počet pozitivních zkumavek.
2. nezjistí-li se žádná kombinace patřící do kategorie 1, použijeme kombinaci patřící do kategorie 2. Pokud více kombinací patří do kategorie 2 použijeme tu, v níž je vyšší počet pozitivních zkumavek.
3. nezjistí-li se žádná kombinace patřící do kategorie 2, použijeme kombinaci patřící do kategorie 3. Pokud více kombinací patří do kategorie 2 použijeme tu, v níž je vyšší počet pozitivních zkumavek.

Některé kombinace pozitivních zkumavek mají vyšší pravděpodobnost výskytu než jiné (např. kombinace pozitivních výsledků 3-2-1 oproti 0-0-3). Aby se tato pravděpodobnost kvantifikovala, byla všem kombinacím pozitivních výsledků přiřazena kategorie od 0 do 3. Výsledek kategorie 1 je vysoce pravděpodobný, zatímco výsledek kategorie 3 je vzácný a nemusí být snadno reprodukovatelný. Nejhorší případy jsou výsledky kategorie 0, ty je třeba hodnotit s velkou nedůvěrou.

Jsou-li všechny zkumavky očkované série ředění negativní, je MPN nižší než nejnižší počet mikroorganismů touto metodou prokazatelný. Jsou-li všechny zkumavky očkované série ředění pozitivní, je MPN vyšší než nejvyšší počet mikroorganismů touto metodou prokazatelný.

Tabulka 2: Příklady výběru pozitivních výsledků pro kalkulaci MPN.

| Vzorek | Počet pozitivních zkumavek ze tří inokulovaných uvedeným množstvím vzorku | | | | | | Kód |
|--------|---|----------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----|
| | tekuté: | 10 ml | 1 ml | 10 ⁻¹ ml | 10 ⁻² ml | 10 ⁻³ ml | |
| | ostatní: | 1 g | 10 ⁻¹ g | 10 ⁻² g | 10 ⁻³ g | 10 ⁻⁴ g | |
| 1 | | <u>3</u> | <u>3</u> | <u>2</u> | 1 | 0 | 332 |
| 2 | | 3 | <u>3</u> | <u>3</u> | <u>0</u> | | 330 |
| 3 | | 2 | 2 | <u>1</u> | <u>1</u> | <u>0</u> | 110 |
| 4 | | <u>3</u> | <u>3</u> | <u>0</u> | 0 | 0 | 330 |
| 5 | | <u>2</u> | <u>2</u> | <u>0</u> | 1 | 0 | 220 |

Pozn.: Podtržení označuje vybranou kombinaci.

Vzorek 1 – lze postupně sestavit 3 různé kombinace: 332, 321 a 210, všechny kombinace jsou v kategorii 1 (viz tabulka 3), proto vybereme tu s největším počtem pozitivních zkumavek – **332**;

Vzorek 3 – lze postupně sestavit 3 kombinace: 221 (kategorie 3), 211 (kategorie 2) a 110 (kategorie 1), vybereme tu patřící do kategorie 1 – **110**.

Pokud série ředění použitá k sestavení kódu začíná jiným ředěním než je uvedeno v tabulce, musí se hodnota MPN z tabulky násobit, např. při ředění 10⁻², 10⁻³ a 10⁻⁴ tabulkovou hodnotu násobíme číslem 10, při ředění 10⁻³, 10⁻⁴ a 10⁻⁵ tabulkovou hodnotu

násobíme číslem 100, atd. Pokud jsme pro první ředění použili objem 10 ml místo 1 ml nebo pokud jsme očkovali 1 ml neředěného vzorku musíme tabulkovou hodnotu vydělit číslem 10.

Výsledek se vyjádří jako nejvýše pravděpodobný počet mikroorganismů (nebo skupiny mikroorganismů) v 1 a nebo 1 ml vzorku.

Tabulka 3: *Indexy MPN – třízkumavkový test.*

| Kód | | | MPN v 1 g (ml) vzorku | Kategorie | Kód | | | MPN v 1 g (ml) vzorku | Kategorie |
|-----------------|------------------|------------------|--------------------------|-----------|-----------------|------------------|------------------|--------------------------|-----------|
| 10 ⁰ | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | | | 10 ⁰ | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | | |
| 0 | 0 | 0 | < 0,30 | | 2 | 2 | 0 | 2,1 | 1 |
| 0 | 0 | 1 | 0,30 | 3 | 2 | 2 | 1 | 2,8 | 3 |
| 0 | 1 | 0 | 0,30 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3,5 | 0 |
| 0 | 1 | 1 | 0,61 | 0 | 2 | 3 | 0 | 2,9 | 3 |
| 0 | 2 | 0 | 0,62 | 3 | 2 | 3 | 1 | 3,6 | 0 |
| 0 | 3 | 0 | 0,94 | 0 | 3 | 0 | 0 | 2,3 | 1 |
| 1 | 0 | 0 | 0,36 | 1 | 3 | 0 | 1 | 3,8 | 1 |
| 1 | 0 | 1 | 0,72 | 2 | 3 | 0 | 2 | 6,4 | 3 |
| 1 | 0 | 2 | 1,1 | 0 | 3 | 1 | 0 | 4,3 | 1 |
| 1 | 1 | 0 | 0,74 | 1 | 3 | 1 | 1 | 7,5 | 1 |
| 1 | 1 | 1 | 1,1 | 3 | 3 | 1 | 2 | 12 | 3 |
| 1 | 2 | 0 | 1,1 | 2 | 3 | 1 | 3 | 16 | 0 |
| 1 | 2 | 1 | 1,5 | 3 | 3 | 2 | 0 | 9,3 | 1 |
| 1 | 3 | 0 | 1,6 | 3 | 3 | 2 | 1 | 15 | 1 |
| 2 | 0 | 0 | 0,92 | 1 | 3 | 2 | 2 | 21 | 2 |
| 2 | 0 | 1 | 1,4 | 2 | 3 | 2 | 3 | 29 | 3 |
| 2 | 0 | 2 | 2,0 | 0 | 3 | 3 | 0 | 24 | 1 |
| 2 | 1 | 0 | 1,5 | 1 | 3 | 3 | 1 | 46 | 1 |
| 2 | 1 | 1 | 2,0 | 2 | 3 | 3 | 2 | 110 | 1 |
| 2 | 1 | 2 | 2,7 | 0 | 3 | 3 | 3 | > 110 | |

Jako alternativní metodu pro stanovení počtu mikroorganismů lze použít automatizovaný systém TEMPO®, který byl vyvinut pro kvantifikaci indikátorových a vybraných patogenních mikroorganismů v potravinách. Výsledek je získán na principu metody nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů (MPN). TEMPO® představuje jednoduše proveditelný, finančně a časově úsporný systém, který nabízí automatický odečet a záznam výsledků bez nutnosti použít další konfirmační kroky.

2.1.2. Stanovení počtu mikroorganismů při použití pevných půd

Pro stanovení počtu mikroorganismů na pevných půdách se používají dvě kultivační techniky – očkování zaléváním do pevných agarových půd (metoda zalití) a očkování roztěrem na povrch pevné půdy (metoda roztěru). Postup provedení těchto metod byl uveden dříve (viz I. díl skript), v této kapitole se zaměříme na hodnocení a interpretaci výsledků stanovení.

2.1.2.1. Vyjádření výsledku – metoda výpočtu

Po ukončení inkubace stanovené příslušnou metodikou se počítají kolonie narostlé na Petriho miskách, a to všechny kolonie v případě stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM) nebo pouze kolonie s charakteristickou morfologií, které dávají charakteristické reakce se složkami půdy (tzv. typické či presumptivní kolonie), při stanovení určitých druhů nebo skupin mikroorganismů.

Pro vlastní výpočet vybereme misky obsahující ne více než 300 kolonií (CPM), resp. 150 kolonií (stanovení určitého druhu či skupiny mikroorganismů) ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Je nutné, aby alespoň jedna z těchto misek obsahovala minimálně 10 kolonií.

Počet mikroorganismů (N) přítomných ve vzorku se vypočítá jako vážený průměr ze dvou po sobě jdoucích ředění podle následující rovnice:

$$N = \frac{\Sigma C}{V (n_1 + 0,1n_2) d}$$

Kde:

ΣC je součet kolonií ze všech ploten vybraných pro výpočet ze dvou po sobě následujících ředění, přičemž nejméně jedna z ploten obsahuje 10 kolonií,

V je objem inokula v ml očkovaného na každou z ploten,

n_1 je počet ploten vybraných k výpočtu z prvního zvoleného ředění,

n_2 je počet ploten vybraných k výpočtu ze druhého zvoleného ředění,

d je faktor ředění odpovídající prvnímu pro výpočet zvolenému ředění (např. 10^{-2}).

Výsledek se zaokrouhlí tak, aby obsahoval pouze dvě platné číslice. Je-li třetí číslice čísla určeného k zaokrouhlení nižší než 5, předchozí číslice se nemění; je-li třetí číslice čísla určeného k zaokrouhlení vyšší nebo rovna 5, předchozí číslice se zvýší o hodnotu jedna.

Počet mikroorganismů – kolonie tvořících jednotek (KTJ) v 1 ml u tekutých výrobků nebo v 1 g u ostatních výrobků se vyjádří jako číslo $1,0$ až $9,9 \cdot 10^x$, kde x je příslušná mocnina 10.

Výsledek tedy vyjádříme tímto způsobem: např. $5,8 \cdot 10^1$ KTJ/g či ml (dle povahy vzorku).

Příklad 1:

Dvě po sobě jdoucí ředění (10^{-2} , 10^{-3}), v každém dvě počitatelné misky, metoda zalití:

$$N = \frac{68 + 48 + 7 + 4}{1 \cdot (2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-2}} = \frac{125}{1 \cdot 2,2 \cdot 10^{-2}} = 5\,682 = 5\,700 = 5,7 \cdot 10^3$$

Příklad 2:

Dvě po sobě jdoucí ředění (10^{-2} , 10^{-3}), v každém dvě počitatelné misky, metoda roztěru:

$$N = \frac{68 + 48 + 7 + 4}{0,2 \cdot (2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-2}} = \frac{125}{0,2 \cdot 2,2 \cdot 10^{-2}} = 28\,409 = 28\,000 = 2,8 \cdot 10^4$$

Příklad 3:

Dvě po sobě jdoucí ředění (10^{-2} , 10^{-3}), v prvním jedna, ve druhém dvě počitatelné misky, metoda zalití:

$$N = \frac{148 + 67 + 42}{1 \cdot (1 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-2}} = \frac{257}{1 \cdot 1,2 \cdot 10^{-2}} = 21\,416 = 21\,000 = 2,1 \cdot 10^4$$

Příklad 4:

Dvě po sobě jdoucí ředění (10^{-2} , 10^{-3}), v prvním jedna, ve druhém dvě počitatelné misky, metoda roztěru:

$$N = \frac{148 + 67 + 42}{0,2 \cdot (1 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-2}} = \frac{257}{0,2 \cdot 1,2 \cdot 10^{-2}} = 107\,083 = 110\,000 = 1,1 \cdot 10^5$$

Příklad 5:

Dvě po sobě jdoucí ředění (10^{-2} , 10^{-3}), v každém jedna počitatelná miska, metoda zalití:

$$N = \frac{68 + 7}{1 \cdot (1 + 0,1 \cdot 1) \cdot 10^{-2}} = \frac{75}{1 \cdot 1,1 \cdot 10^{-2}} = 6\,818 = 6\,800 = 6,8 \cdot 10^3$$

Příklad 6:

Dvě po sobě jdoucí ředění (10^{-2} , 10^{-3}), v každém jedna počitatelná miska, metoda roztěru:

$$N = \frac{68 + 7}{0,2 \cdot (1 + 0,1 \cdot 1) \cdot 10^{-2}} = \frac{75}{0,2 \cdot 1,1 \cdot 10^{-2}} = 34\,090 = 34\,000 = 3,4 \cdot 10^4$$

Příklad 7:

Jedno ředění (10^{-2}), dvě počitatelné misky, metoda zalití:

$$N = \frac{68 + 48}{1 \cdot (2) \cdot 10^{-2}} = \frac{116}{1 \cdot 2 \cdot 10^{-2}} = 5\,800 = 5,8 \cdot 10^3$$

Příklad 8:

Jedno ředění (10^{-2}), dvě počitatelné misky, metoda roztěru:

$$N = \frac{68 + 48}{0,2 \cdot (2) \cdot 10^{-2}} = \frac{116}{0,2 \cdot 2 \cdot 10^{-2}} = 29\,000 = 2,9 \cdot 10^4$$

2.1.2.2. Odhad počtu N_E – méně než 10 kolonií

Jestliže na dvou miskách naočkovaných neředěným zkušebním vzorkem (tekuté výrobky) nebo výchozí suspenzí (10^{-1} , ostatní výrobky) vyrostlo méně než 10 kolonií, ale nejméně 4 kolonie, vypočítá se hodnota N_E (odhad počtu sledovaných mikroorganismů ve vzorku) jako aritmetický průměr počtu kolonií podle následující rovnice:

$$N_E = \frac{\Sigma C}{(V \cdot n \cdot d)}$$

Kde:

ΣC je součet kolonií z obou ploten,

V je objem inokula v ml očkovaného na každou z ploten,

n je počet ploten zvolených k výpočtu,

d je ředící faktor výchozí suspenze nebo prvního z použitých ředění zvoleného k výpočtu (pokud byl inokulován neředěný tekutý výrobek potom $d = 1$).

Výsledek se zaokrouhlí tak, aby obsahoval pouze dvě platné číslice a vyjádří se jako odhad počtu N_E mikroorganismů v 1 ml u tekutých výrobků nebo v 1 g u ostatních výrobků.

Příklad 9:

Výchozí suspenze (10^{-1}), dvě počitatelné misky, metoda roztěru:

$$N_E = \frac{14 + 8}{0,2 \cdot 2 \cdot 10^{-1}} = \frac{22}{0,04} = 550 = 5,5 \cdot 10^2$$

Výsledek vyjádříme ve tvaru např. odhad počtu N_E $5,5 \cdot 10^2$ KTJ/g (pevný vzorek).

2.1.2.3. Odhad počtu N_E – kolonie nepřítomny

Jestliže na dvou miskách naočkovaných neředěným zkušebním vzorkem (tekuté výrobky) nebo výchozí suspenzí (10^{-1} , ostatní výrobky) nebyly zjištěny žádné kolonie, výsledek se vyjádří následujícím způsobem:

- méně než $1/(V \cdot d)$ KTJ v ml (tekuté výrobky) nebo v g (ostatní výrobky)

Kde:

V je objem inokula v ml očkovaného na každou z ploten,

d je ředící faktor výchozí suspenze (pokud byl inokulován neředěný tekutý výrobek potom $d = 1$).

Příklad 10:

Neředěný vzorek (tekuté výrobky), bez nárůstu kolonií, metoda zalití:

$$N_E = < 1 \cdot 1/1 = < 1 \cdot 1 = < 1 \text{ KTJ/ml}$$

Neředěný vzorek (tekuté výrobky), bez nárůstu kolonií, metoda roztěru:

$$N_E = < 1 \cdot 1/0,2 = < 1 \cdot 5 = < 5 \text{ KTJ/ml}$$

Výchozí suspenze (ostatní výrobky), bez nárůstu kolonií, metoda zalití:

$$N_E = < 1 \cdot 1/(10^{-1} \cdot 1) = < 1 \cdot 1/0,1 = < 1 \cdot 10 = < 10 \text{ KTJ/g}$$

Výchozí suspenze (ostatní výrobky), bez nárůstu kolonií, metoda roztěru:

$$N_E = < 1 \cdot 1/(10^{-1} \cdot 0,2) = < 1 \cdot 1/0,02 = < 1 \cdot 50 = < 50 \text{ KTJ/g}$$

2.1.2.4. Odhad počtu N_E – více než 300 (150) kolonií

Jestliže na dvou miskách naočkovaných nejvyšším použitým ředěním zkušební vzorku převýšil počet kolonií hranici 300 KTJ (CPM), resp. 150 KTJ (ostatní kvantitativní ukazatele), výsledek se vyjádří následujícím způsobem.

- pro CPM: více než $300 \cdot 1/(V \cdot d)$ KTJ v ml (tekuté výrobky) nebo g (ostatní výrobky)
- pro ostatní ukazatele: více než $150 \cdot 1/(V \cdot d)$ KTJ v ml nebo g

Kde:

V je objem inokula v ml očkovaného na každou z ploten,

d je faktor ředění odpovídající nejvyššímu použitému ředění.

Příklad 11:

CPM, více než 300 kolonií, ředění 10^{-3} , metoda zalití, tekutý vzorek:

$$N_E = > 300 \cdot 1/(10^{-3} \cdot 1) = > 300 \cdot 1000 = > 3,0 \cdot 10^5 \text{ KTJ/ml}$$

Enterokoky, více než 150 kolonií, ředění 10^{-3} , metoda roztěru, pevný vzorek:

$$N_E = > 150 \cdot 1/(10^{-3} \cdot 0,2) = > 150 \cdot 5000 = > 7,5 \cdot 10^5 \text{ KTJ/g}$$

2.1.3. Stanovení počtu mikroorganismů membránovou filtrací

Filtrační metoda stanovení počtu mikroorganismů se používá při mikrobiologickém vyšetření kapalin s nízkým obsahem mikroorganismů (např. pitná voda), kdy je potřeba zpracovat větší objem vzorku (např. 100 ml), abychom dosáhli směrodatných výsledků. Princip metody spočívá ve filtraci vzorku přes sterilní membránový filtr a přenesení filtru na povrch pevné živné půdy na Petriho misce (kvantitativní vyšetření), případně do tekuté živné půdy ve zkumavce či baňce (kvalitativní vyšetření). Filtrací dochází k nahromadění mikroorganismů obsažených ve vzorku na membránovém filtru a tím k jejich zakoncentrování. Tuto metodu lze použít pouze u čirých vzorků, pro rozbor suspenzí či homogenátů nemůže být tato metoda použita, neboť dochází k zanášení pórů filtru.

Filtrační aparatura se obvykle skládá z nálevky nasedající na podložku z porézního materiálu, na kterou se pokládá membránový filtr, pro stanovení počtu mikroorganismů se obvykle používají filtry o velikosti pórů 0,45 µm. Pokud není filtr dodáván výrobcem jako sterilní, je nutno ho před použitím 3x vyvařit v destilované vodě. Aparatura se nasazuje na filtrační baňku připojenou na vývěvu, takže filtrace probíhá za sníženého tlaku. Po ukončení filtrace se filtr asepticky vyjme z aparatury a pokládá se na povrch předsušené agarové půdy spodní stranou tak, aby k médiu dokonale přilnul a nevznikaly bublinky. Růst kolonií na filtru je umožněn difúzí živin z půdy přes membránový filtr. Podmínky inkubace jsou dány příslušnou metodikou.



Obr. 9: Filtrační aparatura.

2.1.3.1. Vyjádření výsledku – vyšetření pitné vody

Při vyšetření pitné vody se po ukončení inkubace se spočítají kolonie narostlé na filtrech a stanoví se počet KTJ sledovaných mikroorganismů ve vyšetřovaném objemu (tj. 100 ml).

Příklad 12:

Vzorek pitné vody, dva filtry:

$$N = \frac{68 + 48}{2} = \frac{116}{2} = 58$$

Výsledek neupravujeme a vyjádříme ve tvaru 58 KTJ/100 ml.

2.1.3.2. Vyjádření výsledku – vyšetření ostatních filtrovatelných vzorků

Po skončení inkubace se spočítají kolonie narostlé na filtrech a stanoví se počet KTJ sledovaných mikroorganismů ve vyšetřovaném objemu.

Příklad 13:

Neředěný vzorek, dva filtry:

$$N = \frac{88 + 48}{1 \cdot (2) \cdot 10^0} = \frac{136}{1 \cdot 2 \cdot 10^0} = 68 = 6,8 \cdot 10^1$$

Výsledek vyjádříme ve tvaru např. $6,8 \cdot 10^1$ KTJ na vyšetřovaný objem, např. 10 ml.

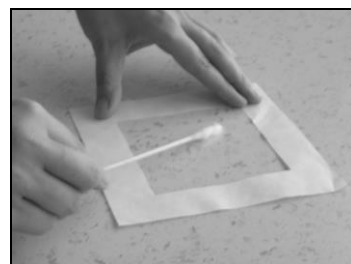
2.1.4. Stěrová metoda

Stěrová metoda se používá při zjišťování mikrobiální kontaminace na povrchu předmětů (různého tvaru i nerovného povrchu), kterými mohou být výrobní plochy a zařízení, další pomůcky, ale i ruce pracovníků, obaly či některé výrobky. Princip metody spočívá v přenesení mikroorganismů z vyšetřovaného povrchu pomocí zvlhčeného tamponu do živného prostředí. Podle účelu vyšetření lze provádět stěr kvantitativní nebo kvalitativní.

2.1.4.1. Kvantitativní stěr

Kvantitativní stěr provádíme z přesně definované plochy, k jejímu ohraničení použijeme sterilní šablonu. Do sterilní zkumavky připravíme 10 ml ředícího roztoku (např. sterilní fyziologický roztok). Sterilní tampon namočíme do ředícího roztoku a přitisknutím ke stěně zkumavky odstraníme přebytečnou tekutinu.

Na vyšetřovanou plochu přiložíme šablonu a stíráme ji v několika směrech zvlhčeným tamponem, kterým postupně otáčíme. Poté vložíme tampon zpět do zkumavky a horní část špejle odломíme o hrdlo zkumavky. Zkumavku intenzivně protřepeme na třepačce až dojde k uvolnění jednotlivých vláken tamponu. Tím máme připravenou výchozí suspenzi (10^{-1}), kterou můžeme dále obvyklým způsobem ředit. Výchozí suspenzi či zvolená ředění kultivujeme zalitím nebo roztěrem, živné médium a podmínky inkubace jsou závislé na druhu prokazovaných mikroorganismů.



Obr. 10: Kvantitativní stěr.

Po ukončení inkubace Petriho misek se spočítají narostlé kolonie a stanoví se počet mikroorganismů na vyšetřované ploše. Pokud stíráme mikroorganismy z celého povrchu vyšetřovaného předmětu a neznáme jeho přesnou plochu, vyjádříme výsledek jako počet mikroorganismů na vyšetřovanou plochu předmětu (např. vnitřní plochu kelímku).

Příklad 14:

Dvě po sobě jdoucí ředění (10^{-2} , 10^{-3}), v každém jedna počitatelná miska, metoda roztěru:

$$N = \frac{68 + 7}{0,2 \cdot (1 + 0,1) \cdot 10^{-2}} = \frac{75}{0,2 \cdot 1,1 \cdot 10^{-2}} = 34\,090 = 34\,000 = 3,4 \cdot 10^4$$

Výsledek vyjádříme ve tvaru $3,4 \cdot 10^4$ KTJ na vyšetřovanou plochu, např. 100 cm^2 .

2.1.4.2. Kvalitativní stěr

Jestliže chceme vyloučit nebo potvrdit přítomnost některého druhu nebo skupiny mikroorganismů ve vzorku používáme stěr kvalitativní, v tomto případě není potřeba znát velikost vyšetřované plochy. Často se tímto způsobem vyšetřují špatně přístupná místa, jako jsou kohouty, ventily, rohy, spoje, atd. Provedení je stejné jako u kvantitativní metody, pouze se pro ohraničení vyšetřovaného místa nepoužívá šablona. Tampon se nejprve kultivuje v neselektivním či selektivním tekutém médiu a následně se provádí vyočkování na selektivně diagnostickou pevnou půdu.

2.1.5. Metoda seškrabu

Účinnější než stěrová metoda je metoda seškrabu, která se používá např. při hodnocení povrchové kontaminace drůbeže. Princip metody spočívá v přenesení mikroorganismů z vyšetřovaného povrchu pomocí sterilního skalpelu do živného prostředí. Podle účelu vyšetření lze seškrab opět provádět kvantitativně nebo kvalitativně.

Kvantitativní seškrab provádíme z přesně definované plochy, k jejímu ohraničení použijeme sterilní šablonu. Do sterilní zkumavky připravíme 10 ml sterilního ředícího roztoku, na vyšetřovanou plochu přiložíme šablonu a vymezený prostor seškrábneme sterilním skalpelem v několika směrech. Poté opatrně opláchneme čepel skalpelu v ředícím médiu ve zkumavce a zkumavku intenzivně protřepeme na třepačce, skalpel odložíme do desinfekčního roztoku. Tím máme připravenou výchozí suspenzi (10^{-1}), kterou můžeme dále obvyklým způsobem ředit. Výchozí suspenzi či zvolená ředění kultivujeme zalitím nebo roztěrem, živné médium a podmínky inkubace jsou závislé na druhu prokazovaných mikroorganismů. Po ukončení inkubace spočítáme narostlé kolonie a výsledek vyjádříme na vyšetřovanou plochu (např. 25 cm²).

2.1.6. Otisková metoda

Další metodou využitelnou při kvantitativním hodnocení mikrobiální kontaminace povrchů, zařízení či potravin je otisk. Princip metody spočívá v přenesení mikroorganismů z vyšetřovaného povrchu lehkým přitlačením přímo na povrch živného média. Optimální doba kontaktu živného média s vyšetřovaným povrchem je 10 sekund.

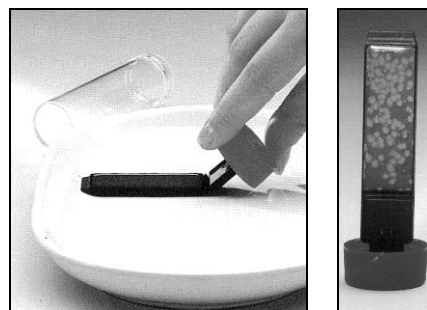
Pro otisk je živné médium nanášeno na speciální nosiče umožňující přímý kontakt celé plochy média s vyšetřovaným povrchem. Jednou z možností jsou tzv. kontaktní Petriho misky, ve kterých je živné médium nalito ve vrstvě převyšující hranu spodního dílu misky a překryto speciálně upravených víčkem. V praxi se často používají sklopné otiskové nosiče oboustranně pokryté živným médiem a uzavřené ve sterilních zkumavkách, jedná se např. o systém Hygicult®.

2.1.6.1. Sklopný otiskový nosič - Hygicult®

Hygicult® je sklopný nosič z umělé hmoty po obou stranách pokrytý agarovou živnou půdou a uzavřený ve sterilní plastové zkumavce. Jedna zkumavka umožňuje odběr a kultivaci dvou vzorků. Používá se pro mikrobiologickou kontrolu provozní hygieny, a to zejména v potravinářském průmyslu. Hygicultem lze rychle a spolehlivě testovat suroviny, výrobní zařízení i hotové výrobky.

Odběr vzorků a inokulace se provádí jedním z následujících způsobů:

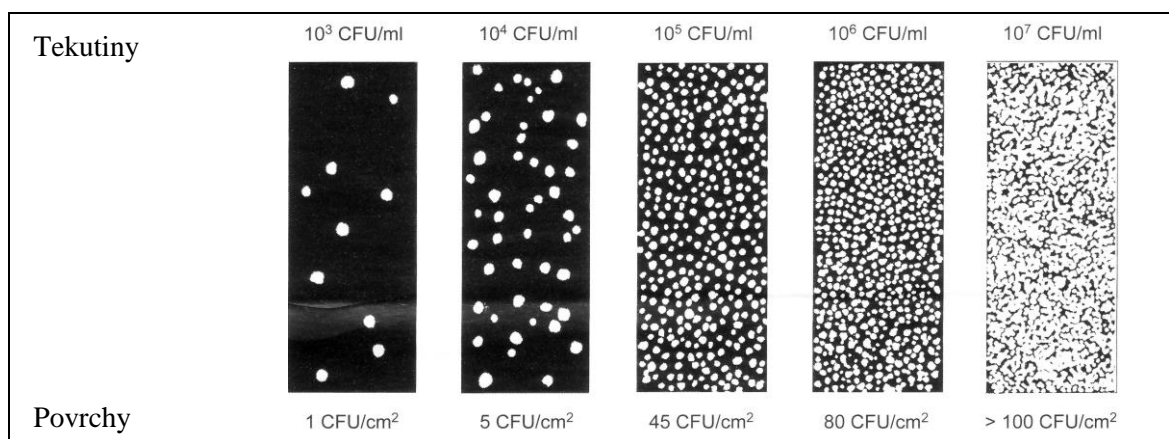
- přitlačením obou stran proužku na testovaný vzorek (povrchy a pevné vzorky),
- přenosem vzorků stěrovým tamponem, který se lehce otře o povrch agaru na proužku (těžko dostupná místa),
- několikasekundovým ponořením proužku do testované tekutiny.



Obr. 11: Hygicult®.

Po inkubaci (živné médium, délka a podmínky se odvíjí dle vyšetřovaného ukazatele) se výsledky získají buď přímo spočítáním kolonií narostlých na povrchu živného média (standardní rozměr 2 x 5 cm, tj. 10 cm²) nebo v případě masivnějšího nárůstu srovnáním

četnosti kolonií na agarovém proužku s četností kolonií na přiložené obrazové tabulce (viz obr. 12).



Obr. 12: Hygicult®TPC - šablona pro vyhodnocení.

TPC – CPM, tj. celkový počet mikroorganismů

Otiskové nosiče jsou určeny pro stanovení indikátorových mikroorganismů, např. celkový počet mikroorganismů, počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, koliformních bakterií, *E. coli* či počet kvasinek a plísní.

2.1.7. Metoda oplachu

Při mikrobiologickém vyšetření obtížně homogenizovatelných potravin (např. celé koření, sušené těstoviny) či některých typů obalů se používá metoda oplachu. Princip metody spočívá v přenesení mikroorganismů přítomných na povrchu vyšetřovaného vzorku opláchnutím do živného média. Uvolňování mikroorganismů z povrchu vzorku je podpořeno kontinuálním protřepáváním po dobu nejméně 10 minut.

Vzorek navážíme do vhodné sterilní nádoby a zalijeme desetinásobným množstvím sterilního ředícího roztoku (10 g vzorku + 100 ml fyziologického roztoku). Nádobu asepticky uzavřeme, umístíme na třepačku a třepeme při cca 300 rpm po dobu 10 – 20 minut (dle povahy vzorku). Tím máme připravenou výchozí suspenzi (10^{-1}), kterou můžeme dále obvyklým způsobem ředit. Výchozí suspenzi či zvolená ředění kultivujeme zalitím nebo roztěrem, živné médium a podmínky inkubace jsou závislé na druhu prokazovaných mikroorganismů. Po ukončení inkubace vyhodnotíme obvyklým způsobem a výsledek vyjádříme na 1 g vyšetřovaného vzorku.

2.1.8. Metoda výplachu

Výplach používáme při vyšetření uzavíratelných obalů, zejména různých druhů skleněných či plastových lahví, krabic atd., dále také při kontrole mikrobiální čistoty různých potrubních systémů, úchovných tanků či přepravek. Princip metody spočívá v přenesení mikroorganismů přítomných na vnitřní ploše obalu vypláchnutím do živného média.

Do vyšetřovaného obalu asepticky odměříme vhodné množství sterilního ředícího roztoku, abychom zlepšili smáčitelnost vyšetřovaného povrchu, přidáváme do ředícího roztoku několik kapek Tweenu 80. Použité množství ředícího roztoku závisí na velikosti vyšetřovaného obalu, při objemu do 1 l použijeme k výplachu 10 ml ředícího média. Obal uzavřeme a krouživým pohybem postupně smočíme celou vnitřní plochu. Necháme asi minutu odstát a poté celý postup několikrát zopakujeme (celková doba cca 10 minut). Po

ukončení výplachu výplachový roztok slijeme do sterilní nádoby či zkumavky a můžeme jej dále obvyklým způsobem ředit. Výplachový roztok či zvolená ředění kultivujeme zalitím nebo roztěrem, živné médium a podmínky inkubace jsou závislé na druhu prokazovaných mikroorganismů. Po ukončení inkubace spočítáme narostlé kolonie a výsledek přepočítáme na původní množství výplachového roztoku.

Při hodnocení mikrobiální čistoty technologických systémů a přepravních obalů lze k vyšetření využít přímo vodu použitou k poslednímu výplachu po ukončení čištění a desinfekce. Pro zhodnocení výsledků je nutno znát množství vzorkované tekutiny. Její celkový objem se proto po odebrání vzorku odměří vhodným způsobem.

Příklad 15:

Výplachová tekutina – objem 10 ml, neředěno, 2 počítatelné misky, metoda zalití:

$$N = \frac{68 + 74}{2} = \frac{142}{2} = 71 \text{ v } 1 \text{ ml}$$

Hodnotu převedeme na celkový objem výplachové tekutiny: $71 \cdot 10 = 710 = 7,1 \cdot 10^2$

Výsledek vyjádříme ve tvaru $7,1 \cdot 10^2$ KTJ/10 ml výplachového roztoku.

2.1.9. Metoda spadu

Nezbytnou součástí hodnocení mikrobiologické čistoty prostředí výrobních podniků či laboratorí je vyšetření ovzduší. Nejčastěji je stanovován celkový počet mikroorganismů, v odůvodněných případech lze vyšetření zaměřit také na stanovení počtu kvasinek a plísní.

K objektivnímu vyšetření ovzduší lze použít aeroskop, přístroj umožňující vyšetřit přesně definovaný objem vzduchu. Ten je přístrojem aktivně nasáván odběrovou hlavicí, ve které je umístěna Petriho miska s živnou půdou. Po ukončení expozice se Petriho miska vyjme a nechá inkubovat.



Při provozní kontrole čistoty ovzduší se běžně používá metoda spadu. Princip metody spočívá v pasivním přenesení mikroorganismů přítomných v ovzduší spadem na povrch živného média v Petriho misce.

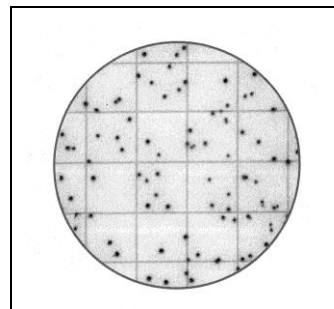
Obr. 13: Aeroskop.

Otevřenou Petriho misku naplněnou živným médiem umístíme na klidném bezprašném místě a necháme exponovat nejméně po dobu 10 minut. Po ukončení expozice misku uzavřeme a inkubujeme, podmínky inkubace (teplota, doba) jsou závislé na druhu prokazovaných mikroorganismů. Následně spočítáme počet kolonií narostlých na celé ploše Petriho misky, který vydělíme dobou expozice v minutách. O dobré mikrobiální čistotě ovzduší svědčí hodnota maximálně 10 KTJ/Petriho miska/10 minut expozice, tj. 1 KTJ za 1 minutu.

2.1.10. Kultivační destičky Petrifilm™

Petrifilmy jsou počítačové destičky s kultivačním médiem připraveným pro inokulaci vzorku. Použití nachází při stanovení počtu různých druhů a skupin mikroorganismů a pro detekci mikrobiální kontaminace prostředí. U řady Petrifilm™ systémů již byla provedena příslušná validace a jsou proto rovnocennou náhradou klasickému kultivačnímu vyšetření.

Při stanovení počtu mikroorganismů se zkoušený vzorek naředí 1:10 a homogenizuje. Poté se sterilní pipetou napipetuje 1 ml takto upraveného vzorku do středu destičky. Vrchní film se opatrně roluje tak, aby se zabránilo zachycení vzduchových bublin. Následně se vzorek roztlačovačem rovnoměrně rozprostře po celé kruhové ploše destičky. Destičky Petrifilm™ se inkubují vrchní stranou nahoru ve sloupcích po max. 20 kusech, podmínky inkubace se liší podle metodiky stanovení. Po ukončení inkubace se spočítají charakteristické kolonie, které mohou být dále izolovány pro další identifikaci.



Obr. 14: Petrifilm™.

V případě Petrifilmů používaných pro testování hygieny prostředí se nejprve provede hydratace destiček přidáním 1 ml vhodného sterilizovaného rozpouštědla (např. fyziologický roztok), které se roztlačí po celém povrchu destičky. Takto připravené destičky lze použít pro metodu otiskovou, stěrovou či hodnocení spadu z ovzduší.

Destičky Petrifilm™ jsou určeny např. pro stanovení celkového počtu mikroorganismů, počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, koliformních bakterií a *E. coli*, dále pro stanovení počtu *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp. či počtu kvasinek a plísní.

2.2. Mikroskopické metody stanovení počtu mikroorganismů

Mikroskopické metody stanovení počtu mikroorganismů jsou založeny jednak na **přímém mikroskopickém počítání buněk** v počítacích komůrkách nebo ve fixovaném a obarveném nátěru na podložním skle. V potravinářství mají tyto metody význam zejména při hodnocení kvality čistých mlékařských kultur (viz kapitola 5.2.) či posuzování množství živých a mrtvých buněk kvasinek = tzv. vitální barvení, které se využívá např. při kontrole kvality násady při výrobě piva či kontrole kvality droždí. Dále se využívají metody založené na principu **fluorescenční mikroskopie** (např. při rutinním stanovení celkového počtu mikroorganismů v syrovém mléce).

2.2.1. Vitální barvení kvasinek

Metoda je založena na barvení kvasinek methylenovou modří ve vhodném pufru (fosfátový pufr pH 4,6). Barvivem se obarví pouze mrtvé buňky, u kterých je po smrti zvýšená propustnost cytoplazmatické membrány. Živé buňky zůstávají neobarvené. Protože je použité barvivo mírně toxické, je nezbytné obarvené buňky ihned pozorovat pod mikroskopem.

Na podložní sklíčko nanese malou kapku suspenze kvasinek, přikápneme malou kapku slabého roztoku methylenové modří, opatrně přikryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme při zvětšení 100x – 500x. V nejméně 10 zorných polích spočítáme počet mrtvých (obarvených) a živých (neobarvených) buněk. Pro každé zorné pole spočítáme podíl mrtvých buněk v procentech a následně průměrný podíl mrtvých buněk ve vzorku včetně směrodatné odchylky.

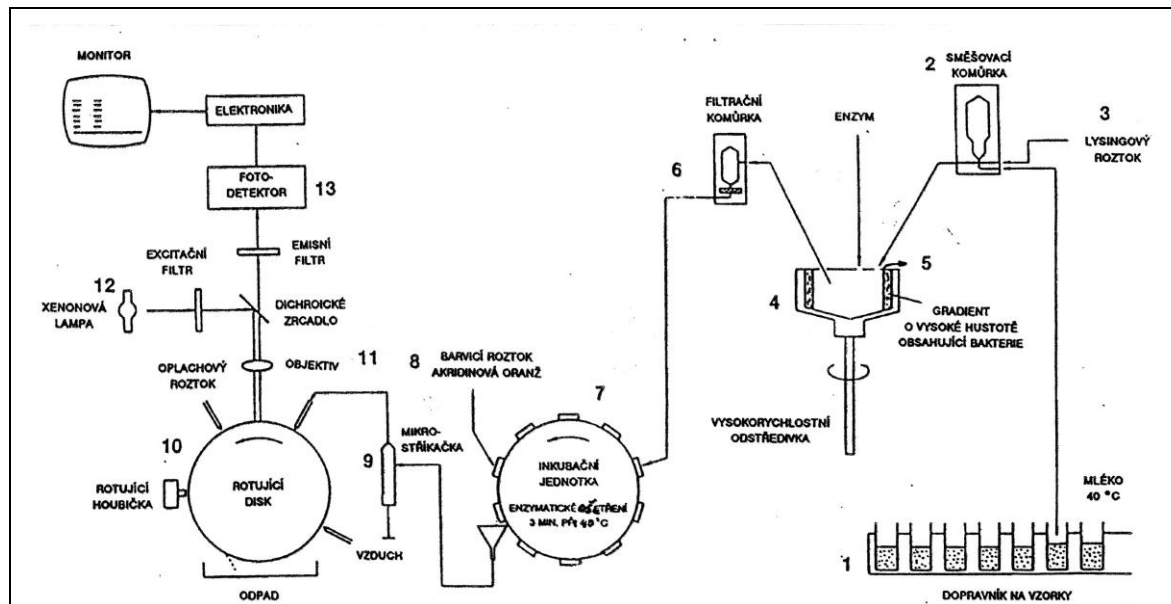
Při mikrobiologické kontrole várečných kvasnic je doporučeno použít k barvení alkalický roztok methylenové modří (pH 9,5 – 10,5). K počítání lze využít i Bürkerovu komůrku. Násadní kvasnice by měly obsahovat maximálně 5 % mrtvých buněk.

2.2.2. Přímá epifluorescenční filtrační metoda

Metoda je založena na membránové filtraci, fluorescenčním barvení buněk a epifluorescenční mikroskopii. Jedná se o metodu využitelnou k rychlému stanovení počtu mikroorganismů v syrovém mléce (použitelná pro vzorky s obsahem $10^4 - 10^7$ bakterií v ml). Pomocí trypsinu a vhodného tenzidu (Triton X-100) dojde k eliminaci somatických buněk a tukových částic tak, aby byl vzorek filtrovatelný. Upravený vzorek je filtrován přes polykarbonátový membránový filtr ($0,6 \mu\text{m}$), tím dochází ke koncentraci bakteriálních buněk na jeho povrchu. Po obarvení akridinovou oranží fluoreskují bakterie při osvitu modrým světlem a jsou tak lehce počítatelné v epifluorescenčním mikroskopu.

2.2.3. Automatická metoda přímého počítání bakterií - BactoScan

Úplnou automatizaci fluorescenční metody představuje systém BactoScan, který je využíván při stanovení celkového počtu mikroorganismů v syrovém mléce. V první fázi dochází k úpravě vzorku, tj. k chemickému rozpuštění somatických buněk a kaseinových micel, bakterie jsou následně separovány odstředěním v gradientu tvořeném roztokem dextranu a cukrózy. Bakterie jsou následně inkubovány s enzymem proteázou (odstranění zbytkových proteinů) a obarveny akridinovou oranží (vazba na DNA). Takto upravený vzorek je nanesen v tenkém filmu na povrch rotujícího disku, který prochází pod epifluorescenčním mikroskopem. Po osvitu xenonovou lampou jsou impulsy fluoreskujících buněk registrovány a elektronicky vyhodnocovány. Přístroj registruje jednotlivé buňky individuálně a proto jsou získané počty vyšší ve srovnání s klasickou plotnovou metodou.



Obr. 15: Schéma BactoScanu 8000.

Analýza jednoho vzorku trvá přibližně 7 minut, rozsah spolehlivosti stanovení je udáván mezi $5 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^6$. Korelace mezi referenční plotnovou metodou a BactoScanem je výrobcem stanovena na 0,8 – 0,9.

2.3. Nepřímé metody stanovení počtu mikroorganismů

Nepřímé metody umožňují stanovit určitou složku, enzym, metabolit nebo změny prostředí způsobené růstem mikroorganismů. Z kalibračních křivek lze následně odečíst počet mikroorganismů.

2.3.1. Metody založené na redukci barviv

Testy na principu redukce barviv využívají schopnosti bakterií produkovat dehydrogenázy, které přenosem vodíku ze substrátu na barvivo mění jeho barvu. Míra redukce barviva za zvolený časový interval záleží na aktivitě enzymu a slouží pro orientační stanovení počtu mikroorganismů ve vzorku. Nejčastěji se používá methylenová modř a resazurin. Výhodou těchto metod je jejich jednoduchost a nenáročné provedení. Nevýhodou může být různá redukční aktivita bakterií zastoupených ve vzorku, snížení metabolické aktivity bakterií v přítomnosti reziduí inhibičních látek (např. u syrového mléka) či naopak rychlejší redukce barviva v přítomnosti vyššího počtu somatických buněk.

Resazurinová zkouška: Účinkem oxidoredukčních enzymů dochází k postupné redukci modrého resazurinu přes červenorůžový rezorufin na bezbarvý dihydrorezorufin. K 10 ml vzorku přidáme 1 ml 0,01% resazurinátu sodného a necháme inkubovat při 37 °C, po 60, resp. 120 minutách kultivace hodnotíme vzniklé zbarvení. O dobré kvalitě svědčí nezměněná barva mléka s resazurinátem.

Dehydrogenázová (reduktázová) zkouška: Principem testu je postupné odbarvování methylenové modři na bezbarvou leukobázi, doba odbarvení je přímo úměrná aktivitě enzymů, tj. počtu mikroorganismů ve vzorku. K 10 ml syrového mléka přidáme 0,25 ml methylenové modři a inkubujeme při 37 °C až do odbarvení vzorku. K odbarvení mléka nejvyšší jakosti (do 10^5 mikroorganismů v ml) dochází za více než 5 hodin.

2.3.2. Elektrické metody (impedanční měření)

Metabolická činnost a růst mikroorganismů má za následek změny v chemickém složení živného média, postupně dochází k poklesu impedance prostředí a vzrůstu jeho vodivosti. Proto se během kultivace sleduje průchod slabého elektrického proudu tekutou živnou půdou zaočkovanou vzorkem. Zjistitelná změna vodivosti se objeví, dosáhne-li koncentrace bakteriálních buněk 10^6 v ml. Z doby, za kterou se toho dosáhne, se pomocí kalibrační křivky odečte počáteční koncentrace mikroorganismů. Metoda může být zaměřena jak na měření vodivosti tak impedance. Doba stanovení je řádově několik hodin v závislosti na stupni kontaminace vzorku. Měření je ovlivněno řadou faktorů – druh mikroorganismu, složení kultivačního média, teplota kultivace, počáteční koncentrace buněk. Impedanční metoda je vhodná ke screeningu velkých sérií vzorků, její automatizované provedení se používá např. ke stanovení celkového počtu mikroorganismů u syrového mléka.

2.3.3. Metody založené na průkazu metabolitů

V mikrobiologii lze použít řadu nepřímých metod stanovení počtu mikroorganismů, které jsou založeny na průkazu metabolitů vznikajících metabolickou činností mikroorganismů. Tyto metody jsou založeny např. na stanovení pyruvátu, který je hlavním meziproduktem metabolismu bakterií, dále je to tzv. Limulus test používaný pro stanovení

gramnegativních bakterií, radiometrická stanovení nebo metody využívající různé druhy biosenzorů. V mikrobiologii potravin mezi nejpoužívanější patří metoda bioluminiscenční.

2.3.3.1. *Limulus test*

Jedná se o kolorimetrické stanovení bakteriálního endotoxinu, které se využívá při stanovení počtu gramnegativních bakterií. Bakteriální endotoxin (lipopolysacharid, somatický O-antigen) je součástí buněčné stěny gramnegativních bakterií a je uvolňován do okolního prostředí po smrti a lýze bakteriální buňky. Principem testu je koagulace lyzátu amoebocytů členovce *Limulus polyphenus* v přítomnosti bakteriálních endotoxinů. Limulus test je velmi specifický a citlivý, detekční limit je $5 \cdot 10^2$ buněk v ml. Pozitivní reakce se projeví tvorbou gelu nebo vloček po hodinové kultivaci při 37 °C, vlastní vyhodnocení je kolorimetrické s chromogenním činidlem příp. turbidimetrické. Jedná se o rychlou metodu využitelnou pro stanovení koliformních bakterií v syrovém mléce, mletém mase, uzeninách atd.

2.3.3.2. *Radiometrie – stanovení $^{14}\text{CO}_2$*

Radiometrické metody jsou obvykle založeny na principu měření množství $^{14}\text{CO}_2$ uvolněného metabolickou činností bakterií využívajících živiny s obsahem značeného uhlíku ^{14}C (glukóza). Doba potřebná k tvorbě plynu je nepřímo úměrná počtu mikroorganismů ve vzorku (nejčastěji 4 – 6 hodin), detekční limit je 10^4 mikroorganismů. Automatizací metody je např. přístroj Bactec. V potravinářství se tyto metody používají nejčastěji při rozboru mražených potravin a potravinových surovin.

2.3.3.3. *ATP bioluminiscenční metoda*

Princip metody je založen na reakci ATP a luciferinu, který je za přítomnosti kyslíku a hořčnatých iontů oxidován na oxyluciferin, přičemž dochází k emisi bioluminiscenčního záření. Reakce je katalyzována enzymem luciferázou. Množství emitovaného světla je přímo úměrné koncentraci ATP, které se běžně vyskytuje ve všech buňkách včetně bakterií, kvasinek a plísní.

Luciferin a luciferáza se v přírodě vyskytují u světlušek, podle nich byly tyto látky nazvány. Množství ATP obsažené v eukaryotických buňkách živočichů, rostlin nebo kvasinek a plísní je cca 10 – 12 g v jedné buňce. Bakteriální buňka obsahuje v porovnání s buňkou eukaryotickou pouze asi tisícinu množství ATP. Obsah ATP v buňce není stálý, je ovlivňován např. strukturou buňky, stádiem růstu a růstovou teplotou.

Bioluminiscenční testy lze použít dvojím způsobem – k přímé analýze potravin a k hodnocení čistoty povrchů potravinářských podniků a provozoven. Hlavním problémem při hodnocení mikrobiální kontaminace potravin a surovin je úprava vzorku pomocí speciálních extrakčních činidel tak, aby došlo k odlišení mikrobiálního ATP od ATP jiného původu (volné ATP, ATP ze somatických buněk). Metoda je využitelná např. ke stanovení celkového počtu mikroorganismů v syrovém mléce, mletém mase či ke kontrole nápojů.

Nejběžnější aplikací je využití této metody při hodnocení čistoty potravinářských provozů, povrchů v supermarketech, v restauracích, při kontrole stájové hygieny, atd. Při luminometrii se vzorek odebírá pomocí stěrového tampónu obvykle z plochy $10 \times 10 \text{ cm}^2$. Vatová část tampónu se přenesení do reagenční části zkumavky, kde jsou činidla nezbytná k proběhnutí reakce. Intenzita emitovaného záření je měřena pomocí přenosného luminometru, výsledky jsou vyjádřeny jako relativní jednotky záření (RLU, angl. *Relative Light Units*). Pomocí speciálních odběrových spirálek lze testovat i tekuté vzorky (např. výplachová tekutina).

2.4. Praktické rady pro provedení kvantitativního vyšetření

Na rozdíl od kvalitativního vyšetření se při provádění kvantitativního vyšetření často setkáváme s určitými obtížemi. Nejprve je nezbytné zvolit vhodné ředění vzorku, a to tak, abychom v optimálním případě získali počítatelné misky ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Na závěr potom vybrat a spočítat charakteristické kolonie sledovaného mikroorganismu a zvolit do výpočtu pouze ty Petriho misky, které nám umožní objektivní zhodnocení míry mikrobiální kontaminace vyšetřovaného vzorku. Touto kapitolou bychom vám chtěli demonstrovat možné cesty k dosažení výsledku.

2.4.1. Volba ředění - porovnání s limitní hodnotou

Při volbě ředění musíme vždy zohlednit sledovaný ukazatel, výši limitu, použitou metodu inokulace vzorku a kritéria pro výběr počítatelných misek. Ředění zvolíme tak, abychom byli schopni posoudit zda vzorek splňuje či překračuje danou limitní hodnotu.

Příklad 16:

Limitní hodnota celkového počtu mikroorganismů pro syrové kravské mléko je platnou legislativou stanovena na 10^5 KTJ/ml. CPM stanovujeme metodou zalití 1 ml, jako nepočítatelné hodnotíme misky s více než 300 KTJ.

V tomto případě budeme vyšetřovat ředění vzorku 10^{-3} a 10^{-4} .

Zdůvodnění: 10^5 (legislativní limit pro daný ukazatel) - 10^2 (řádově maximální přípustný počet KTJ na misce) = $10^3 \rightarrow$ **ředění 10^{-3} a následující.**

Jestliže na miskách v obou ředěních bude > 300 KTJ, odhadneme počet na $> 3,0 \cdot 10^6$ KTJ/ml. Je tedy jednoznačné, že CPM je vyšší než daná limitní hodnota a vzorek nevyhovuje.

Jestliže na miskách v obou ředěních nenarostou žádné kolonie, odhadneme počet na $< 1,0 \cdot 10^3$ KTJ/ml. Je tedy jednoznačné, že CPM je nižší než daná limitní hodnota a vzorek vyhovuje.

Ve všech ostatních případech jsme schopni spočítat konkrétní hodnotu CPM a následně ji porovnat s limitní hodnotou.

Zapamatujte si: - *neselektivní půda počítáme do 300 KTJ/Petriho miska*
- *selektivní půda počítáme do 150 KTJ/Petriho miska*

Příklad 17:

Limitní hodnota koagulázopozitivních stafylokoků pro sýry vyrobené ze syrového kravského mléka je platnou legislativou stanovena na 10^4 KTJ/g. Koagulázopozitivní stafylokoky obvykle stanovujeme metodou roztěru 0,2 ml, jako nepočítatelné hodnotíme misky s více než 150 KTJ.

V tomto případě budeme vyšetřovat ředění vzorku 10^{-1} a 10^{-2} .

Zdůvodnění: 10^4 (legislativní limit pro daný ukazatel) - 10^2 (řádově maximální přípustný počet KTJ na misce) = $10^2 \rightarrow$ **ředění 10^{-3} a předcházející** (protože vyšetřujeme 0,2 ml násobíme při výpočtu počet kolonií hodnotou $[1/0,2]$ tj. 5, takže v řadě případů dojde k navýšení výsledného počtu o jeden logaritmický řád).

Jestliže na miskách v obou ředěních bude >150 KTJ, odhadneme počet na $> 7,5 \cdot 10^4$ KTJ/g. Je tedy jednoznačné, že stanovená hodnota koagulázopozitivních stafylokoků je vyšší než daná limitní hodnota a vzorek nevyhovuje.

Jestliže na miskách v obou ředěních nenarostou žádné kolonie, odhadneme počet na $< 5,0 \cdot 10^1$ KTJ/g. Je tedy jednoznačné, že stanovená hodnota koagulázopozitivních stafylokoků je nižší než daná limitní hodnota a vzorek vyhovuje.

Ve všech ostatních případech jsme schopni spočítat konkrétní hodnotu a následně ji porovnat s hodnotou limitní.

2.4.2. Volba ředění - hodnocení mikrobiální kontaminace

Jestliže stanovujeme mikrobiologický ukazatel, pro který nemáme k dispozici limitní hodnotu k porovnání nebo potřebujeme stanovit konkrétní míru kontaminace potravin sledovanými mikroorganismy, snažíme se zvolit ředění tak, abychom alespoň v jednom ředění měli počítatelné misky použitelné pro výpočet. Při volbě ředění využijeme znalosti o obvyklé kontaminaci daného či příbuzného typu potravin sledovanými mikroorganismy – tato hodnota nám nahradí hodnotu limitní. Vlastní výběr ředění provedeme výše popsáním způsobem (viz kapitola 2.4.1.).

Pokud nemáme k dispozici údaje o obvyklé kontaminaci vzorku, použijeme při prvním vyšetření širší škálu ředění, můžeme i některá ředění přeskočit (např. 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5}). Tím si zajistíme, že alespoň v jednom ředění získáme počítatelné misky. U následujících vzorků pak použijeme pro výběr ředění výsledky z prvního vyšetření.

2.4.3. Hodnocení a interpretace nestandardních výsledků

Při rutinním vyšetřování vzorků potravin se často sekáváme s tím, že výsledky kultivačního vyšetření nejsou vždy optimální a stojíme před problémem, jak tyto výsledky správně vyhodnotit. Norma sice udává správný teoretický postup vyhodnocení, v praxi ale musíme používat „selský“ rozum a před každým vyhodnocením logicky zhodnotit, zda dosažené výsledky budou mít dostatečnou výpovědní hodnotu.

V této kapitole uvádíme několik nejčastějších případů „nestandardních“ výsledků kultivačního vyšetření a postup správného způsobu jejich vyhodnocení. Zapamatujte si, že **do laboratorního protokolu musíme vždy uvést odůvodnění všech změn či úprav** standardního schématu vyhodnocení. Kdokoli bude v budoucnu protokol číst, musí mít možnost sledovat naši úvahu a případně posoudit, zda jsme výsledek vyhodnotili správně.

Příklad 18:

Při stanovení CPM u syrového mléka byly získány následující výsledky:

- ředění 10^{-3} 89 a 97 KTJ
- ředění 10^{-4} 37 a 68 KTJ

Na první pohled je zřejmé, že výsledky zjištěné v ředění 10^{-4} jsou chybné (**při správně provedeném ředění by mělo obvykle dojít ke snížení počtu kolonií o 1 logaritmický řád**). Výsledky ředění 10^{-4} tedy do výpočtu vůbec nezahrneme a výpočet provedeme pouze z hodnot zjištěných v ředění 10^{-3} . Do protokolu zdůvodníme, proč jsme pro výpočet použili pouze některé hodnoty. Máme-li k dispozici původní vzorek je vhodné vyšetření zopakovat.

Důvody nestandardního výsledku: mohlo se jednat např. o nesprávný postup ředění vzorku či inokulace ředění 10^{-3} i do misek označených jako ředění 10^{-4} .

Příklad 19:

Při stanovení CPM u syrového mléka byly získány následující výsledky:

- ředění 10^{-3} 89 a 97 KTJ
- ředění 10^{-4} 137 a 168 KTJ

Opět je na první pohled zřejmé, že výsledky zjištěné v ředění 10^{-4} jsou chybné (při správně provedeném ředění by mělo dojít ke snížení počtu kolonií o 1 logaritmický řád, nikoli k jeho zvýšení). Výsledky ředění 10^{-4} tedy do výpočtu vůbec nezahrneme a výpočet provedeme pouze z hodnot zjištěných v ředění 10^{-3} . Do protokolu zdůvodníme, proč jsme pro výpočet použili pouze některé hodnoty. Máme-li k dispozici původní vzorek je vhodné vyšetření zopakovat.

Důvody nestandardního výsledku: mohlo se jednat např. o záměnu jednotlivých ředění vzorků či inokulaci správných ředění do špatně označených Petriho misek.

Příklad 20:

Při stanovení enterokoků u sušeného mléka byly získány následující výsledky:

- ředění 10^{-1} 89 a 97 KTJ
- ředění 10^{-2} 35 a 9 KTJ

V tomto případě vyloučíme z výpočtu hodnotu 35 KTJ zjištěnou v ředění 10^{-2} (opět neodpovídá požadavku na snížení počtu kolonií o 1 logaritmický řád). Do protokolu zdůvodníme, proč jsme pro výpočet použili pouze některé hodnoty. Chyba mohla nastat např. použitím stejné špičky pro nanesení obou ředění.

Příklad 21:

Při stanovení enterokoků u sušeného mléka byly získány následující výsledky:

- ředění 10^{-1} 89 a >150 KTJ
- ředění 10^{-2} 7 a 9 KTJ

V tomto případě zahrneme do výpočtu z ředění 10^{-1} pouze hodnotu 89 KTJ. Chyba mohla být nejspíš způsobena kontaminací druhé misky při inokulaci vzorku.

Příklad 22:

Při stanovení *Bacillus cereus* ve vzorku těstovin mléka byly získány následující výsledky:

- ředění 10^{-1} 123 a 150 KTJ
- ředění 10^{-2} 45 a 8 KTJ

V tomto případě vyloučíme z výpočtu hodnotu 8 KTJ zjištěnou v ředění 10^{-2} (došlo k poklesu počtu o 2 logaritmické řády). Uvedená skutečnost mohla být způsobena např. špatně provedeným roztěrem inokula (vznik spojených shluků kolonií, které odečítáme jako celek), nanesením menšího objemu inokula na uvedenou misku či neprovedením homogenizace (promíchání) výchozí suspenze před pipetováním inokula.

Příklad 23:

Při stanovení koliformních bakterií u syrového mléka byly získány následující výsledky:

- ředění 10^{-2} 83 a 45 KTJ
- ředění 10^{-3} 0 a 1 KTJ

V tomto případě použijeme pro výpočet pouze hodnoty zjištěné v ředění 10^{-2} .

Na závěr si zapamatujte jednoduchý způsob ověření správnosti dosažených výsledků:

- metoda zalití 1 ml
- ředění 10^{-2} 123 a 149 KTJ
- ředění 10^{-3} 30 a 51 KTJ

Použijeme-li k výpočtu hodnoty z ředění 10^{-2} potom získáme výsledek řádově 10^4 , z hodnot v ředění 10^{-3} získáme opět výsledek řádově 10^4 , je tedy zřejmé, že ředění vzorku proběhlo správně a do výpočtu můžeme zahrnout všechny misky.

Pokud nejsou dílčí výsledky z jednotlivých ředění řádově odpovídající, je potřeba rozhodnout, které misky do výpočtu zařadit a které nikoli. V případě velkého rozdílu je samozřejmě vhodné vyšetření zopakovat.

3. Stanovení indikátorových mikroorganismů

V zemědělské prvovýrobě i v potravinářském průmyslu má při mikrobiologickém hodnocení surovin, potravin, obalů i výrobních prostor a zařízení velký význam stanovení indikátorových mikroorganismů, které nám poskytuje další důležité informace o mikrobiální kvalitě testovaných vzorků. Jedná se především o údaje o možné fekální kontaminaci potravin či údaje poukazující na úroveň hygieny a sanitace v potravinářském provozu. Průkaz indikátorových mikroorganismů v potravinách může ukazovat na jejich sekundární kontaminaci nebo na nedostatky v technologii výroby potravin.

Indikátorové mikroorganismy můžeme obecně rozdělit do dvou skupin. Počty mikroorganismů první skupiny nás informují o primární a sekundární kontaminaci surovin, potravin a výrobních ploch, dodržování technologických postupů a principů správné výrobní praxe (GMP, angl. *Good Manufacturing Practice*). Do této skupiny řadíme:

- celkový počet mikroorganismů,
- počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*,
- počet koliformních bakterií,
- počet *Escherichia coli*,
- počet enterokoků,
- počet psychrotrofních bakterií,
- počet termorezistentních bakterií,
- počet termofilních bakterií.

Ve druhé skupině se nacházejí mikroorganismy, jejichž počty nás informují zejména o kažení potravin:

- počet kvasinek a plísní,
- počet aerobních sporotvorných bakterií,
- počet anaerobních sporotvorných bakterií,
- počet proteolytických a lipolytických bakterií,
- bakterie rodu *Proteus*.

V některých případech se stanovují i tzv. indexové mikroorganismy, tedy mikroorganismy které nás informují o možné přítomnosti patogenních bakterií. Např. při vyšetření pitné vody plní tuto funkci termotolerantní koliformní bakterie a fekální *Escherichia coli*.

3.1. Stanovení celkového počtu mikroorganismů

V mikrobiologii potravin pod pojmem celkový počet mikroorganismů (CPM) rozumíme stanovení počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů (bakterie, kvasinky a plísně), které rostou v neselektivních nutričně bohatých médiích nebo tvoří kolonie na nutričně bohatých agarových půdách za aerobních podmínek během inkubace při 30 °C po dobu 72 hodin. Výsledkem je stanovení počtu KTJ – kolonie tvořících jednotek, v 1 ml (g) vyšetřovaného výrobku, přičemž 1 kolonie může být tvořena i desítkami buněk.

V potravinářských výrobcích a surovinách mají obvykle v úhrnu všech mikroorganismů kvantitativní převahu mikroorganismy mezofilní, tvořící kolonie na základních živných půdách při aerobní kultivaci. Tato rozsáhlá skupina se nejvíce přibližuje absolutnímu celkovému počtu a nejlépe vystihuje stupeň znečištění daného vzorku. Při tomto rozboru zůstávají nestanoveny termofilní mikroorganismy, část psychrofilních, přísně anaerobní mikroorganismy, dále kultivačně náročné druhy vyžadující růstové faktory, část plísní, kvasinek a

některé další méně důležité skupiny. Rovněž chybí informace o druhovém složení mikroflóry a jejich technologických a hygienických vlastnostech.

Stanovení CPM má význam jako základní informace o stupni mikrobiální kontaminace a rekontaminace surovin, hotových výrobků a prostředí provozoven. Z jeho výsledků lze usuzovat na dodržení technologických postupů a hygienických směrnic při výrobě, přepravě a uskladnění výrobků i surovin. Nemá však význam pro kontrolu potravin, při jejichž výrobě byly použity kulturní mikroorganismy.

V mikrobiologické praxi se ke stanovení CPM používají dvě metody, a to plotnová metoda a stanovení v tekuté půdě – metoda MPN. Mimo to se např. v mlékařství rutinně používají i moderní přístrojové metody stanovení (např. BactoScan).

3.1.1. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C - plotnová metoda

Tato metoda je vhodná pro vyšetření vzorků, u kterých předpokládáme více než 300 KTJ v 1 g nebo 30 KTJ v 1 ml vzorku.

3.1.1.1. Princip metody

Určený objem tekutého vzorku, výchozí suspenze u ostatních vzorků a jejich desetinasobných ředění se zalévá agarovou živnou půdou v Petriho miskách. Jako arbitrážní půda je určen **agar s glukózou, tryptonem a kvasničným extraktem** (GTK agar). Inokulované plotny se inkubují aerobně při 30 °C po dobu 72 hodin. Stanoví se celkový počet mikroorganismů v 1 ml nebo 1 g vzorku z počtu kolonií vyrostlých na vybraných plotnách.

3.1.1.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění a tolik dalších desetinasobných ředění, aby bylo možno stanovit předpokládaný počet mikroorganismů.
- Tekutý vzorek či výchozí suspenzi ostatních vzorků a jejich desetinasobná ředění očkujeme vždy jinou sterilní pipetou po 1 ml souběžně do dvou sterilních řádně označených Petriho misek.
- Inokulum v každé Petriho misce přelijeme asi 15 ml GTK agaru vytemperovaného na teplotu 45 ± 2 °C, důkladně krouživým pohybem promícháme a necháme utuhnout na chladné vodorovné ploše. Předpokládáme-li přítomnost mikroorganismů vytvářejících povlaky, přelijeme po utužení agar na misce asi 5 ml téže půdy (již nemícháme, pouze převrstvíme!). Doba mezi ukončením přípravy výchozí suspenze a okamžikem, kdy se inokulum přelévá půdou, nesmí překročit 15 minut.
- Po ztuhnutí agarové půdy Petriho misky obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin. Petriho misky lze ukládat na sebe, nicméně sloupce nemají být vyšší než 6 ploten, mají být od sebe navzájem odděleny a nesmí se dotýkat stěn a stropu termostatu.

3.1.1.3. Hodnocení výsledků

Po ukončení inkubace spočítáme kolonie narostlé na každé misce, a to bez ohledu na jejich velikost, barvu či tvar. Pro výpočet CPM použijeme misky obsahující 10 – 300 kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Celkový počet mikroorganismů vyjádříme jako počet KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku.

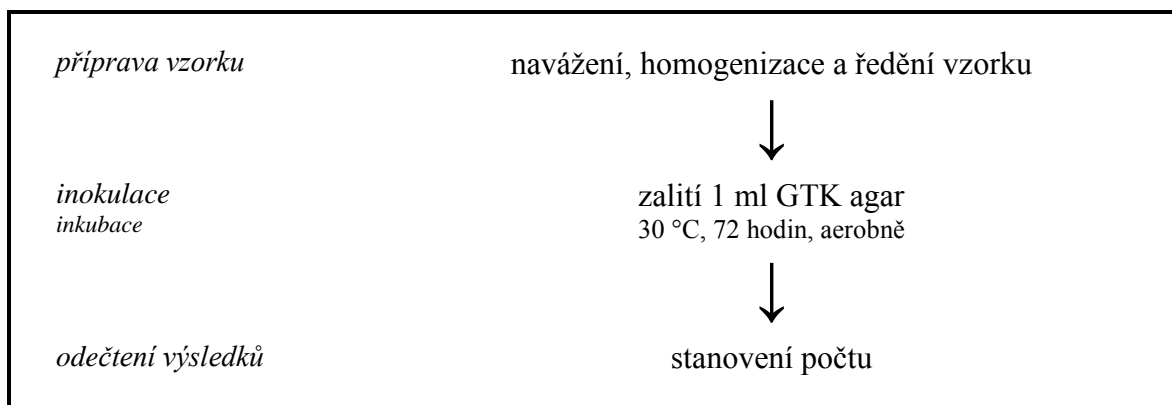


Schéma 1: Stanovení celkového počtu mikroorganismů v potravinách.

3.1.2. Technika nejvýše pravděpodobného počtu - metoda MPN

Tato metoda je určena pro vyšetření vzorků obsahujících méně než 300 bakterií v 1 g nebo 30 bakterií v 1 ml vzorku. S ohledem na malou přesnost této metody je vhodnější filtrovatelné vzorky s nízkým obsahem mikroorganismů vyšetřovat membránovou filtrací.

3.1.2.1. Princip metody

Určený objem tekutého vzorku, výchozí suspenze u ostatních vzorků a jejich desetinásobných ředění se očkuje do tekuté živné půdy ve zkumavkách. Jako arbitrážní půda se používá **bujón s glukózou, tryptonem a kvasničným extraktem** (GTK bujón). Po přidavku inokula se zkumavky inkubují aerobně při 30 °C po dobu 48 hodin. Ze zkumavek s pozitivní reakcí ve třech po sobě jdoucích ředěních se sestaví trojčíselný kód pomocí něhož se stanoví pravděpodobný počet mikroorganismů v 1 ml nebo 1 g vzorku.

3.1.2.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění a tolik dalších desetinásobných ředění, aby bylo možno stanovit předpokládaný počet mikroorganismů.
- Množství inokulovaného vzorku či jeho ředění závisí na předpokládaném počtu mikroorganismů (detailní popis viz kapitola 2.1.1.).
- Vzorek a jeho ředění očkujeme vždy jinou sterilní pipetou souběžně do tří řádně označených zkumavek obsahujících GTK bujón.
- Zkumavky inkubujeme aerobně v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin.

3.1.2.3. Hodnocení výsledků

Po ukončení inkubace spočítáme počet pozitivních zkumavek v každém ředění očkované série. Za pozitivní jsou považovány zkumavky se zřetelným projevem růstu, tj. zákal, sediment, povrchová blanka nebo kombinace těchto projevů. Podle počtu pozitivních zkumavek ve třech po sobě jdoucích ředěních sestavíme trojčíselný kód a pomocí něho odečteme v tabulce hodnotu MPN (viz kapitola 2.1.1.).

3.2. Stanovení baktérií čeledi *Enterobacteriaceae*

Do čeledi *Enterobacteriaceae* řadíme aerobní a fakultativně anaerobní gramnegativní rovné tyčinky se zaoblenými konci v průměru 2 – 3 µm dlouhé. Pohyblivé druhy mají peritrichální bičíky, některé mají polysacharidová pouzdra. Mikroorganismy z čeledi *Enterobacteriaceae* fermentují glukózu s tvorbou kyseliny a plynu a vykazují negativní oxidázovou reakci. Další dělení této velké čeledě je na základě schopnosti baktérií zkvašovat laktózu; rozlišujeme laktóza pozitivní (koliformní bakterie) a laktóza negativní druhy (např. salmonely, shigely).

Baktérie z čeledi Enterobacteriaceae se vyskytují volně v přírodě, často jsou součástí střevní mikroflóry člověka a teplokrevných živočichů. Z pohledu potravinářského průmyslu se v rámci této čeledě vyskytují mikroorganismy technologicky škodlivé (psychrotrofní bakterie s proteolytickou a lipolytickou aktivitou, např. rody Proteus, Serratia), zdravotně škodlivé (patogenní bakterie, např. salmonely, shigely, některé kmeny E. coli) a mikroorganismy indikátorové.

Stanovení baktérií čeledi *Enterobacteriaceae* je založeno na použití selekčních činidel potlačujících růst grampozitivních baktérií (např. žlučové soli, krystalová violet, brilantová zeleň), dále indikátorů zkvašování glukózy (indikátor pH, tvorba plynu) a provedení oxidázového testu. Inkubace probíhá aerobně při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Vlastní stanovení se provádí buď s předpomnožením vzorku v tekutém médiu nebo bez předpomnožení, podle očekávaného počtu mikroorganismů se volí metoda nejvýše pravděpodobného počtu nebo plotnová metoda.

3.2.1. Technika počítání kolonií – plotnová metoda

Tato metoda je doporučena tehdy, když předpokládaný počet bude vyšší než 100 KTJ v 1 ml či 1 g analytického vzorku.

3.2.1.1. Princip metody

Určený objem tekutého vzorku, výchozí suspenze u ostatních vzorků a jejich desetinásobných ředění se zalévá agarovou živnou půdou v Petriho miskách. Jako arbitrážní půda je určen **agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučí a glukózou** (VČŽG agar, angl. *VRBG agar*). Inokulované plotny se inkubují aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin. Následně se provede subkultivace vybraných charakteristických kolonií, jejich biochemická konfirmace a úprava počtu kolonií na miskách podle výsledku konfirmace. Z počtu identifikovaných suspektních kolonií vyrostlých na vybraných miskách se vypočte počet baktérií čeledi *Enterobacteriaceae* v 1 ml nebo 1 g vzorku.

3.2.1.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění a tolik dalších desetinásobných ředění, aby bylo možno stanovit předpokládaný počet mikroorganismů.
- Tekutý vzorek či výchozí suspenzi ostatních vzorků a jejich desetinásobná ředění očkujeme vždy jinou sterilní pipetou po 1 ml souběžně do dvou sterilních řádně označených Petriho misek.
- Inokulum v každé Petriho misce přelijeme asi 10 ml VČŽG agaru vytemperovaného na 45 ± 2 °C, důkladně krouživým pohybem promícháme a necháme utuhnout na chladné vodorovné ploše. Předpokládáme-li přítomnost mikroorganismů vytvářejících povlaky, přelijeme po utužení agar na misce asi 15 ml téže půdy (již nemícháme, pouze

převrstvíme!). Doba mezi ukončením přípravy výchozí suspenze a okamžikem, kdy se inokulum přelévá půdou, nesmí překročit 15 minut.

- Po ztuhnutí agarové půdy Petriho misky obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.
- **Alternativní metoda:** provádíme-li stanovení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* z technologických důvodů (chceme zachytit i psychrotrofní kmeny), volíme pro inkubaci alternativní teplotu 30 °C.

3.2.1.3. Konfirmace a hodnocení výsledků

Po ukončení inkubace spočítáme charakteristické kolonie narostlé na každé misce. Pro hodnocení použijeme misky obsahující 10 – 150 kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Po spočítání kolonií vybereme z každé plotny 5 charakteristických kolonií pro subkultivaci a biochemickou konfirmaci.

Subkultivaci provedeme rozočkováním vybrané kolonie na živný agar a po inkubaci 24 hodin při 37 °C vybereme z každé plotny jednu dobře izolovanou kolonii pro biochemickou konfirmaci. Biochemická konfirmace spočívá v provedení oxidázového testu (např. OXI test proužky) a zkoušky na fermentaci glukózy s tvorbou plynu.

Tabulka 4: Interpretace biochemických testů.

| | Oxidázová reakce | Fermentace glukózy | Tvorba plynu |
|---------------------------|------------------|--------------------|--------------|
| <i>Enterobacteriaceae</i> | - | + | + |

Jestliže alespoň 80 % z vybraných charakteristických kolonií dané misky je oxidáza negativních a glukóza pozitivních, počet kolonií na misce nijak neupravujeme. V ostatních případech se počet kolonií na misce upraví podle procentuálního podílu oxidáza negativních a glukóza pozitivních kolonií z celkového počtu kolonií vybraných pro konfirmaci. Výpočet následně provedeme obvyklým způsobem, počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* vyjádříme jako počet KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku.

Příklad 24:

Přímý odečet mikroorganismů z VČŽG agaru poskytl tyto výsledky:

- z ředění 10⁻²: 66 a 80 kolonií,
- z ředění 10⁻³: 6 a 4 kolonie.

Na základě výsledku konfirmace byly výsledky upraveny následujícím způsobem:

- plotna s 66 koloniemi: vybráno 5 kolonií, z nich 4 vyhověly (80 %), takže c = 66,
- plotna s 80 koloniemi: vybráno 5 kolonií, z nich 3 vyhověly (60 %), takže c = 48,
- plotna se 6 koloniemi: vybráno 5 kolonií, z nich 4 vyhověly (80 %), takže c = 6,
- plotna se 4 koloniemi: vybrány 4 kolonie, z nich 4 vyhověly (100 %), takže c = 4.

Další výpočet se provede obvyklým způsobem podle vzorce, přičemž Σ C je součet kolonií spočítaných po identifikaci na všech vybraných plotnách.

Morfologie charakteristických kolonií:

Po 24 hodinách kultivace mají kolonie narostlé na VČŽG agaru růžovočervenou, červenou nebo fialovou barvu, velikost 0,5 – 2 mm, mohou být obklopeny růžovou zónou precipitace.

Upozornění: Některé *Enterobacteriaceae* mohou způsobovat odbarvení půdy, proto v případě, že nejsou přítomny žádné charakteristické kolonie, odebereme pro potvrzení kolonie bělavé barvy.

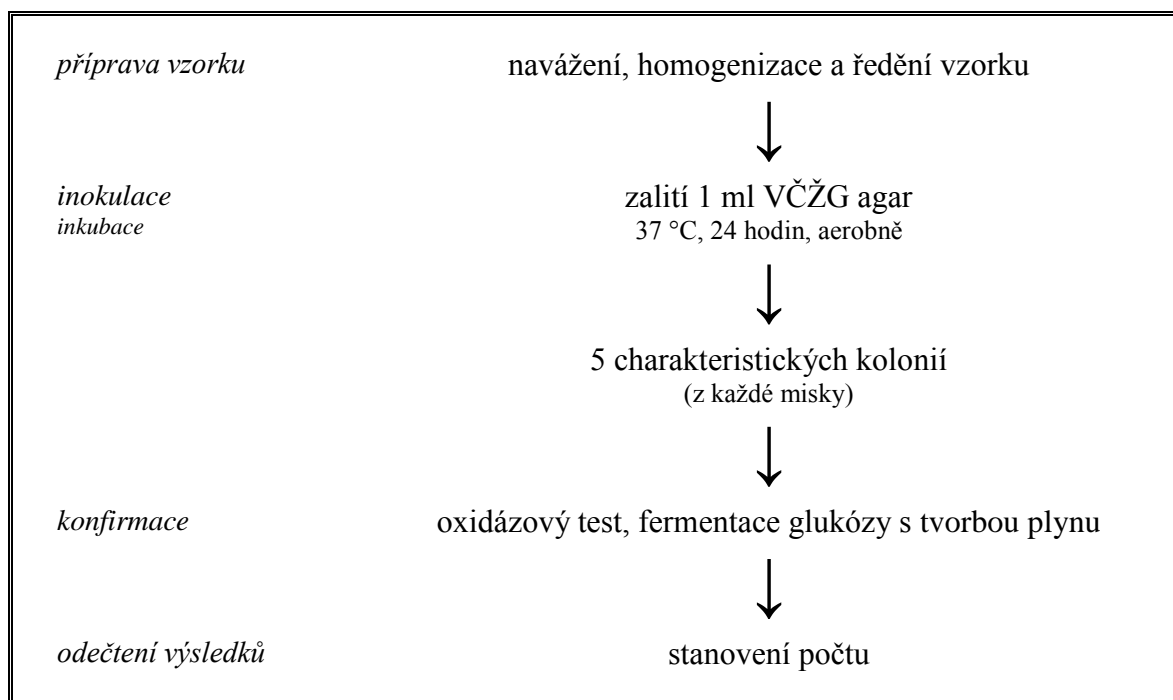


Schéma 2: Stanovení počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* v potravinách.

3.2.2. Metoda průkazu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*

Průkaz bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* zahrnuje 4 po sobě jdoucí stupně: předpomnožení v neselektivní tekuté půdě, pomnožení v selektivní tekuté půdě, izolaci a konfirmaci.

3.2.2.1. Princip metody

Zkoušený vzorek se inokuluje do tekuté půdy pro neselektivní pomnožení – **pufrovaná peptonová voda** (PPV médium) a inkubuje aerobně při 37 °C po dobu 16 – 20 hodin. Získaná kultura se přeočkuje do selektivní pomnožovací půdy – **pufrovaná půda s brilantovou zelení, žlučí a glukózou** (EE médium), inkubujeme aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin. Izolace se provede vyočkováním na pevnou selektivní půdu – **agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučí a glukózou** (VČŽG agar), inokulované plotny se inkubují aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin a zjišťuje se přítomnost suspektních kolonií bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*. Následně se provede subkultivace a biochemická konfirmace vybraných suspektních kolonií. Výsledkem je průkaz přítomnosti či absence bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* v navázce vyšetřovaného vzorku.

3.2.2.2. Postup metody

- Neselektivní předpomnožení: odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění, jako ředící roztok použijeme devítinásobné množství PPV média. Inkubujeme aerobně v termostatu při 37 °C po dobu 16 – 20 hodin.
- Selektivní pomnožení: po ukončení inkubace přeneseme 1 ml kultury do zkumavky s 10 ml EE média a inkubujeme aerobně v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin.
- Izolace: po ukončení inkubace provedeme sterilní bakteriologickou kličkou vyočkování na VČŽG agar. Inokulované misky inkubujeme aerobně při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.
- **Alternativní metoda**: provádíme-li stanovení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* z technologických důvodů (chceme zachytit i psychrotrofní kmeny), volíme pro všechny inkubace alternativní teplotu 30 °C.

3.2.2.3. Konfirmace a hodnocení výsledků

Z každé plotny náhodně vybereme 5 charakteristických kolonií pro subkultivaci a biochemickou konfirmaci. Další postup je shodný s plotnovou metodou (viz. kapitola 3.2.1.3.). Na základě výsledků konfirmace potvrdíme nebo vyloučíme přítomnost bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* v navázce vyšetřovaného vzorku.

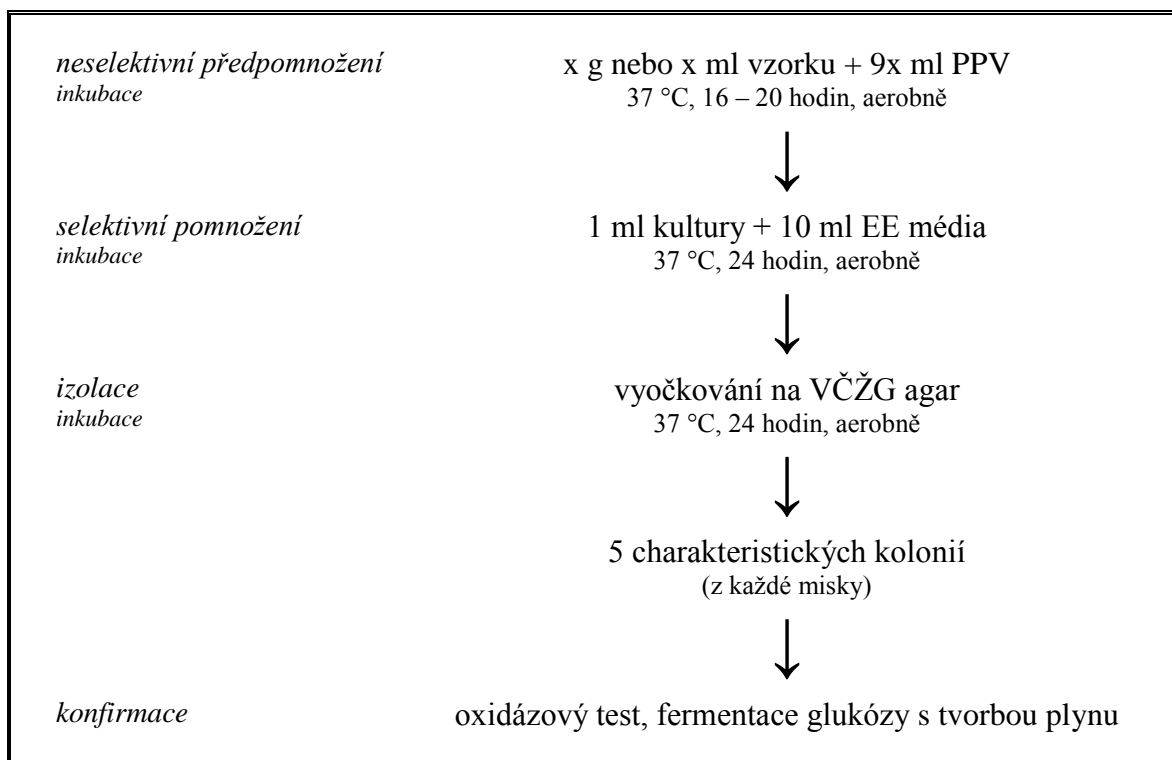


Schéma 3: Průkaz bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* v potravinách.

3.2.3. Stanovení počtu technikou nejvýše pravděpodobného počtu s předpomnožením - metoda MPN

Stanovení počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* technikou MPN zahrnuje následující po sobě jdoucí kroky: předpomnožení v neselektivní tekuté půdě, pomnožení v selektivní tekuté půdě, izolaci, výběr kolonií, confirmaci a výpočet. Tato technika se používá v případech, když se předpokládá nutnost resuscitace vyšetřovaných mikroorganismů nebo je-li očekávaný počet v rozmezí 1 – 100 KTJ v 1 ml nebo 1 g analytického vzorku.

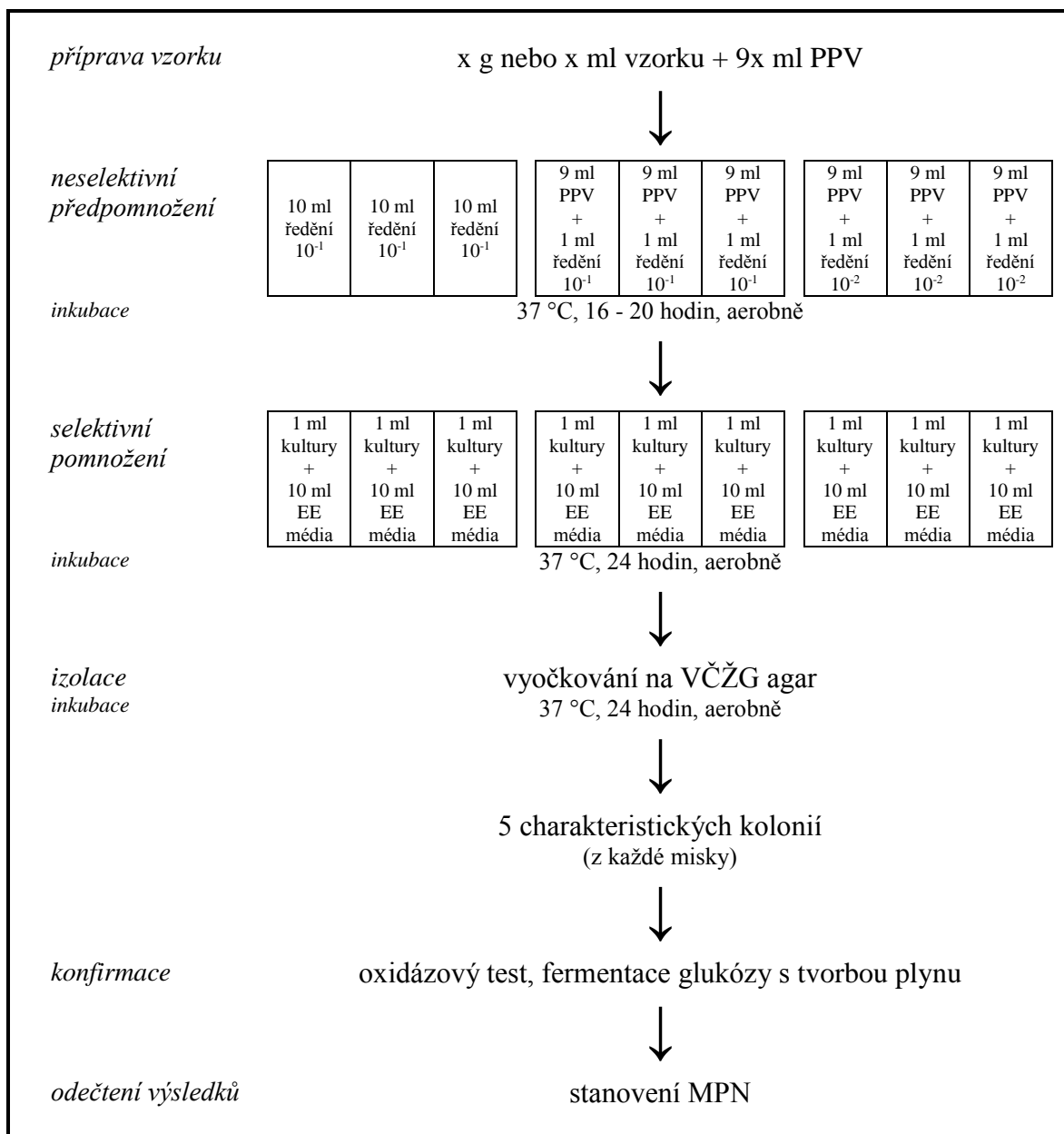
3.2.3.1. Princip metody

Zkoušený vzorek se inokuluje do tekuté půdy pro neselektivní pomnožení – **pufrovaná peptonová voda** (PPV médium), v tomtéž médiu provedeme i ředění vzorku. Určený objem výchozí suspenze a jejich desetinásobných ředění se očkuje do PPV média ve zkumavkách, které následně inkubujeme aerobně při 37 °C po dobu 16-20 hodin. Získaná kultura se přeočkuje do zkumavek s tekutou selektivní pomnožovací půdou – **pufrovaná půda s brilantovou zelení, žlučí a glukózou** (EE médium). Zkumavky inkubujeme aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin. Následně provedeme vyočkování na pevnou selektivní půdu – **agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučí a glukózou** (VČŽG agar), inokulované plotny se inkubují aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin a zjišťuje se přítomnost suspektních kolonií bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*.

Následně se provede subkultivace a biochemická confirmace vybraných suspektních kolonií. Na základě výsledku confirmace se stanoví počet zkumavek s pozitivní reakcí a sestaví se trojčíselný kód pomocí něhož se v tabulce MPN stanoví pravděpodobný počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* v 1 ml nebo 1 g vzorku.

3.2.3.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění, jako ředící roztok použijeme devítinásobné množství PPV média.
- Neselektivní předpomnožení: napipetujeme 3 x 10 ml výchozího ředění 10^{-1} do prázdných zkumavek, následně 3 x 1 ml výchozího ředění 10^{-1} do zkumavky s 9 ml PPV (tím připravíme ředění 10^{-2}), z ředění 10^{-2} potom opět 3 x 1 ml do 9 ml PPV ve zkumavce. Jednotlivá ředění očkujeme vždy jinou sterilní pipetou souběžně do tří řádně označených zkumavek.
- Zkumavky s inokulem inkubujeme aerobně při teplotě 37 °C po dobu 16 – 20 hodin.
- Selektivní pomnožení: po ukončení inkubace subkultivujeme 1 ml kultury z každé z devíti zkumavek sterilní pipetou do řádně označených zkumavek s 10 ml EE média. Inkubujeme aerobně při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.
- Izolace: po ukončení inkubace provedeme z každé zkumavky sterilní bakteriologickou kličkou vyočkování na VČŽG agar. Inokulované misky inkubujeme aerobně při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.
- **Alternativní metoda**: provádíme-li stanovení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* z technologických důvodů (chceme zachytit i psychrotrofní kmeny), volíme pro všechny inkubace alternativní teplotu 30 °C.

Schéma 4: Stanovení MPN bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* v potravinách.**3.2.3.3. Konfirmace a hodnocení výsledků**

Z každé plotny náhodně vybereme 5 charakteristických kolonií pro subkultivaci a biochemickou konfirmaci. Další postup je shodný s plotnovou metodou (viz kapitola 3.2.1.3.).

Po ukončení konfirmace spočítáme počet pozitivních zkumavek v každém ředění očkované série. Za pozitivní jsou považovány zkumavky se zřetelným projevem růstu, které byly potvrzeny konfirmací, tj. vyočkované kolonie byly oxidáza negativní a glukóza pozitivní. Podle počtu pozitivních zkumavek ve třech po sobě jdoucích ředěních sestavíme trojčíselný kód a pomocí něho odečteme v tabulce hodnotu MPN (viz kapitola 2.1.1.).

3.3. Stanovení koliformních bakterií

Koliformní bakterie jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní gramnegativní nesporulující tyčinky zkvašující laktózu s tvorbou kyseliny a plynu při teplotě 30 °C do 48 hodin. Patří do čeledi *Enterobacteriaceae*; některé kmeny mohou být patogenní (např. některé sérotypy *E. coli*).

Koliformní bakterie jsou součástí střevní mikroflóry člověka a teplotokrevných zvířat, současně se vyskytují i ve vnějším prostředí. V potravinářské mikrobiologii mají význam jako indikátor fekálního znečištění a tím také možné přítomnosti patogenních mikroorganismů pocházejících ze zažívacího traktu. Přímou kontaminaci potravin koliformními bakteriemi pocházejícími z výkalů lze selektivně prokázat kultivací při zvýšené teplotě 44,5 °C. Koliformní bakterie dále slouží jako indikátor dodržení sanitačních a technologických postupů, jsou ukazatelem úrovně hygieny. Jejich výskyt v pasterovaných výrobcích je známkou sekundární kontaminace nebo hrubých závad při tepelném ošetření. Význam mají některé psychrotrofní kmeny (aktivní i při nízkých teplotách) a termorezistentní formy odolávající tepelnému ošetření.

Na stanovení koliformních bakterií byla vypracována řada metod. Lze je stanovit mikrobity, kultivačně v tekutých či pevných půdách nebo na membránových filtrech. Obecně je průkaz koliformních bakterií založen na použití selekčních činidel potlačujících růst grampozitivních bakterií (např. žlučové soli, krystalová violet, brilliantová zeleň) a indikátorů zkvašování laktózy (indikátor pH, tvorba plynu). Pro stanovení koliformních bakterií v potravinách byla zvolena kultivační teplota 30 °C. Lze použít i teplotu 37 °C, je-li stanovení prováděno v souvislosti s ochranou veřejného zdraví. Naopak pro stanovení kmenů výhradně střevního původu se používá teplota 44,5 °C, při které ostatní kmeny koliformních bakterií nerostou – jedná se o tzv. termotolerantní koliformní bakterie.

3.3.1. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C

3.3.1.1. Princip metody

Určený objem tekutého vzorku, výchozí suspenze u ostatních vzorků a jejich desetinásobných ředění se zalévá agarovou živnou půdou v Petriho miskách. Jako arbitrážní půda je určen **agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými soli a laktózou** (VČŽL agar, angl. *VRBL agar*). Inokulované plotny se inkubují aerobně při 30 °C po dobu 48 hodin. Z počtu suspektních kolonií vyrostlých na vybraných miskách se vypočte počet koliformních bakterií v 1 ml nebo 1 g vzorku.

3.3.1.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění a tolik dalších desetinásobných ředění, aby bylo možno stanovit předpokládaný počet mikroorganismů.
- Tekutý vzorek či výchozí suspenzi ostatních vzorků a jejich desetinásobná ředění očkujeme vždy jinou sterilní pipetou po 1 ml souběžně do dvou sterilních řádně označených Petriho misek.
- Inokulum v každé Petriho misce přelijeme asi 15 ml VČŽL agaru vytemperovaného na 45 ± 2 °C, důkladně krouživým pohybem promícháme a necháme utuhnout na chladné vodorovné ploše. Předpokládáme-li přítomnost mikroorganismů vytvářejících povlaky, přelijeme po utužení agar na misce asi 15 ml téže půdy (již nemícháme, pouze převrstvíme!). Doba mezi ukončením přípravy výchozí suspenze a okamžikem, kdy se inokulum přelévá půdou, nesmí překročit 15 minut.

- Po ztuhnutí agarové půdy Petriho misky obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin.

3.3.1.3. Hodnocení výsledků

První odečítání provádíme po 24 hodinách, výsledný počet se zjistí po ukončení inkubace, tj. po 48 hodinách. Počítáme charakteristické kolonie narostlé na každé misce. Pro výpočet použijeme misky obsahující 10 – 150 kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Počet koliformních bakterií vyjádříme jako počet KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku.

Morfologie charakteristických kolonií:

Po 48 hodinách kultivace mají kolonie narostlé na VČŽL agaru následující morfologii:

- *uvnitř půdy* – kolonie fialově červené barvy o průměru 0,5 – 2 mm, někdy obklopené červenou zónou precipitované žluče;
- *na povrchu půdy* – kolonie fialově červené barvy o průměru 1 – 3 mm, kolonie mají často světlejší bezbarvý okraj, většina kmenů tvoří v půdě pod koloniemi růžový precipitát.

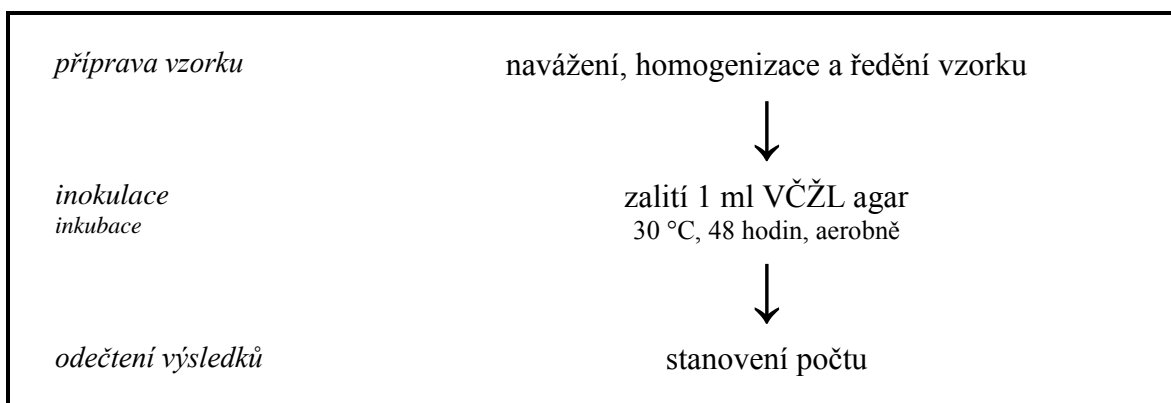


Schéma 5: Stanovení počtu koliformních bakterií v potravinách.

3.4. Stanovení *Escherichia coli*

Nejznámějším zástupcem čeledi *Enterobacteriaceae* a hlavním představitelem koliformních bakterií je *Escherichia coli*. Jedná se o fakultativně anaerobní krátkou rovnou tyčinku se zaoblenými konci. Většina kmenů *E. coli* je pohyblivá, některé tvoří slizová pouzdra. Dobře roste na běžných základních půdách, je biochemicky velmi aktivní, až na výjimky zkvašuje laktózu s tvorbou kyseliny a plynu.

Escherichia coli je součástí normální střevní mikroflóry člověka a teplokrevných zvířat, je označována za typickou střevní bakterii. Její výskyt v potravinách a surovinách živočišného původu a v prostředí výrobních podniků je považován za indikátor fekální kontaminace, a tedy nízké úrovně hygieny a sanitačního režimu. Výskyt *E. coli* v pasterovaných výrobcích svědčí o jejich sekundární kontaminaci. U některých potravin (např. mléčných výrobků) může působit vážné technologické vady a senzorické znehodnocení výrobků. V pitné vodě mají funkci indexových mikroorganismů – indikují možnou přítomnost střevních patogenů, např. salmonel. Některé kmeny *E. coli* jsou patogenní, mohou působit různě závažná střevní onemocnění, jejich zdrojem mohou být i kontaminované potraviny (např. syrové mléko a maso).

Pro průkaz *Escherichia coli* v potravinách se využívá selekčního tlaku zvýšené kultivační teploty (44 – 45 °C) a selekčních činidel potlačujících růst grampozitivních bakterií (např. žlučové soli, tergitol či laurylsulfát). Z biochemických vlastností je to schopnost vytvářet

z tryptofanu indol a průkaz aktivity enzymu β -D-glukuronidázy. Z používaných metod je to stanovení nejvýše pravděpodobného počtu a dále plotnové metody či metoda membránové filtrace založené na výše uvedených principech.

Současný trend směřuje k používání chromogenních médií. Ke stanovení počtu *E. coli* se běžně používají půdy s jedním chromogenem pro průkaz β -D-glukuronidázy, který obsahuje modrozelený chromofor. Dále lze použít půdy s dvěma chromogeny – pro průkaz β -D-glukuronidázy (modrozelený chromofor) a pro průkaz β -D-galaktosidázy (lososově červený chromofor), které umožňují odlišit *E. coli* (modrofialová – obsahuje oba enzymy), další koliformní bakterie a β -D-glukuronidázonegativní kmeny *E. coli* (červená – obsahují pouze β -D-galaktosidázu) a další gramnegativní bakterie (bezbarvé – nemají žádný z uvedených enzymů).

3.4.1. Stanovení počtu β -D-glukuronidázopozitivních *E. coli*

Aktivita β -D-glukuronidázy se uvádí u asi 95 % kmenů *E. coli* z různých zdrojů. Tento enzym může být prokázán i u malého množství kmenů jiných rodů (např. *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*). Růst těchto kmenů je za podmínek uvedené metodiky inhibován selekčním tlakem žlučových solí a kultivační teplotou 44 °C.

3.4.1.1. Princip metody

Určený objem tekutého vzorku, výchozí suspenze u ostatních vzorků a jejich desetinásobných ředění se zalévá selektivní chromogenní živnou půdou v Petriho miskách. Jako arbitrážní půda je určen **agar s tryptonem, žlučovými solemi a glukuronidem** (TBX agar), chromogenní složkou uvedeného agaru je kyselina 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glukuronová (BCIG). Inokulované plotny se inkubují aerobně při 44 °C po dobu 18 – 24 hodin. Z počtu suspektních kolonií vyrostlých na vybraných miskách se vypočte počet β -D-glukuronidázopozitivních *Escherichia coli* v 1 ml nebo 1 g vzorku.

Upozornění: Kmeny *E. coli* nerostoucí při teplotě 44 °C a β -D-glukuronidázonegativní kmeny nejsou touto technikou zachyceny. Jedná se např. o verotoxinogenní sérotyp *E. coli* O157. Při průkazu těchto kmenů je nutno použít jiný metodický postup (viz kapitola 4.4.).

3.4.1.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění a tolik dalších desetinásobných ředění, aby bylo možno stanovit předpokládaný počet mikroorganismů.
- Tekutý vzorek či výchozí suspenzi ostatních vzorků a jejich desetinásobná ředění očkujeme vždy jinou sterilní pipetou po 1 ml souběžně do dvou sterilních řádně označených Petriho misek.
- Inokulum v každé Petriho misce přelijeme asi 15 ml TBX agaru vytemperovaného na 45 ± 2 °C, důkladně krouživým pohybem promícháme a necháme utuhnout na chladné vodorovné ploše. Doba mezi ukončením přípravy výchozí suspenze a okamžikem, kdy se inokulum přelévá půdou, nesmí překročit 15 minut.
- Po ztuhnutí agarové půdy Petriho misky obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně v termostatu při teplotě 44 °C po dobu 18 – 24 hodin (celková doba inkubace nesmí být delší než 24 hodin).

- **Upozornění:** Je-li podezření na přítomnost stresovaných bakteriálních buněk, inkubujeme misky nejprve po dobu 4 hodin při teplotě 37 °C a poté při teplotě 44 °C po dobu 18 – 24 hodin. Inkubační teplota nesmí přesáhnout 45 °C.
- **Alternativní metoda:** Vzorek lze také očkovat roztěrem na povrch TBX agar, a to 0,2 ml inokula souběžně do dvou řádně označených Petriho misek.

3.4.1.3. Hodnocení výsledků

Po ukončení inkubace spočítáme charakteristické kolonie narostlé na každé misce. Pro výpočet použijeme misky obsahující 10 – 150 charakteristických kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Počet β -D-glukuronidázopozitivních *Escherichia coli* vyjádříme jako počet KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku.

Morfologie charakteristických kolonií:

Po 18 – 20 hodinách kultivace mají kolonie narostlé na TBX agaru modrou, příp. modrozelenou barvu a průměr 0,5 – 2 mm.

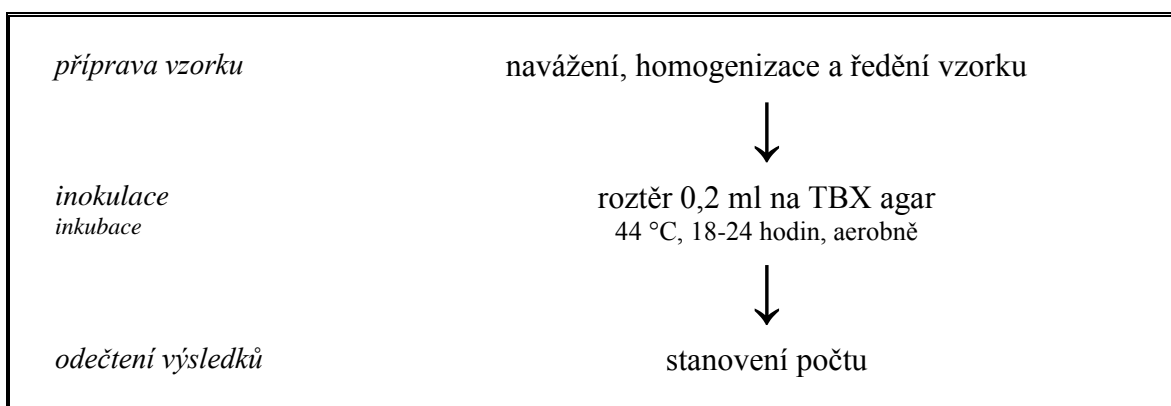


Schéma 6: Stanovení počtu β -D-glukuronidázopozitivních *Escherichia coli* v potravinách.

3.5. Stanovení bakterií *Enterococcus* spp.

Rod *Enterococcus* (čeleď *Enterococcaceae*) je reprezentován grampozitivními koky vyskytujícími se ve dvojicích či krátkých řetízích, které jsou morfologicky velmi podobné streptokokům. Enterokoky se výrazně odlišují schopností růstu v širokém rozmezí teplot a hodnot pH a značnou odolností vůči nepříznivým vnějším podmínkám. Rostou při 10 i 45 °C, v bujónu s 6,5 % NaCl, při pH 9,6 i v přítomnosti 40% žluči či 0,1% methylenové modři. Přezívají záhřev na 60 °C po dobu 30 minut (zvýšená termorezistence). Mezi nejčastější druhy patří *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*.

Enterokoky se běžně vyskytují jako saprofyty a komenzálové střevního traktu člověka a teplotokrevných zvířat. Mimo to se nacházejí v prostředí, zejména fekálně kontaminovaném, dále v povrchových, pitných či odpadních vodách, ale také na rostlinách. Některé kmeny mohou působit onemocnění člověka (např. zánět močových cest, endokarditidy, sepse). Řada kmenů je rezistentních vůči různým antibiotikům.

V praxi nachází stanovení enterokoků uplatnění jako indikátor fekálního znečištění zejména v případech, kdy byly vlivem technologického zpracování koliformní bakterie zničeny, např. u sušeného mléka. Výskyt enterokoků po pasteraci je citlivým ukazatelem defektů pasteračního režimu a dalších technologických postupů. Jako indikátorové mikroorganismy mohou signalizovat eventuální přítomnost grampozitivních patogenních mikroorganismů s podobnou osmo- a termotolerancí, např. stafylokoků a listerií.

V potravinách lze enterokoky stanovit kultivačně v tekutých či pevných půdách nebo na membránových filtrech. Obecně je průkaz enterokoků založen na použití selekčních činidel potlačujících růst gramnegativních a ostatních grampozitivních bakterií (např. 40% žluč, azid sodný, octan thalný), dále na průkazu hydrolýzy eskulinu či redukce triphenyl-tetrazolium-chloridu na růžovočervený až červenohnědý formazan.

3.5.1. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 37 °C

3.5.1.1. Princip metody

Určený objem tekutého vzorku, výchozí suspenze u ostatních vzorků a jejich desetinásobných ředění se zalévá selektivně-diagnostickou živnou půdou v Petriho miskách. Pro stanovení enterokoků se běžně používá **Slanetz-Bartley agar** (S-B agar). Inokulované plotny se inkubují aerobně při 37 °C po dobu 24 – 48 hodin. Z počtu suspektních kolonií vyrostlých na vybraných miskách se vypočte počet enterokoků v 1 ml nebo 1 g vzorku.

3.5.1.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění a tolik dalších desetinásobných ředění, aby bylo možno stanovit předpokládaný počet mikroorganismů.
- Tekutý vzorek či výchozí suspenzi ostatních vzorků a jejich desetinásobná ředění očkujeme vždy jinou sterilní pipetou po 1 ml souběžně do dvou sterilních řádně označených Petriho misek.
- Inokulum v každé Petriho misce přelijeme asi 15 ml S-B agaru vytemperovaného na 45 ± 2 °C, důkladně krouživým pohybem promícháme a necháme utuhnout na chladné vodorovné ploše. Doba mezi ukončením přípravy výchozí suspenze a okamžikem, kdy se inokulum přelévá půdou, nesmí překročit 15 minut.
- Po ztuhnutí agarové půdy Petriho misky obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 – 48 hodin.
- **Alternativní metoda:** Vzorek lze očkovat roztěrem na povrch S-B agaru, a to 0,2 ml inokula souběžně do dvou řádně označených Petriho misek.

3.5.1.3. Hodnocení výsledků

Po ukončení inkubace spočítáme charakteristické kolonie narostlé na každé misce. První odečítání provádíme po 24 hodinách, výsledný počet se zjistí po ukončení inkubace, tj. po 48 hodinách. Pro výpočet použijeme misky obsahující 10 – 150 kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředěních. V případě potřeby další confirmace se vybere 5 kolonií z každé misky a provedou se biochemické identifikační testy. Stanovený počet enterokoků vyjádříme jako počet KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku.

Morfologie charakteristických kolonií:

Po 48 hodinách kultivace mají kolonie narostlé na S-B agaru červenou až červenohnědou barvu a průměr 0,5 – 2 mm.

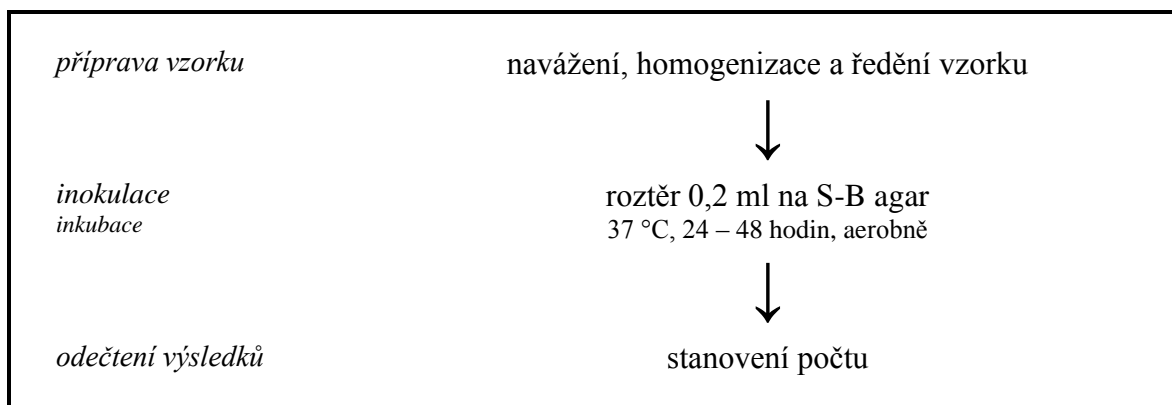


Schéma 7: Stanovení počtu enterokoků v potravinách.

3.6. Stanovení kvasinek a plísni

Kvasinky jsou jednobuněčné houby. V přírodě jsou velmi rozšířené, protože mají většinou sacharolytické vlastnosti, vyskytují se především na ovoci a potravinách bohatých na cukry. Rozmnožování kvasinek je podmíněno jejich fyziologickými vlastnostmi, především přítomností cukrů, odolností ke kyselému prostředí a vyššímu osmotickému tlaku. Většina kvasinek se při teplotách nad 40 °C nerozmnožuje, teploty nad 60 °C je ničí.

Hlavní průmyslový význam kvasinek spočívá v jejich použití pro výrobu alkoholických nápojů (pivo, víno, líh) a pekařského a krmného droždí. Z kvasinek se izoluje řada enzymů, koenzymů, nukleotidů, karotenoidů, atd. V mlékařském průmyslu se kvasinky uplatňují jako součást čistých mlékařských kultur při výrobě kefirů či sýrů zrajících pod mazem. Svou enzymovou činností způsobují, zejména osmofilní kvasinky, vady a znehodnocení potravin.

Plísně jsou obecně nenáročné na životní podmínky: jsou schopné využívat vzdušnou vlhkost, a rozmnožovat se za nízké vodní aktivity prostředí, rostou při nízkých teplotách, snášejí vyšší osmotické tlaky, rostou v kyselém prostředí. Jsou striktně aerobní a díky širokému enzymovému vybavení – proteolytické, lipolytické a sacharolytické enzymy – jsou schopné využívat různé substráty.

V přírodě se plísně běžně vyskytují, jejich výskyt v potravinářství je až na malé výjimky, kdy se používají jako čisté kultury při výrobě plísňových sýrů či některých druhů masných výrobků, nežádoucí a působí vady až úplné znehodnocení potravin. Ze zdravotního hlediska jsou plísně v centru pozornosti pro schopnost tvorby termostabilních mykotoxinů, patogenní druhy vyvolávají závažná onemocnění kůže, sliznic i vnitřních orgánů – tzv. mykózy, v neposlední míře může u citlivých osob docházet po aspiraci spór plísni k alergickým reakcím. Pozitivní význam mají plísně jako producenti antibiotik a organických kyselin, dále při přípravě léků či průmyslové produkci enzymů.

Stanovení kvasinek a plísni je založeno na použití selektivních činidel potlačujících růst doprovodné bakteriální mikroflóry, nejčastěji se jedná o živné půdy s nízkým pH (např. sladinkový agar), nebo živné půdy s přidavkem antibiotik. V současné době lze kvasinky a plísně stanovit dvěma standardními metodami, a to v závislosti na hodnotě aktivity vody (a_w) testovaného výrobku. Tyto metody umožňují pouze stanovení počtu živých kvasinek a plísni, nikoli spor plísni. Také je nelze využít ke stanovení mykotoxinů ve vyšetřovaných potravinách. Inkubace probíhá aerobně při teplotě 25 °C po dobu 5 dní. Ve sporných případech musí být identita problematických kolonií potvrzena prohlížením binokulární lupou či mikroskopickým vyšetřením.

3.6.1. Technika počítání kolonií u výrobků s a_w vyšší než 0,95

Tato metoda umožňuje stanovení počtu živých kvasinek a plísní ve výrobcích, které mají aktivitu vody vyšší než 0,95. Jedná se např. o vejce, maso, mléčné výrobky (s výjimkou sušeného mléka), ovoce, zeleninu, čerstvé těstoviny.

Při vyšetření vzorků u kterých hrozí přerůstání půdy bakteriemi (např. syrové maso), se doporučuje použít při přípravě živné půdy kombinaci chloramfenikolu a chlortetracyklinu.

Jako ředící roztok při zpracování vzorků je doporučeno používat 0,1% peptonovou vodu, k homogenizaci vzorku peristaltický homogenizátor. Vzhledem k rychlé sedimentaci spor v pipetě se pipeta po naplnění udržuje v horizontální (nikoli vertikální) poloze.

3.6.1.1. Princip metody

Určený objem tekutého vzorku, výchozí suspenze u ostatních vzorků a jejich desetinásobných ředění se roztírá na povrch agarové živné půdy v Petriho miskách. Jako arbitrážní půda je určen **chloramfenikolový agar s dichloranem a bengálskou červení** (DRBC agar). Inokulované plotny se inkubují aerobně při 25 °C po dobu 5 dnů. Stanoví se počet kvasinek a/nebo plísní v 1 ml nebo 1 g vzorku z počtu kolonií vyrostlých na vybraných miskách.

3.6.1.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění a tolik dalších desetinásobných ředění, aby bylo možno stanovit předpokládaný počet mikroorganismů.
- Tekutý vzorek či výchozí suspenzi ostatních vzorků a jejich desetinásobná ředění očkujeme rozterem na povrch DRBC agaru v Petriho miskách, a to vždy jinou sterilní pipetou po 0,1 ml souběžně na dvě řádně označené misky. Doba mezi ukončením přípravy výchozí suspenze a okamžikem, kdy se inokulum roztírá na půdu, nesmí překročit 15 minut.
- Inokulované misky necháme zaschnout po dobu asi 15 minut při laboratorní teplotě a inkubujeme aerobně v termostatu při teplotě 25 °C po dobu 5 dnů. Misky inkubujeme víčkem vzhůru. Je-li potřeba, ponechají se agarové plotny ještě 1 až 2 dny stát na rozptýleném světle.
- **Alternativní metoda:** Pro usnadnění stanovení nízkého počtu kvasinek a plísní lze očkovat tekutý vzorek či výchozí ředění pevného vzorku rozterem po 0,33 ml na 3 Petriho misky (tj. celkem 1 ml inokula).
- **Upozornění:** Plotny je vhodné inkubovat v otevřeném plastovém sáčku, abychom zabránili kontaminaci termostatu spórami plísní. Některé kvasinky a plísně mohou vyvolat alergické reakce či způsobit onemocnění, proto je při práci s nimi důležitá zvýšená opatrnost. Plotny nenecháváme inkubovat volně při laboratorní teplotě. Víčka misek otevíráme jen v nejnutnějších případech, pracovní stoly a inkubátory pravidelně desinfikujeme.

3.6.1.3. Hodnocení výsledků

Na každé z ploten spočítáme narostlé kolonie po 2 až 5 dnech inkubace, v případě plísní můžeme inkubaci prodloužit až na 7 dní. Po pěti dnech inkubace vybereme pro stanovení počtu misky obsahující 10 – 150 kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Při rychlém nárůstu plísní vycházíme z počtů zjištěných po dvou a pak znova po pěti dnech inkubace. Při vyšším výskytu plísní je vhodné počet kvasinek odečíst již 3. den, aby nedošlo k jejich

přerostení plísněmi. Je-li to potřeba, počítáme kolonie kvasinek a plísní odděleně. Počet kvasinek a/nebo plísní vyjádříme jako počet KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku.

Morfologie charakteristických kolonií:

Po 5 dnech kultivace jsou kolonie **kvasinek** na DRBC agaru narůžovělé barvy, okrouhlé, matné nebo lesklé, o průměru 3 – 5 mm, s pravidelným okrajem a více či méně vypouklým povrchem. Charakteristickým znakem je kvasničný zápach a tvarohovitá konzistence kolonií.

Na povrchu DRBC agaru rostou **plísně** v podobě obrovských (i několik cm) chmýřovitých kolonií často s různě zbarvenými plodícími nebo sporulujícími strukturami (např. bílé, černé, modrozelené, červenooranžové).

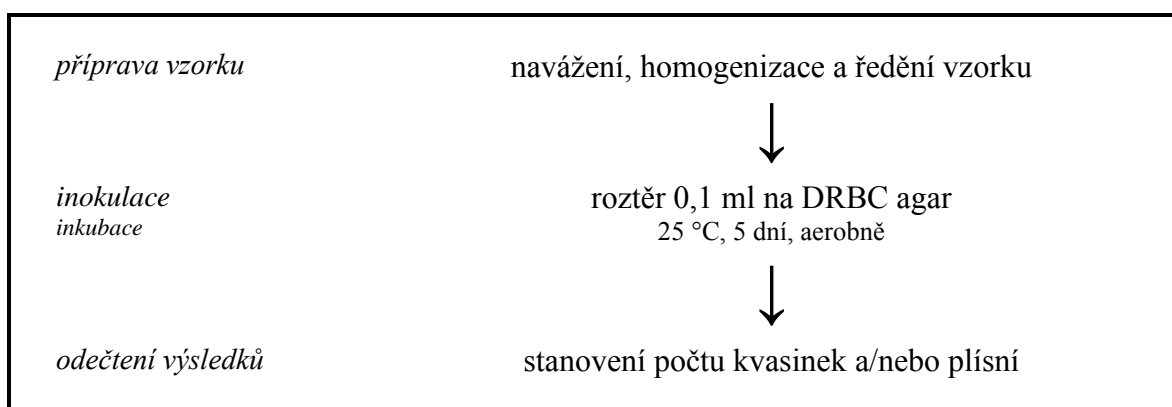


Schéma 8: Stanovení počtu kvasinek a plísní v potravinách s a_w vyšší než 0,95.

3.6.2. Technika počítání kolonií u výrobků s a_w nižší nebo rovnou než 0,95

Tato metoda umožňuje stanovení počtu živých osmofilních kvasinek a xerofilních plísní ve výrobcích, které mají aktivitu vody nižší nebo rovnou 0,95. Jedná se např. o sušené ovoce, pečivo, džemy, sušené maso, solené ryby, cereálie a cereální produkty, ořechy, některé druhy koření a chuťové přísady.

Na druhou stranu nelze tuto metodu použít pro hodnocení výrobků s aktivitou vody nižší nebo rovnou 0,60 (dehydrované cereálie, olejnaté výrobky, luštěniny, semena, prášky instantní nápoje).

3.6.2.1. Princip metody

Určený objem tekutého vzorku, výchozí suspenze u ostatních vzorků a jejich desetinásobných ředění se roztírá na povrch agarové živné půdy v Petriho miskách. Jako arbitrážní půda je určen **dichloran glycerolový agar** (DG 18 agar). Inokulované plotny se inkubují aerobně při 25 °C po dobu 5 dnů. Stanoví se počet kvasinek a/nebo plísní v 1 ml nebo 1 g vzorku z počtu kolonií/propagulí vyrostlých na vybraných miskách.

3.6.2.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění a tolik dalších desetinásobných ředění, aby bylo možno stanovit předpokládaný počet mikroorganismů.

- Tekutý vzorek či výchozí suspenzi ostatních vzorků a jejich desetinásobná ředění očkujeme roztěrem na povrch DG 18 agar v Petriho miskách, a to vždy jinou sterilní pipetou po 0,1 ml souběžně na dvě řádně označené misky. Doba mezi ukončením přípravy výchozí suspenze a okamžikem, kdy se inokulum roztírá na půdu, nesmí překročit 15 minut.
- Inokulované misky necháme zaschnout po dobu asi 15 minut při laboratorní teplotě a inkubujeme aerobně v termostatu při teplotě 25 °C po dobu 5 dnů. Misky inkubujeme víčkem vzhůru. Je-li potřeba, ponechají se agarové plotny ještě 1 až 2 dny stát na rozptýleném světle.

3.6.2.3. Hodnocení výsledků

Na každé z ploten spočítáme narostlé kolonie/propagule po 2 až 5 dnech inkubace, v případě plísní můžeme inkubaci prodloužit až na 7 dní. Po pěti dnech inkubace vybereme pro stanovení počtu misky obsahující 10 – 150 kolonií/propagulí ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Při rychlém nárůstu plísní vycházíme z počtů zjištěných po dvou a pak znova po pěti dnech inkubace. Je-li to potřeba, počítáme kolonie kvasinek a plísní odděleně. Počet kvasinek a/nebo plísní vyjádříme jako počet KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku.

Morfologie charakteristických kolonií:

Po 5 dnech kultivace jsou kolonie **kvasinek** na DG 18 agaru okrouhlé, matné nebo lesklé, o průměru 3 – 5 mm, s pravidelným okrajem a více či méně vypouklým povrchem. Charakteristickým znakem je kvasničný zápach a tvarohovitá konzistence kolonií.

Na povrchu DG 18 agaru rostou **plísně** v obrovských (i několik cm) chmýřovitých koloniích často s různě zbarvenými plodíciemi nebo sporulujícími strukturami (např. bílé, černé, modrozelené, červenooranžové).

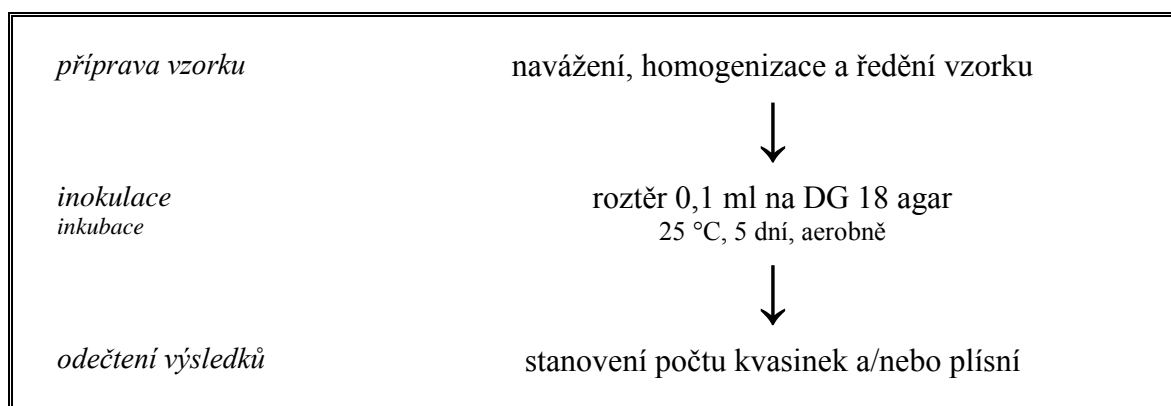


Schéma 9: Stanovení počtu kvasinek a plísní v potravinách s a_w nižší nebo rovnou 0,95.

3.7. Stanovení mezofilních bakterií mléčného kvašení

Mezi bakterie mléčného kvašení (BMK) patří celá řada rodů, jako např. laktokoky, enterokoky, streptokoky, leukonostoky, pediokoky. Nejpočetnějším a nejvýznamnějším rodem BMK je rod *Lactobacillus* z čeledi *Lactobacillaceae*. Laktobacily jsou grampozitivní nesporulující a většinou nepohyblivé tyčinky až kokobacily vyskytující se v palisádách či řetězcích. Jsou velmi nutričně náročné a nemají ani katalázovou ani oxidázovou aktivitu. Laktobacily jsou fakultativně anaerobní či mikroaerofilní bakterie se striktně fermentativním metabolismem.

*Zástupci tohoto rodu se mohou dělit podle svého metabolismu a zkvašování sacharidů na obligátně homofermentativní (hexózy zkvašují pouze na kyselinu mléčnou; pentózy ani glukonát nezkašují; např. *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*), fakultativně heterofermentativní (hexózy zkvašují na kyselinu mléčnou nebo směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a ethanolu; pentózy na kyselinu mléčnou a octovou; např. *L. plantarum*, *L. casei*) a obligátně heterofermentativní (hexózy zkvašují na kyselinu mléčnou, octovou a CO₂; pentózy na kyselinu mléčnou a octovou; např. *L. fermentum*, *L. kefir*). V dnešní době se však preferuje rozdělení laktobacilů podle jejich fylogenetické příbuznosti.*

*Laktobacily se přirozeně vyskytují v mléce, na rostlinách, v silážích, v půdě i vodě, v ústech a trávicím traktu savců a ptáků a jsou součástí vaginální mikroflóry člověka. Pro potravinářský průmysl mají laktobacily značný význam. Jejich činnosti je využíváno pro konzervaci zeleniny a některých krmiv (tvorba kyselin, bakteriocinů a nízkého pH), při výrobě sýrů (*L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. casei*) a kysaných mléčných výrobků (*L. delbrueckii*, *L. kefir*, *L. plantarum*), některých druhů masných výrobků, atd. Na druhou stranu kontaminace heterofermentativními mléčnými bakteriemi způsobuje problémy při výrobě uzenin, a to zelenání prátu a hotových výrobků. Laktobacily se vyznačují také proteolytickou a slabou lipolytickou aktivitou. Mohou tvořit biogenní aminy a vzácně být i patogenní.*

Půdy určené pro stanovení mezofilních bakterií mléčného kvašení jsou nutričně obohaceny kvasničním extraktem, glukózou a Tweenem 80 (zdroj mastných kyselin). Růst ostatních mikroorganismů je potlačen přítomností inhibičních složek (citrát amonný, octan sodný) a nízkým pH média (pH 5,7). Pro stanovení počtu mezofilních bakterií mléčného kvašení se používá plotnová metoda s aerobní, mikroaerofilní či anaerobní kultivací při 30 °C.

3.7.1. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C

3.7.1.1. Princip metody

Určený objem tekutého vzorku, výchozí suspenze u ostatních vzorků a jejich desetinásobných ředění se zalévá agarovou živnou půdou v Petriho miskách. Jako arbitrážní půda je určen ***De Man, Rogosa a Sharpe agar*** (MRS agar) o pH 5,7. Inokulované plotny se inkubují aerobně při 30 °C po dobu 72 hodin. Lze použít i techniku očkování na povrch půdy roztěrem v kombinaci s inkubací za anaerobních nebo mikroaerofilních podmínek. Stanoví se počet mikroorganismů v 1 ml nebo 1 g vzorku z počtu kolonií vyrostlých na vybraných miskách.

Upozornění: V některých potravinářských výrobcích se vyskytují psychrotrofní nebo termofilní bakterie mléčného kvašení vyžadující kultivační teplotu jinou než 30 °C, kromě toho na agaru MRS při pH 5,7 nerostou všechny bakterie mléčného kvašení a některé rostou pouze slabě.

3.7.1.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění a tolik dalších desetinásobných ředění, aby bylo možno stanovit předpokládaný počet mikroorganismů.

- Tekutý vzorek či výchozí suspenzi ostatních vzorků a jejich desetinasobná ředění očkujeme vždy jinou sterilní pipetou po 1 ml souběžně do dvou sterilních řádně označených Petriho misek.
- Inokulum v každé Petriho misce přelijeme asi 15 ml MRS agarů vytemperovaných na teplotu 45 ± 2 °C, důkladně krouživým pohybem promícháme a necháme utuhnout na chladné vodorovné ploše. Doba mezi ukončením přípravy výchozí suspenze a okamžikem, kdy se inokulum přelévá půdou, nesmí překročit 15 minut.
- Po ztuhnutí agarové půdy Petriho misky obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin.
- **Alternativní metoda:** Vzorek lze očkovat roztěrem na povrch MRS agarů, a to 0,2 ml inokula souběžně do dvou řádně označených Petriho misek. Naočkované plotny inkubujeme za anaerobních či mikroaerofilních podmínek.

3.7.1.3. Hodnocení výsledků

Po ukončení inkubace spočítáme kolonie narostlé na každé misce. Pro výpočet použijeme misky obsahující 10 – 300 kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Protože za uvedených podmínek mohou na MRS agaru růst i jiné mikroorganismy než bakterie mléčného kvašení, je vhodné získané kolonie jednoduchým způsobem konfirmovat (Gramovo barvení, test na průkaz katalázy). Počet mezofilních bakterií mléčného kvašení vyjádříme jako počet KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku.

Morfologie charakteristických kolonií:

Po 3 dnech kultivace na MRS agaru jsou kolonie mezofilních bakterií mléčného kvašení pravidelné, okrouhlé, hladké, spíše bezbarvé o průměru 0,5 – 2 mm, charakteristickým znakem je nakyslý zápach.

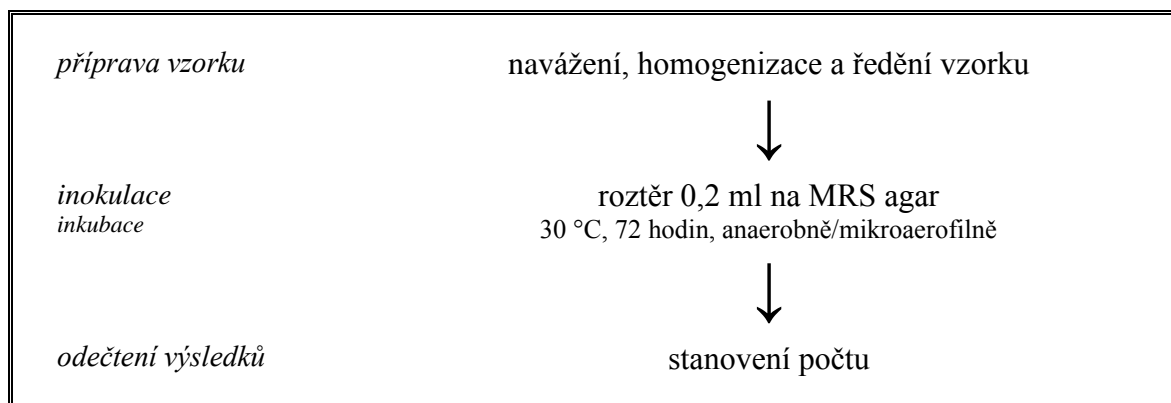


Schéma 10: Stanovení počtu mezofilních bakterií mléčného kvašení v potravinách.

3.8. Stanovení proteolytických a lipolytických mikroorganismů

Řada mikroorganismů produkuje do prostředí exoenzymy schopné rozkládat základní složky potravin, zejména bílkoviny a tuk, působit zhoršení organoleptických vlastností a kažení výrobků. Proteolytické a lipolytické druhy mikroorganismů se nachází jak mezi psychrotrofními, mezofilními, termorezistentními, termofilními i obligátně anaerobními skupinami mikroorganismů.

Pro stanovení proteolytických a lipolytických mikroorganismů se používají elektivní půdy, na kterých rostou i jiné druhy mikroorganismů, ale netvoří typické kolonie. Pro stanovení proteolytických mikroorganismů se používají půdy s přidavkem bílkovin (např. odstředěné mléko, želatina), pro stanovení lipolytických mikroorganismů půdy s přidavkem tuků (např. Tweenu).

3.8.1. Stanovení počtu proteolytických mikroorganismů

3.8.1.1. Princip metody

Proteolytické mikroorganismy produkují enzymy, které rozkládají bílkoviny přidané do živného média a vytvářejí okolo kolonií zónu projasnění. Určený objem tekutého vzorku, výchozí suspenze u ostatních vzorků a jejich desetinásobných ředění se roztírá na agarovou živnou půdou v Petriho miskách, např. **agar s odstředěným mlékem** (MO agar). Inokulované plotny se inkubují aerobně při 30 °C po dobu 72 hodin. Stanoví se počet mikroorganismů v 1 ml nebo 1 g vzorku z počtu kolonií vyrostlých na vybraných miskách.

3.8.1.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění a tolik dalších desetinásobných ředění, aby bylo možno stanovit předpokládaný počet mikroorganismů.
- Tekutý vzorek či výchozí suspenzi ostatních vzorků a jejich desetinásobná ředění očkujeme roztěrem na povrch MO agaru v Petriho miskách, a to vždy jinou sterilní pipetou po 0,2 ml souběžně na dvě řádně označené misky. Doba mezi ukončením přípravy výchozí suspenze a okamžikem, kdy se inokulum roztírá na půdu, nesmí překročit 15 minut.
- Inokulované misky necháme zaschnout po dobu asi 15 minut při laboratorní teplotě, následně je obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin.
- **Alternativní metoda:** Pro stanovení proteolytických mikroorganismů lze použít také agar s želatinou. Po ukončení inkubace převrstvíme agar 5 – 10 ml kyselého roztoku chloridu rtuťnatého. Během jedné minuty se kolem kolonií proteolytických mikroorganismů objeví zóna želatinolýzy (projasnění) zatímco zbylé médium zbledá.

3.8.1.3. Hodnocení výsledků

Po ukončení inkubace spočítáme na každé misce kolonie, kolem kterých se vytvořila zóna projasnění. Pro výpočet použijeme misky obsahující 10 – 150 kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Počet proteolytických mikroorganismů vyjádříme jako počet KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku.

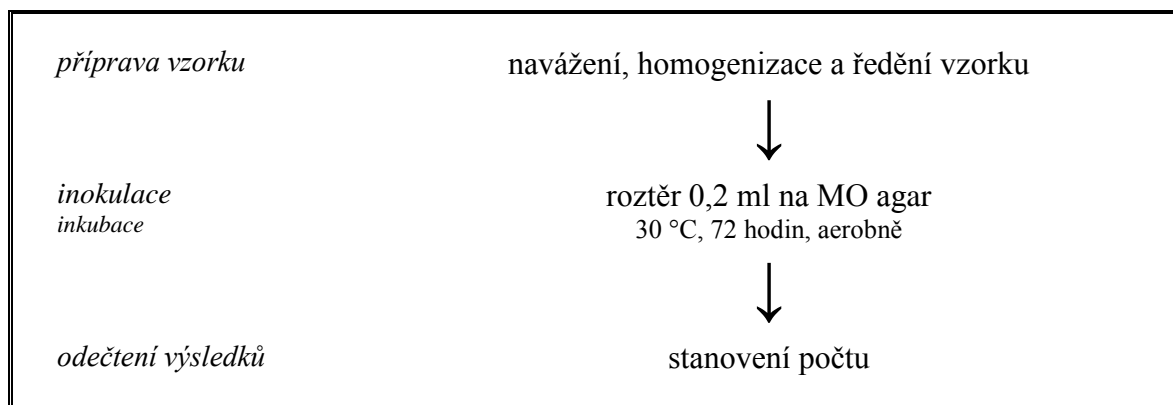


Schéma 11: Stanovení počtu proteolytických mikroorganismů v potravinách.

3.8.2. Stanovení počtu lipolytických a proteolytických mikroorganismů

3.8.2.1. Princip metody

Lipolytické mikroorganismy produkují lipázy hydrolyzující tuk, což se vizuálně projeví vytvoření zóny precipitace okolo kolonií. Určený objem tekutého vzorku, výchozí suspenze u ostatních vzorků a jejich desetinásobných ředění se roztírá na agarovou živnou půdou v Petriho miskách, např. **agar s želatinou a Tweenem** (TW agar). Inokulované plotny se inkubují aerobně při 30 °C po dobu 72 hodin. Stanoví se zvlášť počet proteolytických a lipolytických mikroorganismů v 1 ml nebo 1 g vzorku z počtu kolonií vyrostlých na vybraných miskách.

3.8.2.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění a tolik dalších desetinásobných ředění, aby bylo možno stanovit předpokládaný počet mikroorganismů.
- Tekutý vzorek či výchozí suspenzi ostatních vzorků a jejich desetinásobná ředění očkujeme roztěrem na povrch TW agaru v Petriho miskách, a to vždy jinou sterilní pipetou po 0,2 ml souběžně na dvě řádně označené misky. Doba mezi ukončením přípravy výchozí suspenze a okamžikem, kdy se inokulum roztírá na půdu, nesmí překročit 15 minut.
- Inokulované misky necháme zaschnout po dobu asi 15 minut při laboratorní teplotě, následně je obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin.

3.8.2.3. Hodnocení výsledků

Po ukončení inkubace spočítáme nejprve kolonie **lipolytických mikroorganismů**, které jsou obklopeny zónou precipitace. Poté převrstvíme povrch agaru kyselým roztokem chloridu rtuťnatého a spočítáme kolonie **proteolytických mikroorganismů**, kolem kterých se objeví zóna projasnění. Pro výpočet použijeme misky obsahující 10 – 150 kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Zvlášť vyjádříme počet lipolytických a zvlášť počet proteolytických mikroorganismů jako počet KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku.

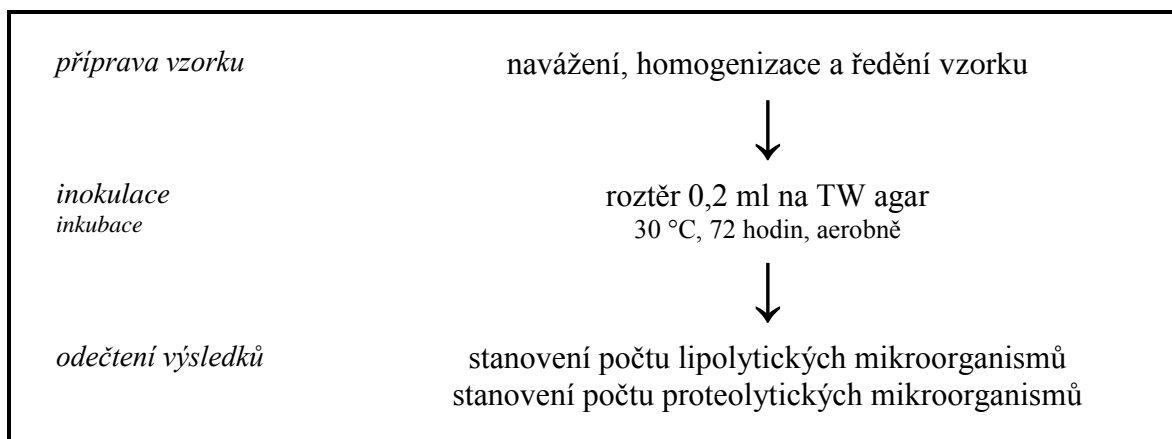


Schéma 12: Stanovení počtu lipolytických a proteolytických mikroorganismů v potravinách.

3.9. Stanovení ostatních indikátorových mikroorganismů

3.9.1. Stanovení psychrotrofních mikroorganismů

Psychrotrofní mikroorganismy jsou bakterie, kvasinky a plísňe schopné růst na neselektivní živné půdě při teplotě 6,5 °C (obecně v rozmezí 1 – 7 °C), kde během 10 dnů vytváří viditelné kolonie.

*Psychrotrofní bakterie mají význam zejména u chladírensky skladovaných surovin a potravin. Většinou se jedná o gramnegativní oxidázopozitivní tyčinky (např. rody *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Serratia*), mohou se vyskytnout i grampozitivní zástupci (např. rod *Bacillus*). Pro psychrotrofní bakterie je typická značná proteolytická a lipolytická aktivita.*

3.9.1.1. Princip metody

Určený objem tekutého vzorku, výchozí suspenze u ostatních vzorků a jejich desetinásobných ředění se roztírá na neselektivní živnou půdou v Petriho miskách, např. **agar s glukózou, tryptonem a kvasničným extraktem** (GTK agar). Metoda roztěru se volí proto, abychom zabránili tepelnému stresu mikroorganismů. Inokulované plotny se inkubují aerobně při 6,5 °C po dobu 10 dnů. Stanoví se počet psychrotrofních mikroorganismů v 1 ml nebo 1 g vzorku z počtu kolonií vyrostlých na vybraných plotnách.

3.9.1.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění a tolik dalších desetinásobných ředění, aby bylo možno stanovit předpokládaný počet mikroorganismů.
- Tekutý vzorek či výchozí suspenzi ostatních vzorků a jejich desetinásobná ředění očkujeme roztěrem na povrch GTK agaru v Petriho miskách, a to vždy jinou sterilní pipetou po 0,2 ml souběžně na dvě řádně označené misky. Doba mezi ukončením přípravy výchozí suspenze a okamžikem, kdy se inokulum roztírá na půdu, nesmí překročit 15 minut.
- Inokulované misky necháme zaschnout po dobu asi 15 minut při laboratorní teplotě, následně je obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně při teplotě 6,5 °C po dobu 10 dnů.

- **Alternativní metoda:** Při stanovení psychrotrofních mikroorganismů v syrovém mléce lze použít tzv. zkrácený způsob, kdy jsou misky inkubovány aerobně při teplotě 21 °C po dobu 25 hodin.

3.9.1.3. Hodnocení výsledků

Po ukončení inkubace spočítáme kolonie narostlé na každé misce, a to bez ohledu na jejich velikost, barvu či tvar. Je důležité, aby do počtu byly zahrnuty také bodové kolonie. Pro výpočet použijeme misky obsahující 10 – 150 kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Počet psychrotrofních mikroorganismů vyjádříme jako počet KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku.

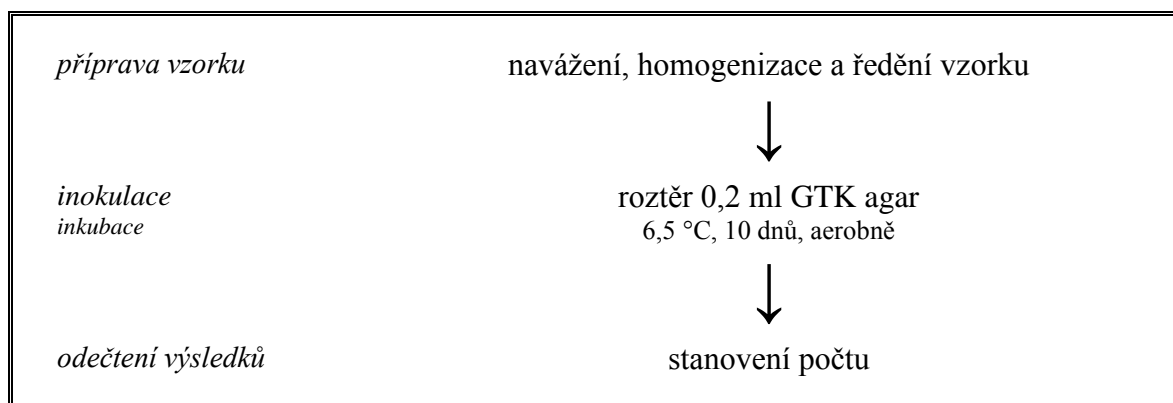


Schéma 13: Stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů v potravinách.

3.9.2. Stanovení aerobních a anaerobních sporotvorných bakterií

Stanovení sporotvorných bakterií má význam zejména u tepelně opracovaných výrobků. Aerobní sporuláty (příslušníci rodu *Bacillus*) se ve zvýšené míře vyskytují zejména v nedostatečně chlazených pasterovaných výrobcích, anaerobní sporuláty (příslušníci rodu *Clostridium*) jsou nežádoucími kontaminanty konzervářenského průmyslu či zrajících sýrů.

3.9.2.1. Princip metody

Určený objem tekutého vzorku či výchozí suspenze u ostatních vzorků se roztírá na neselektivní živnou půdou v Petriho miskách, např. **krevní agar** (KA). Před vlastním očkovaním se provede tepelná inaktivace vzorku záhřevem na teplotu 80 °C po dobu 10 minut. Jejím účelem je devitalizace vegetativních forem sporotvorných bakterií a ostatních mikroorganismů. Inokulované plotny se inkubují v případě stanovení aerobních sporulátů aerobně při 30 °C po dobu 72 hodin, v případě stanovení anaerobních sporulátů anaerobně při teplotě 37 °C po dobu 72 hodin. Stanoví se počet aerobních, resp. anaerobních sporotvorných bakterií v 1 ml nebo 1 g vzorku z počtu kolonií vyrostlých na vybraných plotnách.

3.9.2.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění.
- Do sterilní zkumavky odebereme 10 ml tekutého vzorku či výchozí suspenze ostatních vzorků. Zkumavku zahříváme ve vodní lázni tak, aby došlo k zahřátí jejího obsahu na teplotu 80 °C po dobu 10 minut (viz kapitola 1.3.4.). Po ukončení záhřevu obsah zkumavky prudce ochladíme.

- Tepelně inaktivovanou suspenzi očkujeme roztěrem na povrch krevního agaru v Petriho miskách, a to vždy jinou sterilní pipetou po 0,2 ml souběžně na dvě řádně označené misky. Doba mezi ukončením záhřevu a okamžikem, kdy se inokulum roztírá na půdu, nesmí překročit 15 minut.
- Inokulované misky necháme zaschnout po dobu asi 15 minut při laboratorní teplotě, následně je obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme: **aerobní sporuláty** – aerobně při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin; **anaerobní sporuláty** – v anaerostatu při teplotě 37 °C po dobu 72 hodin.

3.9.2.3. Hodnocení výsledků

Po ukončení inkubace spočítáme kolonie narostlé na každé misce. Pro výpočet použijeme misky obsahující 10 – 150 kolonií. Počet aerobních, resp. anaerobních sporotvorných bakterií vyjádříme jako počet KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku.

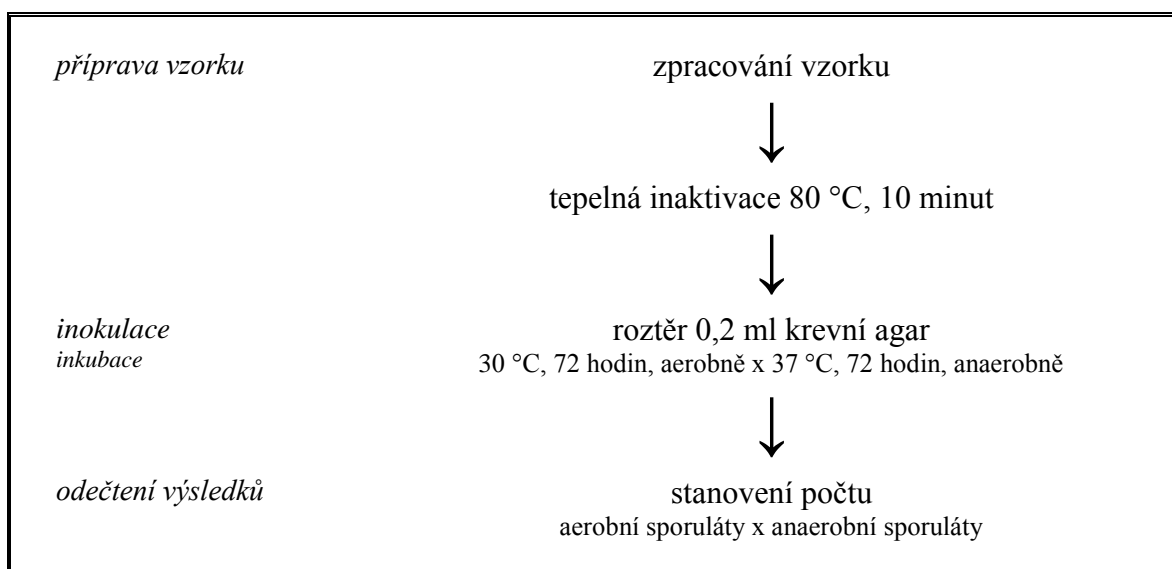


Schéma 14: Stanovení počtu sporotvorných bakterií v potravinách.

4. Stanovení patogenních mikroorganismů

Z pohledu mikrobiologie potravin zdravotní nezávadnost znamená nepřítomnost patogenních mikroorganismů a zdraví škodlivých látek (bakteriálních toxinů) v potravině. Onemocnění způsobená mikroorganismy kontaminujícími potraviny nebo jejich toxiny dělíme na **alimentární infekce** a **alimentární intoxikace**. Při alimentárních infekcích se mikroorganismy dostávají potravou do zažívacího traktu člověka, rozmnožují se zde a dále narušují životně důležité funkce organismu. V případě alimentárních intoxikací způsobují onemocnění toxiny produkované mikroorganismy při jejich množení v potravině.

Různé alimentární infekce a intoxikace se nevyskytují stejně často, ani nejsou stejně závažné. V České republice mezi epidemiologicky nejzávažnější onemocnění patří především salmonelózy a kampylobakterií, z alimentárních intoxikací je pozornost věnována zejména stafylokokové enterotoxikóze.

A. Významní původci alimentárních infekcí a toxoinfekcí

4.1. Stanovení bakterií *Salmonella* spp.

Baktérie rodu *Salmonella* jsou řazeny do čeledi *Enterobacteriaceae*. Příslušníci tohoto rodu jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní, nesporotvorné tyčinky, zkvašují glukózu, většinou jsou kataláza pozitivní, oxidáza negativní, redukují nitráty na nitrity. Salmonely jsou většinou pohyblivé, některé sérotypy např. *S. Gallinarum* jsou nepohyblivé. Většina salmonel (s výjimkou *S. Typhi*) využívá jako zdroj uhlíku citráty, dekarboxylují lyzin, arginin a ornitin, produkují sirovodík. Test s methyl červení je pozitivní, V-P test a indol negativní.

Rod *Salmonella* je rozdělen do 2 druhů – *Salmonella enterica* a *Salmonella bongori*, první z nich se dále dělí do 6 poddruhů, které zahrnují více než 2 500 sérotypů. Minimální teplota růstu salmonel je 5 °C, maximální 47 °C, optimální teplota okolo 37 °C. Hraniční hodnota aktivity vody pro množení salmonel je 0,92, salmonely však přežívají i při nižší a_w (sušené mléko, čokoláda, koření, želatina, apod.). Rozmezí hodnot pH, při kterých se salmonely mohou pomnožovat je od 3,8 – 9,5, optimum je při neutrálním pH. Koncentrace soli nad 9 % působí baktericidně.

Baktérie rodu Salmonella se primárně vyskytují ve střevním traktu zvířat (např. ptáků, plazů, hospodářských zvířat, hlodavců, hmyzu) i lidí a vylučovanými fekáliemi kontaminují životní prostředí (voda, půda) a potraviny. Po požití kontaminované potravy pronikají salmonely do tenkého střeva, kde se množí a při tom jsou uvolňovány toxické látky. K nejvýznamnějším toxinům patří endotoxin (lipopolysacharidový komplex O-antigen) a v menší míře i ST a LT enterotoxiny. Invazivní kmeny mohou pronikat do hlubších vrstev sliznice střeva, bakterie se dostávají do lymfatického systému, jsou vychytávány fagocyty, ve kterých se dále pomnožují. Po rozpadu buňky se dostávají do krevního oběhu a mohou způsobovat septikémii.

Stanovení salmonel v potravinách se provádí většinou kvalitativně, tzn. jedná se o průkaz nebo vyloučení přítomnosti salmonel v předepsané navážce vzorku, obvykle 25 g nebo 25 ml. Ke kultivaci se používají neselektivní pomnožovací média a dále selektivní tekuté či pevné půdy obsahující látky inhibující růst doprovodné mikroflóry (např. chlorid sodný, žlučové soli, brilantová zeleň, antibiotika), dále cukry, které salmonely štěpí a za přítomnosti indikátoru pH dochází ke změně barvy půdy v okolí kolonií. Suspektní kolonie jsou konfirmovány biochemicky a sérologicky sadou somatických (O) a bičkových (H) antigenů, příp. i antigenů povrchového pouzdra (Vi).

4.1.1. Metoda průkazu bakterií rodu *Salmonella*

Průkaz bakterií rodu *Salmonella* zahrnuje 4 po sobě jdoucí stupně: pomnožení v neselektivní tekuté půdě, pomnožení v selektivní tekuté půdě, izolaci a confirmaci. Baktérie rodu *Salmonella* mohou být ve vzorcích přítomny v nízkých počtech a jsou často provázeny značně vyššími počty jiných příslušníků čeledi *Enterobacteriaceae* nebo příslušníků jiných čeledí. Proto je nezbytné selektivní pomnožení. Kromě toho je nezbytným krokem předpomnožení, které umožňuje průkaz subletálně poškozených buněk.

4.1.1.1. Princip metody

Zkoušený vzorek se inokuluje do tekuté půdy pro neselektivní pomnožení – **pufrovaná peptonová voda** (PPV médium), a inkubuje se aerobně při 37 °C po dobu 16 – 20 hodin. Získaná kultura se přeočkuje do dvou tekutých selektivních půd – **Rappaport Vassiliadis sója médium** (RVS médium) a **Mueller-Kauffman tetratiónát novobiocin médium** (MKTTn médium). RVS médium se inkubuje aerobně při 42 °C po dobu 24 hodin a MKTTn médium při 37 °C po dobu 24 hodin. Ze selektivního pomnožení se provádí vyočkování na dvě pevné selektivní půdy – **agar s xylózou, lyzinem a deoxycholátem** (XLD agar) a kteroukoli **jinou selektivní půdu** např. agar s fenolovou červení a brilantovou zelení (BR agar, *angl. BG agar*) nebo chromogenní agar pro stanovení salmonel (např. Rambach agar). Inokulované misky se inkubují aerobně při 37 °C po dobu 24 – 48 hodin a zjišťuje se přítomnost suspektních kolonií bakterií rodu *Salmonella*. Následně se provede biochemická a sérologická confirmace vybraných suspektních kolonií. Výsledkem je průkaz přítomnosti či absence bakterií rodu *Salmonella* v navázce vyšetřovaného vzorku.

4.1.1.2. Postup metody

- Neselektivní pomnožení: odebereme zkušební vzorek (obvykle 25 g nebo 25 ml) a připravíme výchozí ředění, jako ředící roztok použijeme devítinásobné množství (tj. 225 ml) PPV média. Inkubujeme aerobně v termostatu při 37 °C po dobu 16 – 20 hodin.
- Selektivní pomnožení: po ukončení inkubace přeneseme 0,1 ml výchozí suspenze do zkumavky s 10 ml RVS půdy a inkubujeme aerobně v termostatu při 42 °C po dobu 24 hodin. Souběžně přeneseme 1 ml výchozí suspenze do zkumavky s 10 ml MKTTn půdy a inkubujeme aerobně v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin.
- Izolace: z obou půd pro selektivní pomnožení provedeme vyočkování sterilní bakteriologickou kličkou na dvě selektivní půdy. Povinnou půdou je XLD agar, druhá selektivní půda se volí dle zvyklostí laboratoře (např. BR agar). Inokulované Petriho misky obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně v termostatu při 37 °C po dobu 24 – 48 hodin.

4.1.1.3. Confirmace a hodnocení výsledků

Při hodnocení sledujeme nárůst kolonií charakteristických pro rod *Salmonella*, pro confirmaci náhodně vybereme z každé plotny 5 charakteristických kolonií.

Kolonie vybrané pro confirmaci subkultivujeme vyočkováním na masopeptonový agar (MPA). Při biochemické confirmaci standardně provedeme následující testy: růst na TSI agaru, průkaz štěpení močoviny, průkaz lyzindekarboxylázy, průkaz β -galaktozidázy, VP test a průkaz tvorby indolu (viz. tabulka 6). Pro biochemickou confirmaci je dovoleno použít komerční identifikační soupravy. Po biochemické identifikaci následuje sérologická confirmace a sérotypizace, která je zaměřena na průkaz O, H a Vi antigenů skličkovou

aglutinací. Na základě výsledků konfirmace potvrdíme nebo vyloučíme přítomnost bakterií rodu *Salmonella* v navážce vyšetřovaného vzorku.

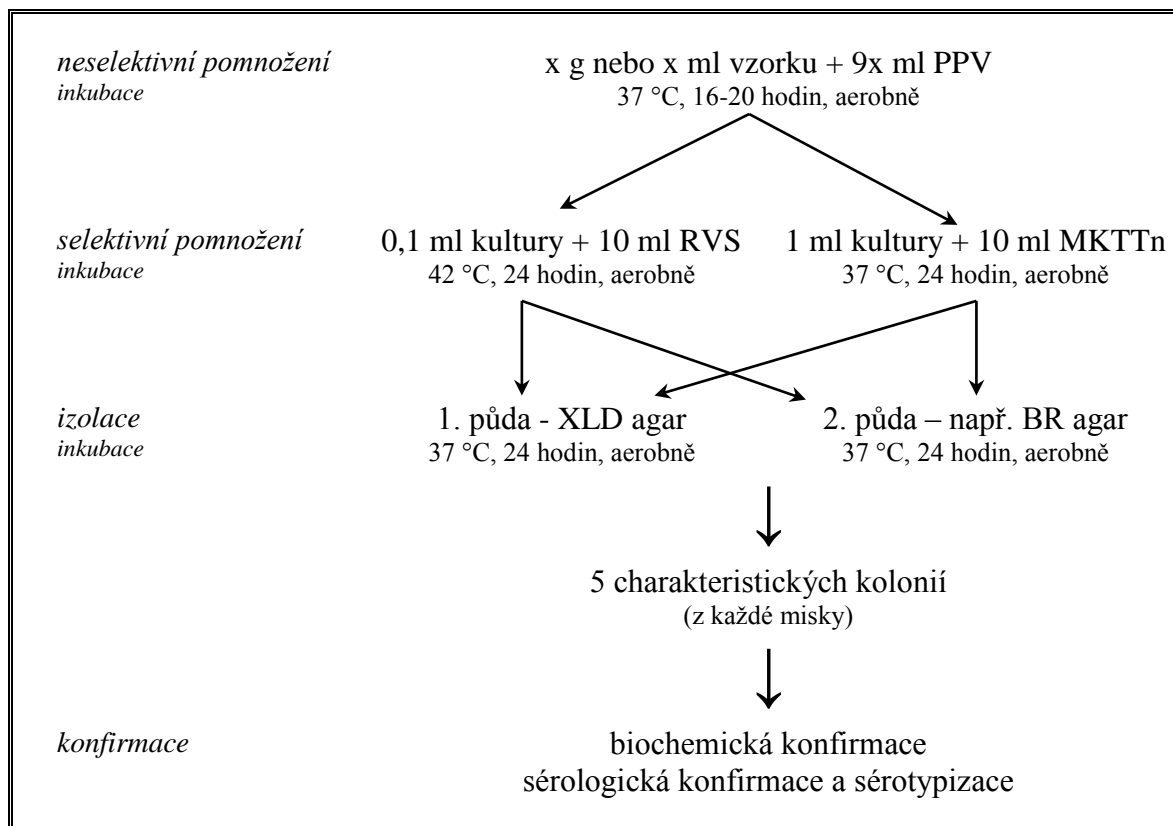


Schéma 15: Průkaz bakterií *Salmonella* spp. v potravinách.

Morfologie charakteristických kolonií:

Po 24 hodinách inkubace mají narostlé kolonie následující morfologii:

- *XLD agar* – kolonie laktóza negativních bakterií (salmonely) jsou průsvitné s černým středem o průměru 2 mm a v jejich okolí dochází ke změně barvy půdy z oranžové do červena; Kolonie laktóza pozitivních bakterií (koliformní bakterie) jsou jasně žluté barvy někdy s černým středem o průměru 2 mm obklopené žlutou zónou.
- *BR agar* – kolonie laktóza negativních bakterií (salmonely) jsou průsvitné o průměru 2 mm a v jejich okolí dochází ke změně barvy půdy do pivoňkově červena; Kolonie laktóza pozitivních bakterií (koliformní bakterie) jsou jasně žlutozelené barvy o průměru 2 mm, podobně se barví i půda v okolí kolonií.
- *Rambach agar* – typické kolonie salmonel rostou jasně červeně, ostatní v odstínech od vínové až po modrou. Velikost kolonií je kolem 1,5 mm.

Tabulka 5: Interpretace biochemických testů.

| Konfirmační test | Pozitivní nebo negativní reakce | % kultur r. <i>Salmonella</i> projevujících reakci |
|--------------------------------|---------------------------------|--|
| TSI: glukóza (tvorba kyseliny) | + | 100,0 |
| TSI: glukóza (tvorba plynu) | + | 91,9 |
| TSI: laktóza | - | 99,2 |
| TSI: sacharóza | - | 99,5 |
| TSI: tvorba sirovodíku | + | 91,6 |
| štěpení močoviny | - | 99,0 |
| dekarboxylace lyzinu | + | 94,6 |
| tvorba β -galaktozidázy | - | 98,5 |
| Voges-Proskauerova reakce | - | 100,0 |
| tvorba indolu | - | 98,9 |

TSI – Triple Sugar Iron agar

4.2. Stanovení *Campylobacter* spp.

Baktérie rodu *Campylobacter* (čeleď *Campylobacteraceae*) jsou gramnegativní, mikroaerofilní, malé spirálkovitě zahnuté tyčinky s charakteristickým vývrtkovitým pohybem. Jsou oxidáza pozitivní s negativní reakcí na indol. Redukují nitráty, ale nefermentují sacharidy. K termotolerantním kampylobakterům (schopnost růstu při 42 °C) patří *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* a *C. lari*.

Minimální teplota růstu kampylobakterů je 32 °C, maximální 45 °C, optimální teplota růstu je 42 °C. Hraniční hodnota aktivity vody pro množení kampylobakterů je od 0,98. Rozmezí hodnot pH při kterých se mohou pomnožovat je 4,9 – 9,0 s optimem při neutrálním pH, koncentrace soli nad 1,5 % působí baktericidně. Optimální složení atmosféry pro růst kampylobakterů je 5 % O₂ + 10 % CO₂ + 85 % N.

Termotolerantní baktérie rodu *Campylobacter* se vyskytují ve střevním traktu domácích i volně žijících teplokrevných zvířat bez klinických příznaků onemocnění. Člověk může být infikován buď přímo (např. přímým kontaktem se zvířetem) nebo nepřímo kontaminovanou vodou, nepasterovaným mlékem nebo syrovým masem. Po požití kontaminované potravy pronikají baktérie do tenkého střeva, kde se množí. U tekutin (voda, mléko) je průchod žaludkem rychlý a tím se zvyšuje množství živých buněk, které pronikají do tenkého střeva, kde se pomnožují. Baktérie adherují ke střevní sliznici v proximální části tenkého střeva a produkují enterotoxin, který působí na sliznici střeva. U některých postižených osob se onemocnění vyvíjí až v hemoragickou enteritidu a ulcerativní změny v kolonu.

Kampylobaktérie se množí mnohem pomaleji než ostatní střevní baktérie a proto je nutné kultivační média doplnit antibiotickými suplementy, které brzdí růst kontaminující mikroflóry. Suspektní kolonie jsou konfirmovány biochemicky (kataláza, oxidáza, produkce H₂S), dále podle schopnosti růstu při 25 °C a za aerobních podmínek při 42 °C. Druhovému zařazení je prováděno podle rezistence izolátů k cephalotinu a ke kyselině nalidixové, počet rezistentních kmenů však v posledních letech stoupl natolik, že toto stanovení ztrácí diagnostický význam. Odlišení epidemiologicky nejvýznamnějšího druhu *C. jejuni* se provádí na základě hydrolýzy hippurátu.

4.2.1. Metoda průkazu termotolerantních druhů rodu *Campylobacter*

Termotolerantní druhy kampylobakterů jsou schopné růstu při 42 °C. Jejich průkaz v potravinách zahrnuje 3 po sobě jdoucí stupně: jednostupňové pomnožení v tekuté selektivní půdě, izolaci a konfirmaci.

4.2.1.1. Princip metody

Zkoušený vzorek se inokuluje do tekuté půdy pro selektivní pomnožení – **bujón podle Boltona** s koňskou hemolyzovanou krví a inkubuje se mikroaerofilně při 37 °C po dobu 4 – 6 hodin a následně při 42 °C po dobu 48 hodin. Získaná kultura ze selektivního pomnožení se vyočkuje na 2 pevné selektivní půdy – **modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem** (mCCDA agar) a další selektivní půdu založenou na jiném principu než mCCDA, např. **agar podle Karmaliho** či **agar podle Prestona**. Inokulované misky se inkubují mikroaerofilně při 42 °C po dobu 48 hodin a zjišťuje se přítomnost suspektních kolonií termotolerantních druhů rodu *Campylobacter*. Následně se provede biochemická konfirmace vybraných suspektních kolonií. Výsledkem je průkaz přítomnosti či absence termotolerantních bakterií rodu *Campylobacter* v navážce vyšetřovaného vzorku.

4.2.1.2. Postup metody

- **Selektivní pomnožení:** odebereme zkušební vzorek (obvykle 25 g nebo 25 ml) a připravíme výchozí ředění, jako ředící roztok použijeme devítinásobné množství (tj. 225 ml) bujónu podle Boltona. Inkubujeme mikroaerofilně v termostatu při 37 °C po dobu 4 – 6 hodin a následně při 42 °C po dobu 48 hodin.
- **Izolace:** z půdy pro selektivní pomnožení provedeme vyočkování sterilní bakteriologickou kličkou na 2 selektivní agarová média – mCCDA a Karmali agar. Inokulované Petriho misky obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme mikroaerofilně v termostatu při 42 °C po dobu 48 hodin.
- **Alternativní metoda:** Předpokládáme-li ve vyšetřovaném vzorku přítomnost velkého množství termotolerantních kampylobakterů, provedeme z výchozí suspenze vyočkování sterilní bakteriologickou kličkou přímo na povrch selektivních agarových půd, a to bez předchozího pomnožení.

4.2.1.3. Konfirmace a hodnocení výsledků

Při hodnocení sledujeme nárůst kolonií charakteristických pro termotolerantní druhy rodu *Campylobacter*, pro konfirmaci náhodně vybereme z každé plotny 5 charakteristických kolonií.

Základní konfirmace představuje hodnocení morfologie buněk po obarvení dle Grama, testování pohyblivosti, mikroaerofilního růstu při 25 °C, aerobního růstu při 42 °C a průkaz oxidázy. Ke druhové identifikaci lze využít: průkaz katalázy, stanovení citlivosti ke kyselině nalidixové a cephalotinu, průkaz hydrolýzy hippurátu sodného a indoxyl acetátu. Na základě výsledků konfirmace potvrdíme nebo vyloučíme přítomnost termotolerantních druhů rodu *Campylobacter* v navážce vyšetřovaného vzorku.

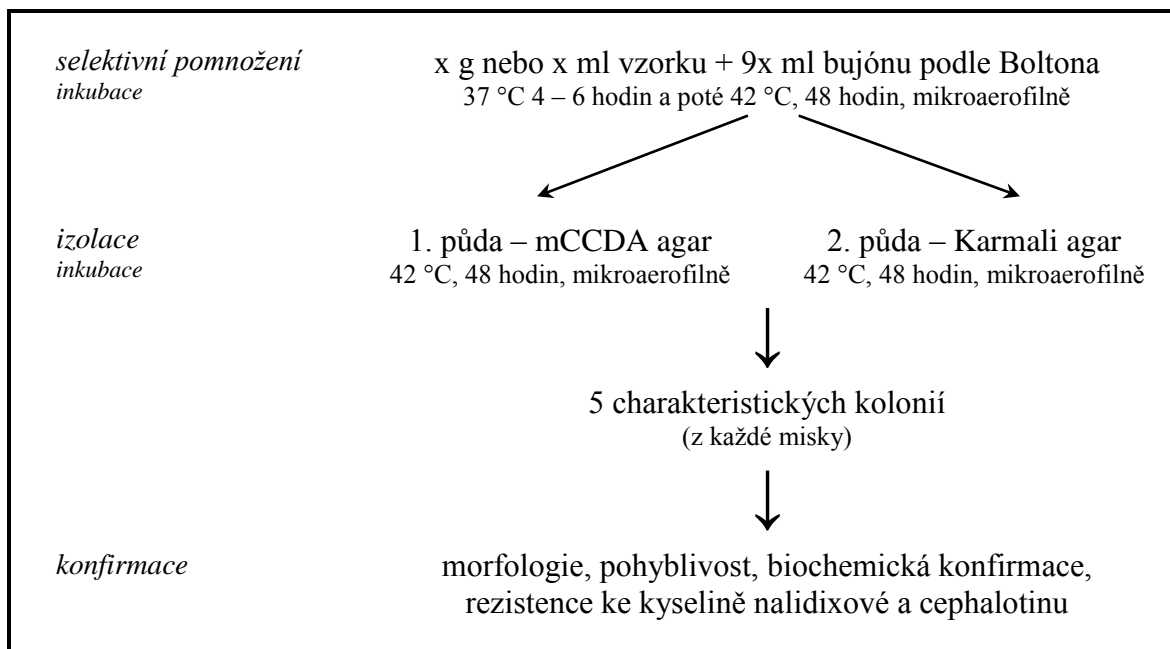
Tabulka 6: Vybrané znaky druhů rodu *Campylobacter* rostoucích při 42 °C.

| Znaky | <i>C. jejuni</i> | <i>C. coli</i> | <i>C. lari</i> | <i>C. upsaliensis</i> |
|---------------------|------------------|----------------|----------------|-----------------------|
| oxidáza | + | + | + | + |
| kataláza | + | + | + | - |
| kyselina nalidixová | S | S | R/S | S |
| cephalotin | R | R | R | S |
| hydrolýza hippurátu | + | - | - | - |
| indoxylacetát | + | + | - | + |

S – senzitivní; R – rezistentní

Morfologie charakteristických kolonií:

- *mCCDA agar* – po 48 hodinách inkubace jsou charakteristické kolonie šedavě zbarvené často s kovovým leskem, ploché a vlhké s tendencí se rozrůstat.
- *Karmali agar* – po 48 hodinách inkubace jsou charakteristické kolonie šedavě zbarvené, ploché a vlhké s tendencí se rozrůstat.

Schéma 16: Průkaz termotolerantních druhů rodu *Campylobacter* v potravinách.

4.3. Stanovení *Listeria monocytogenes*

Rod *Listeria* (čeleď *Listeriaceae*) zahrnuje 5 druhů, z nichž pouze *Listeria monocytogenes* je považována za patogenní pro člověka. Listérie jsou grampozitivní, krátké rovné tyčinky se zakulacenými konci o velikosti 0,5 – 2 μm vyskytující se jako jednotlivé buňky nebo ve dvojicích. Optimální teplota růstu je 30 – 37 °C, při teplotě do 25 °C jsou pohyblivé. Listérie jsou fakultativně anaerobní, kataláza pozitivní a rostou v bujónu s 10 % NaCl. *Listeria monocytogenes* na krevním agaru způsobuje beta hemolýzu, která je lokalizována pouze pod kolonií (tzv. striktní hemolýza). Hygienicky závažná je schopnost růstu při chladírenských teplotách (4 °C).

Listérie jsou saprofyty a epifyty sliznic střevního traktu člověka a teplotokrevných zvířat. Vyskytují se také na rostlinách, v půdě či vodě. *Listeria monocytogenes* způsobuje listeriózu člověka a zvířat. Je to vnitrobuněčný parazit, který napadá buňky imunitního systému a rozmnožuje se v nich. Zdrojem onemocnění, která mohou končit (především u rizikových skupin obyvatel: těhotné ženy, malé děti, senioři, imunodeficientní pacienti) i smrti, jsou kontaminované potraviny.

Stanovení *Listeria monocytogenes* v potravinách se provádí kvalitativně, tzn. jedná se o průkaz nebo vyloučení přítomnosti *L. monocytogenes* v předepsané navážce vzorku, obvykle 25 g nebo 25 ml, nebo i kvantitativně. V obou případech se ke kultivaci používají selektivní tekuté či pevné půdy obsahující látky inhibující růst doprovodné mikroflóry (např. chlorid litný, akriřavin, polymyxin), dále eskulin, který listerie štěpí na eskuletin, jenž s citrátem železitoamonným tvoří hnědočerný barevný komplex.

Z chromogenních médií jsou standardně používány agary ALOA a Rapid`*L.mono* umožňující odlišení *L. monocytogenes* od dalších druhů listerií. Morfologie kolonií *L. monocytogenes* na ALOA agaru je dána aktivitou enzymu fosfolipázy C (fosfatidyl inositol fosfolipáza C) – výrazná zóna precipitace, a dále aktivitou enzymu galaktozidázy – modrozelená barva kolonií. Chromogenní médium Rapid`*L.mono* využívá pro odlišení *L. monocytogenes* detekci fosfolipázy C – tmavomodrý chromofor a xylózu, na jejíž štěpení reaguje acidobazický indikátor fenolová červen. Půda Rapid`*L.mono* je intenzivně červené barvy. *L. monocytogenes* na ní roste v modrých koloniích (fosfolipáza C pozitivní, xylóza negativní), *L. ivanovii* v koloniích modrozelených se žlutou okolní zónou (fosfolipáza C pozitivní, xylóza pozitivní), kolonie *L. innocua* jsou bílé a kolonie *L. welshimeri* a *L. seeligeri* bílé někdy se žlutým okolím.

4.3.1. Metoda průkazu *Listeria monocytogenes*

Průkaz *Listeria monocytogenes* zahrnuje 4 po sobě jdoucí stupně: primární pomnožení, sekundární pomnožení, izolaci a konfirmaci. Baktérie rodu *Listeria* mohou být ve vzorcích přítomny v nízkých počtech a jsou často provázeny značně vyššími počty příslušníků jiných rodů a proto je nezbytné selektivní pomnožení. Dále je nutné prokázat i subletálně poškozené buňky, což umožňuje pomnožení v tekuté selektivní půdě s poloviční koncentrací inhibičních složek.

4.3.1.1. Princip metody

Zkoušený vzorek se inokuluje do tekuté selektivní půdy pro primární pomnožení – **poloviční bujón podle Frasera** (½FB médium), a inkubuje se aerobně při 30 °C po dobu 24 hodin. Získaná kultura se přeočkuje do tekuté selektivní půdy pro sekundární pomnožení – **bujón podle Frasera** (FB médium), a inkubuje se aerobně při 37 °C po dobu 24 – 48 hodin. Z primárního i sekundárního pomnožení se provádí vyočkování na dvě pevné selektivní půdy – **agar pro listerie podle Ottavianiho a Agostiho** (ALOA agar) a kteroukoli **jinou selektivní půdu** např. PALCAM agar. Inokulované misky se inkubují aerobně při 37 °C po dobu 24 – 48 hodin a zjišťuje se přítomnost suspektních kolonií *L. monocytogenes*. Následně se provede konfirmace vybraných suspektních kolonií. Výsledkem je průkaz přítomnosti či absence *L. monocytogenes* v navázce vyšetřovaného vzorku.

4.3.1.2. Postup metody

- Primární pomnožení: odebereme zkušební vzorek (obvykle 25 g nebo 25 ml) a připravíme výchozí ředění, jako ředící roztok použijeme devítinásobné množství (tj. 225 ml) ½FB média. Inkubujeme aerobně v termostatu při 30 °C po dobu 24 hodin. V průběhu inkubace může dojít k vytvoření černého zbarvení.
- Sekundární pomnožení: přeneseme 0,1 ml výchozí suspenze do zkumavky s 10 ml FB média. Inkubujeme aerobně v termostatu 37 °C po dobu 48 hodin.
- Izolace: z primárního i sekundárního pomnožení provedeme vyočkování sterilní bakteriologickou kličkou na dvě selektivní půdy. Povinnou půdou je agar ALOA, druhá selektivní půda se volí podle zvyklostí laboratoře (např. PALCAM agar). Inokulované Petriho misky obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně v termostatu při 37 °C po dobu 24 – 48 hodin.

4.3.1.3. Konfirmace a hodnocení výsledků

Při hodnocení sledujeme nárůst kolonií suspektních pro bakterie rodu *Listeria*, resp. *L. monocytogenes*. První hodnocení provádíme po 24 hodinách, konečné po ukončení inkubace, tj. po 48 hodinách. Pro konfirmaci vybereme náhodně z každé plotny 5 suspektních kolonií.

Kolonie vybrané pro konfirmaci subkultivujeme vyočkováním na agar s tryptonem, sójovým peptonem a kvasničným extraktem (TSYE agar). Konfirmace *L. monocytogenes* je založena na následujících testech: průkaz hemolýzy, využívání cukrů (rhamnózy, xylózy) a CAMP test (viz. tabulka 8). Na základě výsledků konfirmace potvrdíme nebo vyloučíme přítomnost *L. monocytogenes* v navázce vyšetřovaném vzorku.

Morfologie charakteristických kolonií:

- *ALOA agar* – *L. monocytogenes* roste po 24 hodinách inkubace v modrozelených koloniích obklopených širokou neprůhlednou kruhovou zónou precipitace (haló); *L. ivanovii* roste pomaleji, zóna precipitace je viditelná až po 48 hodinách.
- *PALCAM agar* – po 24 hodinách jsou kolonie *L. monocytogenes* drobné šedo zelené nebo olivově zelené barvy o průměru 1,5 – 2 mm, mnohdy s propadlým středem a obklopeny hnědočernou zónou.
- *Rapid L.mono* - *L. monocytogenes* roste po 24 hodinách inkubace v modrých koloniích bez změny barvy média, *L. ivanovii* v modrozelených koloniích se žlutou okolní zónou, kolonie *L. innocua* jsou bílé a kolonie *L. welshimeri* a *L. seeligeri* bílé někdy se žlutým okolím.

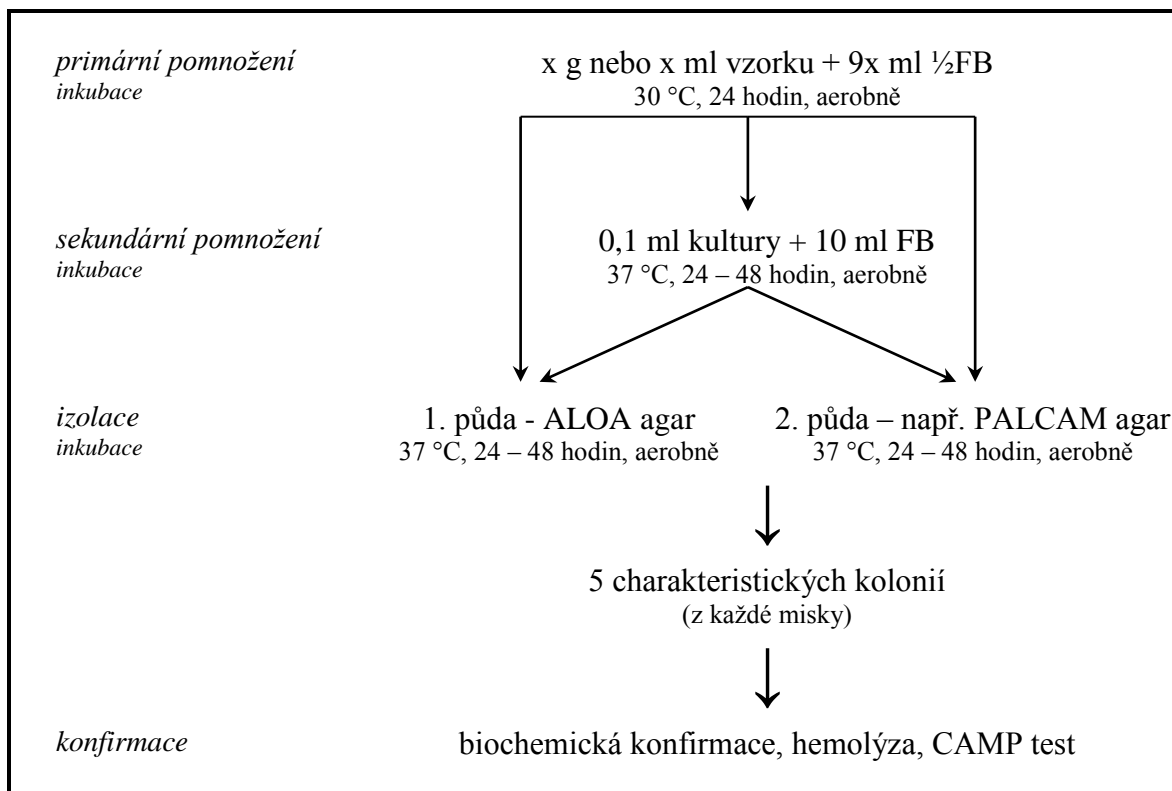


Schéma 17: Průkaz bakterií *Listeria monocytogenes* v potravinách.

Tabulka 7: Reakce k identifikaci druhů rodu *Listeria*.

| Druh | Hemolýza | Tvorba kyseliny | | CAMP test | |
|-------------------------|----------|-----------------|--------|------------------|------------------|
| | | rhamnóza | xylóza | <i>S. aureus</i> | <i>R. equi</i> * |
| <i>L. monocytogenes</i> | + | + | - | + | - |
| <i>L. innocua</i> | - | V | - | - | - |
| <i>L. ivanovii</i> | + | - | + | - | + |
| <i>L. seeligeri</i> | (+) | - | + | (+) | - |
| <i>L. welshimeri</i> | - | V | + | - | - |
| <i>L. grayi</i> | - | - | - | - | - |

V – variabilní reakce; (+) slabá reakce; * *Rhodococcus equi*

4.3.2. Metoda stanovení počtu *Listeria monocytogenes*

V některých případech je vyšetření potravin zaměřeno na stanovení počtu *L. monocytogenes*. Nejnižší počet *L. monocytogenes* stanovitelný touto metodou je 10 KTJ v 1 ml tekutého vzorku nebo 100 KTJ v 1 g ostatních vzorků.

4.3.2.1. Princip metody

Zkoušený vzorek se inokuluje do tekuté resuscitační půdy – **pufrovaná peptonová voda** (PPV médium) nebo **poloviční bujón podle Frasera** (½FB médium). Resuscitace probíhá aerobně při teplotě 20 °C po dobu 1 hodiny. Následně se určený objem výchozí suspenze vzorku či desetinásobných ředění roztírá na agarovou živnou půdou v Petriho miskách. Jako arbitrážní půda je určen **agar pro listerie podle Ottavianiho a Agostiho** (ALOA agar). Inokulované plotny se inkubují aerobně při 37 °C, po dobu 24 – 48 hodin. Poté se provede konfirmace vybraných charakteristických kolonií a úprava počtu kolonií na miskách podle výsledku konfirmace. Z počtu potvrzených suspektních kolonií se vypočte počet *L. monocytogenes* v 1 ml nebo 1 g vzorku.

4.3.2.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek, obvykle 25 g nebo 25 ml. Jako ředící roztok pro přípravu výchozí suspenze použijeme devítinásobné množství, tj. 225 ml resuscitační půdy – PPV nebo ½FB. Kultivujeme aerobně, 1 hodinu při teplotě 20 °C.
- Po ukončení resuscitace můžeme dle potřeby provést naředění výchozí suspenze.
- Výchozí suspenzi vzorku, příp. její desetinásobná ředění, očkujeme roztěrem na povrch ALOA agaru v Petriho miskách, a to vždy jinou sterilní pipetou 1 ml na řádně označenou misku o průměru 140 mm, příp. rozdělíme 1 ml inokula na 3 Petriho misky o průměru 90 mm (cca 0,33 ml na jednu Petriho misku) a při hodnocení sečteme počty na těchto 3 miskách dohromady.
- Inokulované misky necháme zaschnout po dobu asi 15 minut při laboratorní teplotě, následně je obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 – 48 hodin.
- **Alternativní metoda:** Není-li požadováno vyšetření 1 ml vyšetřovaného vzorku, potom provedeme obvyklým způsobem roztěr 0,2 ml souběžně na dvě řádně označené Petriho misky.

4.3.2.3. Konfirmace a hodnocení výsledků

Při hodnocení zaznamenáváme počet typických kolonií *L. monocytogenes*. První odečítání provádíme po 24 hodinách, výsledný počet se zjistí po ukončení inkubace, tj. po 48 hodinách. Pro hodnocení použijeme misky obsahující méně než 150 kolonií, přičemž alespoň jedna z ploten obsahuje nejméně 15 kolonií. Po spočítání kolonií vybereme z každé plotny 5 charakteristických kolonií pro konfirmaci (provedení viz kapitola 4.3.1.3.). Počet kolonií na misce upravíme podle procentuálního podílu konfirmovaných kolonií *L. monocytogenes* z celkového počtu kolonií vybraných pro konfirmaci. Výpočet provedeme obvyklým způsobem, počet *L. monocytogenes* vyjádříme jako počet KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku.

V případě, že na hodnocených plotnách vyrostlo méně než 15 suspektních kolonií, stanoví se počet KTJ *L. monocytogenes* po konfirmaci následujícím způsobem: aritmetický průměr počtu kolonií *L. monocytogenes* / (objem inokula × faktor ředění výchozí suspenze).

Jestliže na plotnách nebyly zjištěny žádné suspektní kolonie, vyjádří se výsledek takto: méně než 1 / (objem inokula × faktor ředění výchozí suspenze) *L. monocytogenes* v 1 ml nebo 1 g.

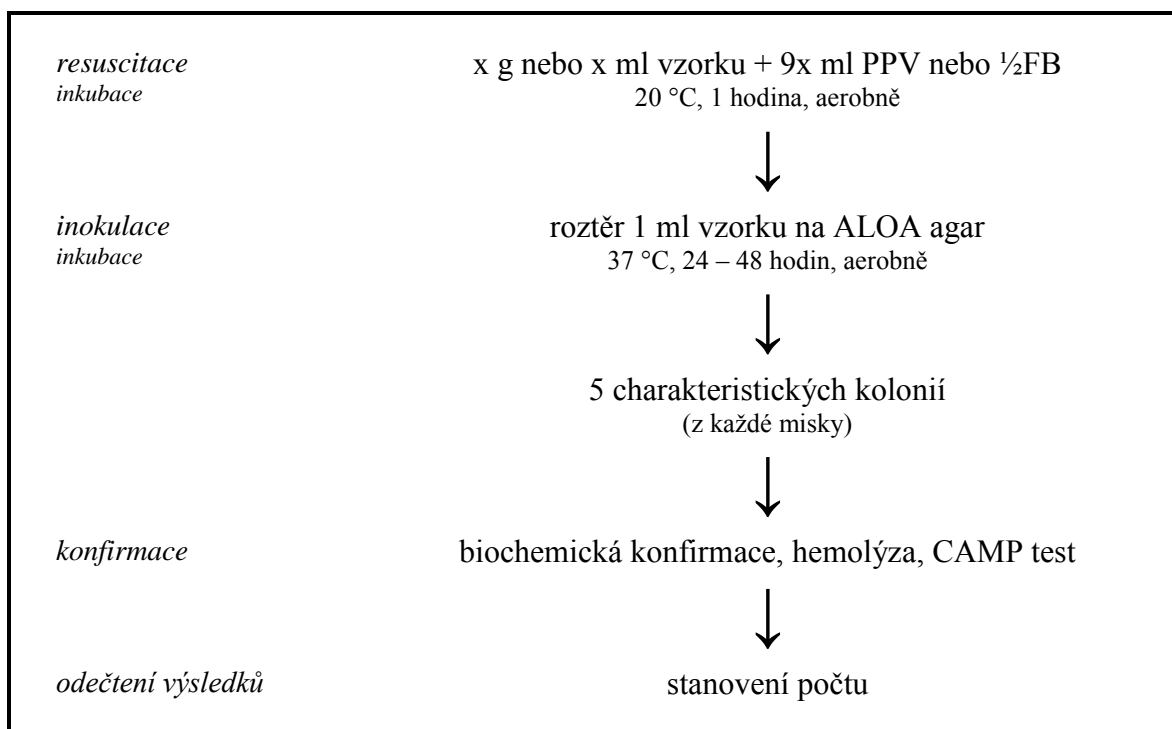


Schéma 18: Stanovení počtu bakterií *Listeria monocytogenes* v potravinách.

4.4. Stanovení *Escherichia coli* O157

Na rozdíl od běžných *E. coli* mají kmeny sérotypu O157 odlišné růstové a biochemické vlastnosti. Optimální teplota růstu tohoto sérotypu se pohybuje v rozmezí 30 – 42 °C, naopak špatně rostou při teplotách 44 – 45,5 °C a pod 10 °C. Kmeny sérotypu O157 nemají enzym β -D-glukuronidázu a nejsou schopny fermentovat D-sorbitol, obě uvedené vlastnosti jsou významné pro jejich detekci.

Escherichia coli je nejběžnější fakultativně anaerobní mikroorganismus gastrointestinálního traktu teplokrevných zvířat a člověka. Některé sérotypy jsou významné patogeny lidí i zvířat. Na základě průběhu onemocnění, vlastností kmenů, zastoupení jednotlivých faktorů virulence, účinku na buněčné kultury a sérologické typizace je popisováno 5 hlavních skupin patogenních *E. coli*, mezi nimiž dominují shigatoxinproduktující kmeny (STEC, resp. verotoxinproduktující - VTEC).

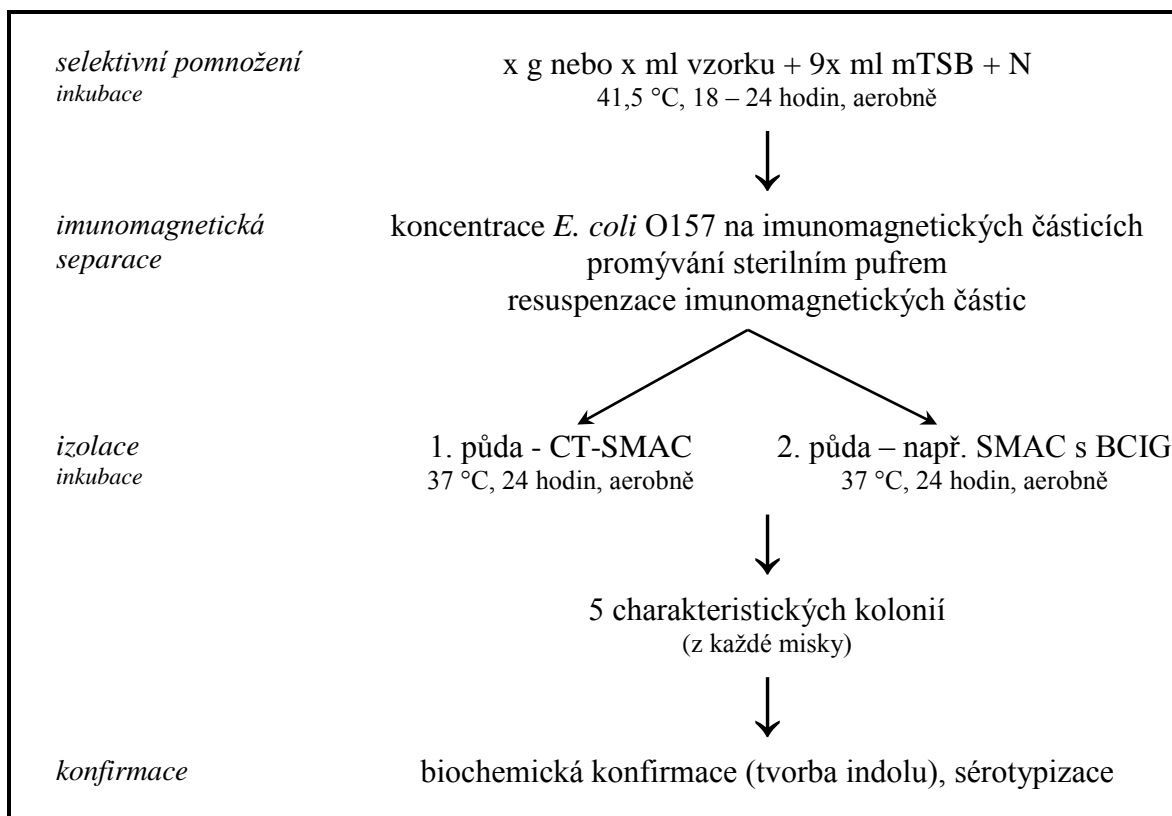
Zvířecí bacilonosiči i nemocná zvířata kontaminují prostředí (voda, krmiva, hnojená půda, statková hnojiva), v němž se *E. coli* dále pomnožuje. Z těchto zdrojů se infikují další zvířata. K přenosu infekce EHEC na člověka dochází nejčastěji kontaminovanými tepelně neopracovanými či nedostatečně opracovanými potravinami živočišného, především hovězího původu (neúplně propečené hamburgery), dalším vehikulem mohou být nepasterizované mléko a mléčné výrobky. Nejznámějším sérotypem je *E. coli* O157:H7.

Stanovení *Escherichia coli* O157 v potravinách se provádí kvalitativně, tzn. jedná se průkaz nebo vyloučení přítomnosti *E. coli* O157 v předepsané navážce vzorku, obvykle 25 g nebo 25 ml. Ke kultivaci se používá selektivní pomnožovací médium a dále selektivní pevné půdy obsahující látky inhibující růst doprovodné mikroflóry (např. chlorid sodný, žlučové soli, krystalová violet, teluričitan draselný, antibiotika – novobiocin, cefixim) a dále sorbitol. Suspektní kolonie jsou konfirmovány biochemicky a sérologicky.

4.4.1. Metoda průkazu *Escherichia coli* O157

Průkaz *Escherichia coli* O157 vyžaduje 4 po sobě jdoucí stupně:

- **pomnožení** zkušební vzorku, který se homogenizuje v modifikovaném bujónu s enzymaticky natráveným kaseinem a sójou a s přidavkem novobiocinu (mTSB + N), inkubace probíhá aerobně při 41,5 °C po dobu 18 – 24 hodin.
- **koncentraci a separaci** zjišťovaných bakterií pomocí imunomagnetických částic, na jejichž povrch byla nanášena protilátka vůči antigenu O157.
- **izolaci** imunomagnetických částic s adherovanými bakteriemi subkultivací na MacConkey agar s cefiximem, teluričitanem draselným a sorbitolem (CT-SMAC) a dále na druhé selektivní půdě (např. SMAC s BCIG, chromogenní agar). Vyočkování imunomagnetických částic se provádí sterilní bakteriologickou kličkou, inokulované plotny se obvykle inkubují aerobně při 37 °C po dobu 18 – 24 hodin.
- **konfirmaci** sorbitol negativních kolonií z půdy CT-SMAC (průhledné, bezbarvé až světle žlutohnědé kolonie o průměru asi 1 mm) a typických kolonií z druhé kultivační půdy, a to na základě tvorby indolu a aglutinace s antisérem vůči antigenu O157 a je-li k dispozici i s antisérem pro bičíkový antigen H7. Na základě výsledků konfirmace potvrdíme nebo vyloučíme přítomnost *Escherichia coli* O157 v navážce vyšetřovaného vzorku.

Schéma 19: Průkaz bakterií *Escherichia coli* O157 v potravinách.

4.5. Stanovení *Cronobacter sakazakii*

Cronobacter sakazakii (dříve *Enterobacter sakazakii*) je řazen do rodu *Cronobacter*, čeled *Enterobacteriaceae* a patří mezi tzv. koliformní bakterie. Příslušníci tohoto rodu jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní, nesporotvorné tyčinky. Tvoří běžnou součást střevní mikroflóry zvířat a některých ptáků, v lidském střevě se obvykle nevyskytují. *Cronobacter sakazakii* vyvolává u novorozenců velmi těžká onemocnění - zejména meningitidy, bakteriemie a meningoencephalitidy. Nejčastějším zdrojem bývá sušené počáteční kojenecké mléko.

Stanovení *Cr. sakazakii* v potravinách se provádí kvalitativně, tzn. jedná se o průkaz nebo vyloučení jeho přítomnosti v předepsané navážce vzorku. Ke kultivaci se používají neselektivní pomnožovací média a dále selektivní tekuté půdy obsahující látky inhibující růst doprovodné mikroflóry (např. vancomycin), k vlastní izolaci se používají chromogenní půdy. Suspektní kolonie jsou konfirmovány na základě tvorby žlutého pigmentu a vybraných biochemických reakcí.

4.5.1. Metoda průkazu *Cronobacter sakazakii*

Průkaz bakterií *Cronobacter sakazakii* zahrnuje 4 po sobě jdoucí stupně: předpomnožení v neselektivní tekuté půdě, pomnožení v selektivní tekuté půdě, izolaci a konfirmaci.

4.5.1.1. Princip metody

Zkoušený vzorek se inokuluje do tekuté půdy pro neselektivní pomnožení – **pufrovaná peptonová voda** (PPV médium), a inkubuje se aerobně při 37 °C po dobu 16 – 20 hodin. Získaná kultura se přeočkuje do tekuté selektivní půdy – **modifikovaná laurylsulfát tryptózová půda s vancomycinem** (mLST médium) a inkubuje se aerobně při 44 °C po dobu 24 hodin. Ze selektivního pomnožení se provádí vyočkování na pevnou chromogenní

půdu – *Enterobacter sakazakii* **izolační agar** (ESIA agar) nebo jiná chromogenní půda poskytující shodné výsledky (např. HiChrome *Ent. sakazakii* agar, CHES). Inokulované misky se inkubují aerobně při 44 °C po dobu 24 hodin a zjišťuje se přítomnost typických kolonií presumptivních *Cr. sakazakii*. Následně se u vybraných suspektních kolonií provede posouzení tvorby žlutého pigmentu a biochemická konfirmace. Výsledkem je průkaz přítomnosti či absence bakterií *Cronobacter sakazakii* v navázce vyšetřovaného vzorku.

4.5.1.2. Postup metody

- Neselektivní pomnožení: odebereme zkušební vzorek (obvykle 25 g nebo 25 ml) a připravíme výchozí ředění, jako ředící roztok použijeme devítinásobné množství (tj. 225 ml) PPV média. Inkubujeme aerobně v termostatu při 37 °C po dobu 16 – 20 hodin.
- Selektivní pomnožení: po ukončení inkubace přeneseme 0,1 ml výchozí suspenze do zkumavky s 10 ml mLST půdy a inkubujeme aerobně v termostatu při 44 °C po dobu 24 hodin.
- Izolace: z půdy pro selektivní pomnožení provedeme vyočkování sterilní bakteriologickou kličkou (plná klička, cca 10 µl) na chromogenní půdu (např. ESIA agar). Inokulované Petriho misky obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně v termostatu při 44 °C po dobu 24 hodin.

4.5.1.3. Konfirmace a hodnocení výsledků

Při hodnocení sledujeme nárůst kolonií charakteristických pro druh *Cronobacter sakazakii*, pro konfirmaci náhodně vybereme z každé plotny 5 charakteristických kolonií.

Kolonie vybrané pro konfirmaci subkultivujeme vyočkováním na sójový agar s tryptonem (TSA), po inkubaci sledujeme přítomnost žlutého pigmentu. Při biochemické konfirmaci standardně provedeme následující testy: průkaz oxidázy, průkaz lyzindekarboxylázy, průkaz ornitindekarboxylázy, průkaz arginindihydrolázy, průkaz fermentace různých cukrů a využití citrátu (viz. tabulka 9). Pro biochemickou konfirmaci je dovoleno použít komerční identifikační soupravy. Na základě výsledků konfirmace potvrdíme nebo vyloučíme přítomnost bakterií *Cronobacter sakazakii* v navázce vyšetřovaného vzorku.

Tabulka 8: Interpretace biochemických testů.

| Konfirmační test | Pozitivní nebo negativní reakce | % <i>E. sakazakii</i> projevujících reakci |
|--------------------------|---------------------------------|--|
| Tvorba žlutého pigmentu | + | >99 |
| Oxidáza | - | >99 |
| L-lyzindekarboxyláza | - | >99 |
| L-ornitindekarboxyláza | + | ±90 |
| L-argininhydroláza | + | >99 |
| Kyselina z | | |
| - fermentace D-sorbitolu | - | ±95 |
| - fermentace L-ramnózy | + | >99 |
| - fermentace D-sacharózy | + | >99 |
| - fermentace D-melibiózy | + | >99 |
| - fermentace amygdalinu | + | >99 |
| - hydrolýza citrátu | + | >95 |

Morfologie charakteristických kolonií:

Po 24 hodinách inkubace mají narostlé kolonie následující morfologii:

- *ESIA agar* – typické kolonie jsou malé až středně velké (1 – 3 mm), zelené až modrozelené barvy.
- *CHES agar* – typické jsou tmavě modré kolonie o průměru 1 – 3 mm.

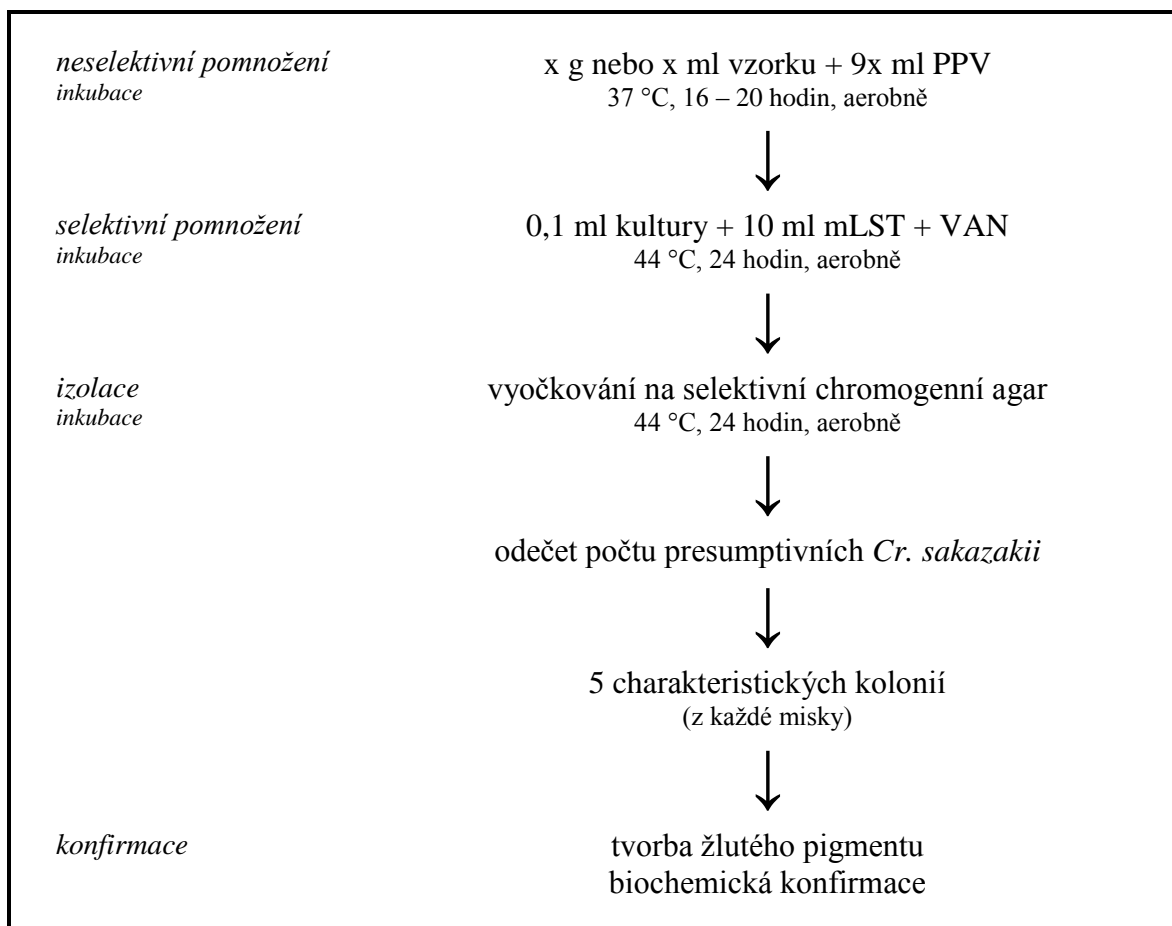


Schéma 20: Průkaz bakterií *Cronobacter sakazakii* v potravinách.

4.6. Stanovení *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens (čeleď *Clostridiaceae*) je grampozitivní, obligátně anaerobní, nepohyblivá, sporotvorná tyčinka dlouhá 3 – 9 µm. Vyskytuje se jednotlivě, ve dvojicích nebo krátkých řetězcích, spory jsou oválné, umístěné centrálně nebo paracentrálně. Klostridia jsou obecně značně biochemicky aktivní, důležitý diferenciační znak je schopnost redukovat sulfity na sirovodík. Roste při teplotách 20 – 50 °C, optimální teplota růstu je 45 °C. Vegetativní buňky nepřežívají pasterační záhřev 72 °C, spory pasteračním záhřevem poškozovány nejsou.

Clostridium perfringens je součástí normální střevní mikroflóry člověka i zvířat. Produkuje asi 13 termolabilních toxinů, přičemž alimentární otravy vyvolává převážně sérotyp A. Ke vzniku onemocnění (otravy enterotoxinem) je zapotřebí, aby se *C. perfringens* v kontaminované potravíně nejprve dostatečně pomnožilo (10^6 – 10^7 KTJ/g).

Pro stanovení klostridií se používají živná média obsahující selektivní složky inhibující růst doprovodných mikroorganismů (např. D-cykloserin), diagnostickou složkou je disiřičitan disodný (redukce na černý sulfid) a vaječný žloutek (precipitace). Na krevním agaru je růst charakterizován silnou β -hemolýzou. Kultivace probíhá za anaerobních podmínek.

4.6.1. Technika počítání kolonií – plotnová metoda

4.6.1.1. Princip metody

Určený objem tekutého vzorku či výchozí suspenze u ostatních vzorků a jejich desetinásobných ředění se zalévá agarovou živnou půdou v Petriho miskách. Jako arbitrážní půda je určen ***tryptózový agar s metabisulfitem a cykloserinem*** bez vaječného žloutku (TSC agar). Inokulované plotny se inkubují anaerobně při 37 °C po dobu 20 – 22 hodin. Následně se provede konfirmace vybraných charakteristických kolonií a úprava počtu kolonií na miskách podle výsledku konfirmace. Z počtu potvrzených suspektních kolonií vyrostlých na vybraných miskách se vypočte počet KTJ *Clostridium perfringens* v 1 ml nebo 1 g vzorku.

4.6.1.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění a tolik dalších desetinásobných ředění, aby bylo možno stanovit předpokládaný počet mikroorganismů.
- Tekutý vzorek či výchozí suspenzi ostatních vzorků očkujeme vždy jinou sterilní pipetou po 1 ml souběžně do dvou sterilních řádně označených Petriho misek.
- Inokulum v každé Petriho misce přelijeme asi 15 ml TSC agaru vytemperovaného na 45 ± 2 °C, důkladně krouživým pohybem promícháme a necháme utuhnout na chladné vodorovné ploše. Po úplném utužení se povrch zaočkované půdy přelije asi 10 ml téže půdy.
- Po ztuhnutí agarové půdy Petriho misky umístíme víčkem vzhůru do anaerostatu a inkubujeme anaerobně při teplotě 37 °C po dobu 20 – 22 hodin, delší inkubace může vést k nadměrnému zčernání půdy.

4.6.1.3. Konfirmace a hodnocení výsledků

Pro hodnocení použijeme misky obsahující 10 – 150 kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Po spočítání kolonií vybereme z každé Petriho misky 5 charakteristických kolonií pro konfirmaci.

Konfirmace vybraných kolonií spočívá v jejich naočkování do tekuté thioglykolátové půdy, inkubace probíhá za anaerobních podmínek při 37 °C po dobu 18 – 24 hodin. Poté sterilní pipetou neprodleně přeneseme pět kapek kultury do půdy s laktózou a sulfitem (LS médium) a inkubujeme aerobně ve vodní lázni při 46 °C po dobu 18 – 24 hodin. Po ukončení inkubace hodnotíme fermentaci laktózy s tvorbou plynu a redukcí sulfitu, tj. vznik černě zbarveného precipitátu sulfidu železnatého. Mezi další konfirmační testy patří: redukce nitrátů, test na pohyblivost a hydrolýza želatiny.

Počet kolonií na Petriho miskách upravíme podle procentuálního podílu konfirmovaných kolonií z celkového počtu kolonií vybraných pro konfirmaci. Výpočet provedeme obvyklým způsobem, počet *Clostridium perfringens* vyjádříme jako počet KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku.

Morfologie charakteristických kolonií:

Po 20 hodinách kultivace mají kolonie *Clostridium perfringens* na TSC agaru černou barvu a jsou obklopeny černou zónou.

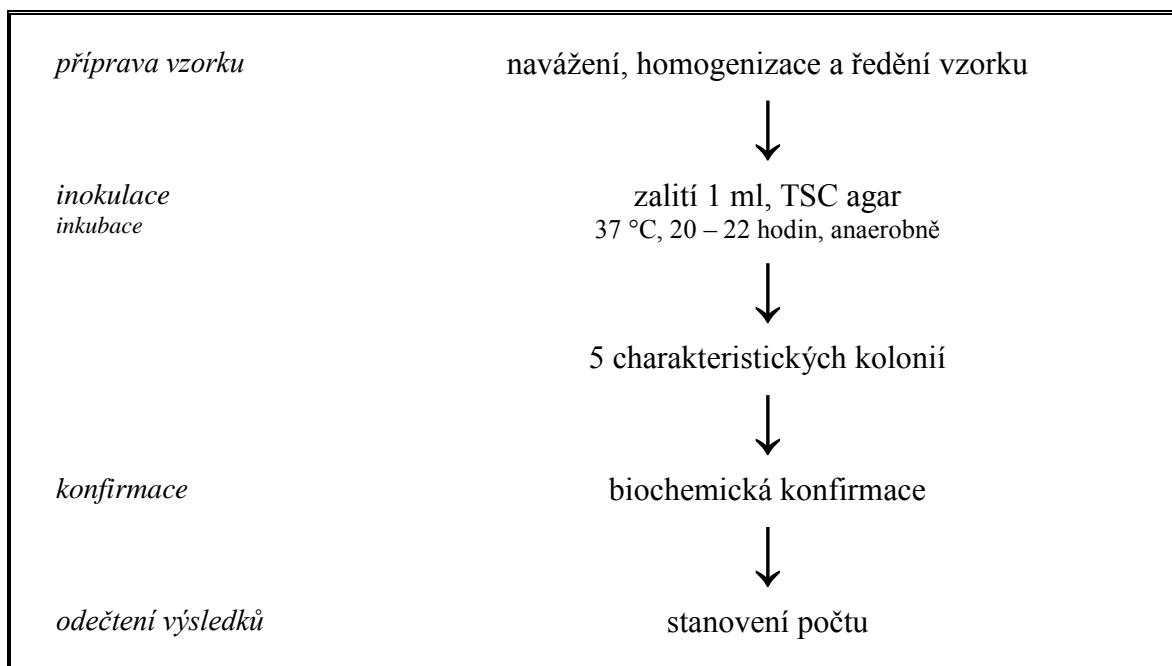


Schéma 21: Stanovení počtu bakterií *Clostridium perfringens* v potravinách.

B: Významní původci alimentárních intoxikací

4.7. Stanovení *Staphylococcus aureus*

Baktérie *Staphylococcus aureus* (čeleď *Staphylococcaceae*) jsou to grampozitivní, fakultativně anaerobní koky o průměru 0,5 – 1 µm vyskytující se nejčastěji v hroznovitých shlucích. Jsou nepohyblivé, kataláza pozitivní, na neselektivních půdách tvoří nejčastěji okrově či žlutě zbarvené kolonie, způsobují úplnou hemolýzu, koagulují krevní plazmu. Rostou při teplotách 10 až 45 °C, optimální rozmezí je 30 – 37 °C. Rostou v bujónu s 10 % NaCl a přežívají i při nízké aktivitě vody v prostředí (a_w 0,86). Stafylokoky jsou obecně rezistentní k vyšším teplotám, přežívají záhřev na 60 °C po dobu více než 30 minut.

Stafylokoky se běžně vyskytují jako saprofyty a komenzálové kůže a sliznic teplokrevných zvířat a člověka. Staphylococcus aureus je patogenní mikroorganismus způsobující zánětlivá onemocnění u lidí i zvířat, jedná se např. o hnisavé záněty kůže, sliznice dýchacích cest, mléčné žlázy, atd. Kontaminace potravin bakteriemi S. aureus může významně ovlivnit jejich zdravotní nezávadnost. Stafylokoky se v potravinách dobře rozmnožují a za vhodných podmínek mohou toxigenní kmeny produkovat stafylokokové enterotoxiny, které po požití kontaminované potraviny vyvolávají alimentární intoxikaci – stafylokokovou enterotoxikózu.

Pro stanovení *S. aureus* se používají živná média obsahující selektivní složky inhibující růst doprovodných mikroorganismů, např. 5,5 – 10 % NaCl, azid sodný, teluricitan draselný, chlorid lithný či některá antibiotika – polymyxin, neomycin. Diagnostickou složkou je většinou vaječný žloutek, příp. fibrinogen a králičí plazma. Pro stanovení počtu se běžně používají plotnové metody. U vzorků s očekávaným nízkým počtem *S. aureus* lze

použít metodu MPN. Pro stanovení stafylokokových enterotoxinů ve vzorcích potravin lze použít imunologické metody např. ELFA, RPLA nebo ELISA (viz I. díl skript).

4.7.1. Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera

Tato metoda slouží ke zjištění počtu koagulázopozitivních stafylokoků, zahrnujících enterotoxigenní kmeny. Týká se to zejména druhu *Staphylococcus aureus*, minoritně také druhu *S. intermedius* a některých kmenů *S. hyicus*.

4.7.1.1. Princip metody

Určený objem tekutého vzorku, výchozí suspenze u ostatních vzorků a jejich desetinásobných ředění se roztírá na agarovou živnou půdou v Petriho miskách. Jako arbitrážní půda je určen **Baird-Parker agar** (B-P agar) s vaječnou emulzí a teluricitanem draselným. Inokulované plotny se inkubují aerobně při 37 °C po dobu 24 – 48 hodin. Následně se provede confirmace vybraných typických a atypických kolonií (koagulázový test) a úprava počtu kolonií na miskách podle výsledku confirmace. Z počtu potvrzených suspektních kolonií vyrostlých na vybraných miskách se vypočte počet koagulázopozitivních stafylokoků, resp. *Staphylococcus aureus*, v 1 ml nebo 1 g vzorku.

4.7.1.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění a tolik dalších desetinásobných ředění, aby bylo možno stanovit předpokládaný počet mikroorganismů.
- Tekutý vzorek či výchozí suspenzi ostatních vzorků a jejich desetinásobná ředění očkujeme roztěrem na povrch B-P agaru v Petriho miskách, a to vždy jinou sterilní pipetou po 0,2 ml souběžně na dvě řádně označené misky. Doba mezi ukončením přípravy výchozí suspenze a okamžikem, kdy se inokulum roztírá na půdu, nesmí překročit 15 minut.
- Inokulované misky necháme zaschnout po dobu asi 15 minut při laboratorní teplotě, následně je obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 – 48 hodin.

4.7.1.3. Confirmace a hodnocení výsledků

Při hodnocení zaznamenáváme počet typických i atypických kolonií. První odečítání provádíme po 24 hodinách, výsledný počet se zjistí po ukončení inkubace, tj. po 48 hodinách. Pro hodnocení použijeme misky obsahující ne více než 300 kolonií včetně 150 typických či atypických ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Je nutné, aby jedna z těchto misek obsahovala alespoň 15 kolonií. Po spočítání kolonií vybereme z každé plotny charakteristické kolonie pro confirmaci. Obecně vybíráme 5 typických kolonií, jsou-li přítomny pouze typické kolonie, nebo 5 atypických kolonií, jsou-li přítomny pouze atypické kolonie, nebo 5 typických a 5 atypických, jsou-li přítomny oba typy.

Confirmace vybraných kolonií spočívá v provedení koagulázového testu. Vybraná kolonie se sterilní bakteriologickou kličkou přenese do zkumavky s mozkosrdcovou infuzí a inkubuje se při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Poté se ve sterilní zkumavce smíchá 0,1 ml suspenze a 0,3 ml králičí plazmy a inkubuje se při teplotě 37 °C. Po 4 – 6 hodinách, resp. 24 hodinách, sledujeme zda došlo ke koagulaci více než poloviny přidané plazmy. Současně provedeme negativní kontrolu se sterilní mozkosrdcovou infuzí.

Jestliže alespoň 80 % z vybraných kolonií dané misky je koagulázopozitivních, počet kolonií na misce nijak neupravujeme. V ostatních případech se počet kolonií na misce upraví podle procentuálního podílu koagulázopozitivních kolonií z celkového počtu kolonií vybraných pro potvrzení. Výpočet provedeme obvyklým způsobem, počet koagulázopozitivních stafylokoků, resp. *Staphylococcus aureus*, vyjádříme jako počet KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku.

Morfologie charakteristických kolonií:

Po 24 hodinách kultivace mají kolonie narostlé na B-P agaru následující morfologii:

- *typické kolonie* – kolonie černé nebo černošedé barvy, lesklé a vypouklé, o průměru 1 – 1,5 mm, obklopené zónou projasnění, v zóně projasnění se může objevit opalescentní prstenec;
- *atypické kolonie* – kolonie černé, lesklé, s úzkým bílým okrajem nebo bez něj, zóna projasnění a opalescentní prstenec chybí nebo jsou sotva viditelné anebo šedé kolonie bez zóny projasnění.

4.7.2. Technika s použitím agarové půdy s králičí plazmou a fibrinogenem

Tato metoda se přednostně používá pro vyšetření potravin u kterých se předpokládá kontaminace stafylokoky vytvářejícími na B-P agaru atypické kolonie či průvodní mikroflórou, která může znesnadnit odečet kolonií. Ke kultivaci vzorku či jeho desetinasobných ředění se využívá technika zalévání inokula **agarovou půdou s králičí plazmou a fibrinogenem** (RPF agar), a to v množství 1 ml souběžně na dvě Petriho misky. Inokulované misky se inkubují aerobně při teplotě 37 °C po dobu 24, příp. 48 hodin. Koagulázopozitivní stafylokoky vytvářejí černé, šedé nebo dokonce bílé malé kolonie obklopené zónou precipitace, která indikuje koagulázovou aktivitu. Počet koagulázopozitivních stafylokoků, resp. *Staphylococcus aureus*, vyjádříme jako počet KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku.

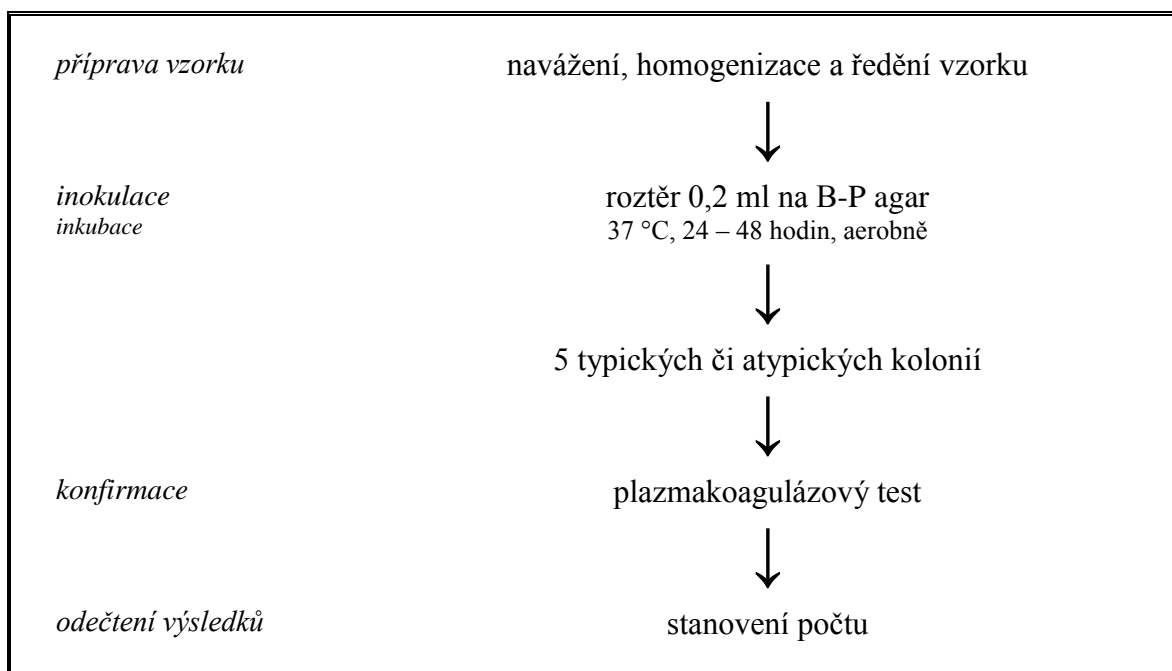


Schéma 22: Stanovení počtu bakterií *Staphylococcus aureus* v potravinách.

4.8. Stanovení *Bacillus cereus*

Bacillus cereus (čeleď *Bacillaceae*) je grampozitivní, aerobní a fakultativně anaerobní, sporotvorná tyčinka dlouhá 3 – 5 μm . Vyskytuje se jednotlivě, ve dvojicích nebo řetězcích, spory jsou eliptické a umístěné centrálně. *B. cereus* je pohyblivý, vytváří velké suché a drsné kolonie s nepravidelnými okraji, způsobuje úplnou hemolýzu. Optimální teplota růstu *B. cereus* je 30 °C, technologicky a hygienicky významné jsou psychrotrofní biotypy schopné růstu při nízkých teplotách (6 až 10 °C). Vegetativní buňky nepřežívají pasterační záhřev na teplotu 72 °C, spóry pasterační teploty běžně přežívají, naopak mohou být tímto záhřevem aktivovány ke klíčení. Inaktivace spór probíhá až při sterilizačních teplotách, např. 134 °C při UHT ošetření mléka či 121 °C – sterilizační teplota v autoklávu.

Bacillus cereus je saprofyt, který běžně roste na zbytcích rostlin v půdě, v hnoji a v krmivech. Důležitým zdrojem kontaminace jsou i spóry vyskytující se v ovzduší. Jeho význam spočívá jednak v produkci proteolytických a lipolytických enzymů schopných štěpit základní složky potravin a tím působit jejich nežádoucí změny. Tyto enzymy jsou termorezistentní a uchovávají si aktivitu i po tepelném ošetření potravin. Mimo to je významným patogenním mikroorganismem a původcem alimentárních intoxikací. *B. cereus* produkuje několik toxinů, vyvolávajících 2 etiologicky odlišné typy onemocnění – forma diarhogenní a emetická.

Pro stanovení *B. cereus* se používají živná média obsahující selektivní složky inhibující růst doprovodných mikroorganismů (např. zvýšená koncentrace NaCl, polymyxin B), diagnostickou složkou je většinou vaječný žloutek (precipitace) a manitol, který *B. cereus* nefermentuje. Na krevním agaru roste v charakteristických koloniích obklopených různě širokou zónou β -hemolýzy.

4.8.1. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C

Touto metodou je stanoven počet tzv. presumptivních *Bacillus cereus*, tedy předpokládaných příslušníků tohoto druhu. Použitými konfirmačními testy totiž nelze odlišit *B. cereus* od blízkce příbuzných, ale řidčeji se vyskytujících druhů rodu *Bacillus* – *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephaniensis* a *B. mycoides*.

4.8.1.1. Princip metody

Určený objem tekutého vzorku, výchozí suspenze u ostatních vzorků a jejich desetinásobných ředění se roztírá na agarovou živnou půdou v Petriho miskách. Jako arbitrážní půda je určen **Mannitol Yolk Polymyxine B agar** (MYP agar). Inokulované plotny se inkubují aerobně při 30 °C po dobu 24 – 48 hodin. Následně se provede konfirmace vybraných charakteristických kolonií a úprava počtu kolonií na miskách podle výsledku konfirmace. Z počtu potvrzených suspektních kolonií vyrostlých na vybraných miskách se vypočte počet KTJ presumptivních *Bacillus cereus* v 1 ml nebo 1 g vzorku.

4.8.1.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění a tolik dalších desetinásobných ředění, aby bylo možno stanovit předpokládaný počet mikroorganismů.
- Tekutý vzorek či výchozí suspenzi ostatních vzorků a jejich desetinásobná ředění očkujeme roztěrem na povrch MYP agar v Petriho miskách, a to vždy jinou sterilní pipetou po 0,2 ml souběžně na dvě řádně označené misky. Doba mezi ukončením přípravy výchozí suspenze a okamžikem, kdy se inokulum roztírá na půdu, nesmí překročit 15 minut.

- Inokulované misky necháme zaschnout po dobu asi 15 minut při laboratorní teplotě, následně je obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 24 – 48 hodin.
- **Alternativní metoda:** z důvodu zvýšení detekčního limitu metody lze očkovat 1 ml inokula na řádně označenou Petriho misku o průměru 140 mm, příp. rozdělíme 1 ml inokula na 3 Petriho misky o průměru 90 mm (cca 0,33 ml na jednu Petriho misku) a při hodnocení sečteme počty na těchto 3 miskách dohromady.

4.8.1.3. Konfirmace a hodnocení výsledků

Odečítání výsledků provádíme po 24 hodinách, nejsou-li kolonie zřetelně viditelné, inkubujeme plotny dalších 24 hodin. Pro hodnocení použijeme misky obsahující ne více než 150 kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Je nutné, aby jedna z těchto misek obsahovala alespoň 15 kolonií. Po spočítání kolonií vybereme z každé Petriho misky 5 charakteristických kolonií pro konfirmaci.

Část kolonie vybrané ke konfirmaci rozočkujeme na povrch krevního agaru, po aerobní inkubaci při 30 °C po dobu 24 hodin hodnotíme hemolytickou reakci.

Jestliže je alespoň 80 % z vybraných kolonií dané misky konfirmováno jako presumptivní *B. cereus*, počet kolonií na misce nijak neupravujeme. V ostatních případech se počet kolonií na misce upraví podle procentuálního podílu konfirmovaných kolonií z celkového počtu kolonií vybraných pro konfirmaci. Výpočet provedeme obvyklým způsobem, počet presumptivních *Bacillus cereus* vyjádříme jako počet KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku.

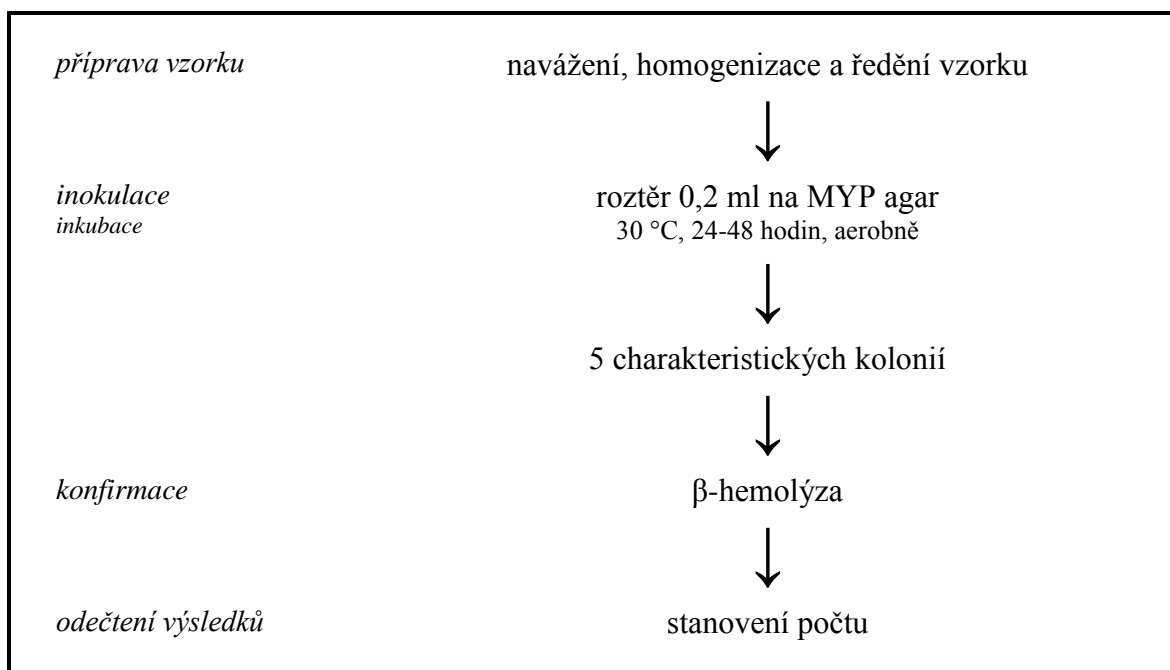


Schéma 23: Stanovení počtu presumptivních *Bacillus cereus* v potravinách.

Morfologie charakteristických kolonií:

- *MYP agar* – po 24 hodinách kultivace roste *B. cereus* ve velkých suchých drsných koloniích s nepravidelnými okraji, růžové barvy (negativní manitol), obklopených růžovou zónou precipitace. Pokud na plotnách vyrostly četné mikroorganismy, které využívají manitol za tvorby kyseliny, může být charakteristické růžové zbarvení kolonií *B. cereus* zeslabeno, nebo může zcela vymizet. Některé kmeny *B. cereus* vytvářejí málo lecitinázy, nebo ji nevytvářejí vůbec. Kolonie těchto kmenů nejsou obklopeny zónou precipitace.
- *KA* – po 24 hodinách kultivace roste *B. cereus* ve velkých suchých drsných koloniích s nepravidelnými okraji, šedé barvy, obklopených různě širokou zónou β -hemolýzy. Dále je popisován typický zápach po myšíně.

5. Doplňkové mikrobiologické vyšetřovací metody

Nezbytnou součástí mikrobiologie potravin je také znalost dalších vyšetřovacích postupů, které se v praxi rutinně používají. V následující kapitole jsou zahrnuty ty nejvýznamnější z nich.

5.1. Stanovení účinku pasterace

Pasterace je tepelné ošetření potravin, při kterém dojde k usmrcení téměř všech vegetativních forem mikroorganismů, včetně patogenních. Obecně se jedná o účinek teplot do 100 °C, nejčastěji se používají teploty v rozmezí 65 – 85 °C. Pasteraci přežívají některé termorezistentní druhy mikroorganismů a spory aerobních a anaerobních sporotvorných mikroorganismů. Na kvalitu pasterované potravin má nejvýznamnější vliv úroveň mikrobiální kontaminace suroviny, čím vyšší je počet mikroorganismů před pasterací, tím vyšší je počet mikroorganismů, které pasterační záhřev přežijí. Účinnost pasteračního záhřevu charakterizuje tzv. **pasterační efekt**, který v optimálním případě nabývá hodnoty 99,99 %.

D hodnota (decimal reduction time) označuje dobu potřebnou k tomu, aby aplikovaná konstantní teplota snížila četnost živých mikroorganismů obsažených v zahřívané potravine právě o 1 řád (tedy o 90 % nebo na 1/10). Stanovuje se obvykle v minutách a vztahuje se vždy ke konkrétní teplotě, např. $D_{85} = 4 \text{ min}$ znamená, že ke snížení původního počtu mikroorganismů na 10 % dojde při teplotě 85 °C za 4 minuty.

Tabulka 9: Závislost přežívání mikroorganismů na době působení teploty ($D_{85} = 4 \text{ minuty}$).

| Čas záhřevu v minutách | Počet přežívajících mikroorganismů |
|--------------------------|--|
| 0 minut – začátek pokusu | 1 000 000 (původní počet mikroorganismů) |
| 4 minuty | 100 000 |
| 8 minut | 10 000 |
| 12 minut | 1 000 |
| 16 minut | 100 |
| 20 minut | 10 |
| 24 minuty | 1 |

5.1.1. Stanovení vlivu pasterace na mikrobiální obraz mléka

5.1.1.1. Princip metody

Účinnost pasterace se stanoví na základě poměru počtu přežívajících mikroorganismů k jejich počtu před pasterací. Určený objem tekutého vzorku a jeho desetinásobných ředění se zalévá agarovou živnou půdou v Petriho miskách. Jako arbitrážní půda je určen **agar s glukózou, tryptonem a kvasničným extraktem** (GTK agar). Poté se vzorek napipetuje do zkumavky a zahřeje se na teplotu 72 °C po dobu 30 sekund. Po ukončení záhřevu se obsah zkumavky prudce ochladí a určený objem tekutého vzorku a jeho desetinásobných ředění se zalévá agarovou živnou půdou v Petriho miskách. Inokulované plotny se inkubují aerobně při 30 °C po dobu 72 hodin. Stanoví se pasterační efekt v % a současně se vypočítá D hodnota.

5.1.2. Postup metody

- Odebereme zkušební vzorek a připravíme výchozí ředění a tolik dalších desetinásobných ředění, aby bylo možno stanovit předpokládaný počet mikroorganismů.
- Syrové mléko a jeho desetinásobná ředění očkujeme vždy jinou sterilní pipetou po 1 ml souběžně do dvou sterilních řádně označených Petriho misek.
- Inokulum v každé Petriho misce přelijeme asi 15 ml GTK agaru vytemperovaného na teplotu 45 ± 2 °C, důkladně krouživým pohybem promícháme a necháme utuhnout na chladné vodorovné ploše. Doba mezi ukončením přípravy výchozí suspenze a okamžikem, kdy se inokulum přelévá půdou, nesmí překročit 15 minut.
- Po ztuhnutí agarové půdy Petriho misky obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin.
- Do sterilní zkumavky odpipetujeme 10 ml syrového mléka. Zkumavku uzavřeme, vložíme do vytemperované vodní lázně a její obsah zahřejeme na teplotu 72 °C po dobu 30 sekund. **Upozornění:** Do druhé zkumavky s 10 ml mléka umístíme teploměr pomocí něhož kontrolujeme průběh tepelného ošetření!
- Po ukončení záhřevu zkumavku se vzorkem ihned prudce ochladíme. Celkový počet přežívajících mikroorganismů stanovíme stejným způsobem jako celkový počet mikroorganismů v syrovém mléce (viz. výše).

5.1.3. Hodnocení výsledků

Po ukončení inkubace spočítáme kolonie narostlé na každé misce, a to bez ohledu na jejich velikost, barvu či tvar. Pro výpočet CPM použijeme misky obsahující 10 - 300 kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Vypočítáme celkový počet mikroorganismů v syrovém mléce a celkový počet mikroorganismů v mléce po pasteraci, hodnoty vyjádříme jako počet KTJ v 1 ml vzorku.

Výpočet pasteračního efektu:

$$\text{pasterační efekt [\%]} = 100 - \frac{\text{CPM}_{\text{pasterované mléko}}}{\text{CPM}_{\text{syrové mléko}}}$$

Výpočet D hodnoty:

$$D_{72} \text{ hodnota [min]} = \frac{t}{\log C_0 - \log C_1}$$

kde:

| | |
|----------------|-------------------------|
| t | čas záhřevu v minutách |
| C ₀ | CPM syrového mléka |
| C ₁ | CPM pasterovaného mléka |

5.2. Mikrobiologické vyšetření čistých mlékařských kultur

Při výrobě celé řady mléčných výrobků se používají speciální, komerčně vyráběné směsi mikroorganismů označované jako čisté mlékařské kultury (ČMK). Tyto kultury nachází uplatnění také v masném průmyslu, při konzervování zeleniny či v pekárenství. Výrobce kultur zaručuje jejich standardní aktivitu, tj. růst, metabolismus (sacharolytické a proteolytické vlastnosti, produkci aromatických látek), definované fyziologické vlastnosti, čistotu kultury a rezistenci vůči bakteriofágům. V mlékařských kulturách mohou být zastoupeny bakterie, kvasinky i plísňe. Mezi základní, nejčastěji používané kultury, patří jogurtová a smetanová kultura.

Základní mlékařskou kulturou je kultura smetanová tvořená koky – *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* a *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*. Jedná se o kulturu mezofilní s optimální teplotou růstu 22 – 25 °C po dobu 18 – 20 hodin. V mikroskopickém preparátu pozorujeme koky, diplokoky nebo krátké řetízky; optimální poměr laktokoků a leukonostoků je 9:1.

Jogurtová kultura je termofilní a tvoří ji směs bakterií *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Optimální teplota pro činnost jogurtové kultury je 43 °C, k zakysání dochází za 3,5 – 4 hodiny. V mikroskopickém preparátu pozorujeme koky, často v řetízcích, a dlouhé tyčinky; poměr koků a tyčinek je optimálně 2:1.

Mikrobiologickou kontrolu ČMK lze provádět kultivačně nebo mikroskopicky, kvalitativně či kvantitativně. Výhodou kultivačního vyšetření je průkaz pouze životaschopných bakterií, hodnota se udává jako KTJ v 1 ml kultury. Rozlišení jednotlivých druhů podle morfologie jejich kolonií je velmi obtížné. Mikroskopické vyšetření odhalí přítomnost neživotaschopných buněk pouze při speciálním barvení, proto počet mikroorganismů zjištěný mikroskopicky bývá vyšší než při kultivačním vyšetření. V obarveném preparátu lze dobře hodnotit morfologii a barvitelnost buněk a tím odhalit i případnou kontaminaci kultury.

5.2.1. Kvantitativní mikroskopické vyšetření čistých mlékařských kultur

5.2.1.1. Princip metody

Určený objem vzorku nebo jeho desetinásobných ředění se nanese na přesně definovanou plochu podložního skla. Po zaschnutí a fixaci preparátu se tento barví přehledně Löfflerovou metylenovou modří. Preparát se prohlíží pod imerzním objektivem a počítá se množství buněk v jednotlivých zorných polích. Výsledek se vyjádří jako počet buněk v 1 ml vyšetřované čisté mlékařské kultury.

5.2.1.2. Postup metody

- Vyšetřovanou kulturu po důkladném promíchání asepticky naředíme v poměru 1:9 sterilním fyziologickým roztokem (tj. ředění 10^{-1}).
- Pod čisté odmaštěné podložní skličko umístíme šablonu se čtverci o délce strany 1 cm.
- Sterilní pipetou nanese se doprostřed nad každý vyznačený čtverec 0,01 ml naředěné kultury. Sterilní bakteriologickou jehlou kulturu co nejlépe rozetřeme ve stejnoměrné vrstvě po celé ploše čtverce.

- Připravený preparát necháme volně zaschnout v bezprašném prostředí při laboratorní teplotě nebo v termostatu při 30 – 40 °C, poté fixujeme trojnásobným protažením v plameni.
- Preparát barvíme přehledně roztokem Löfflerovy metylenové modři po dobu 3 – 5 minut. Barvivo slijeme, preparát opláchneme destilovanou vodou, opatrně osušíme a pozorujeme v mikroskopu pod imerzí (objektiv 100x).
- Počítáme počet buněk v zorném poli (u jogurtové kultury zvlášť koků a tyček), mikrobiální shluky, dvojice nebo řetízky se pokládají za mikrobiální jedince. Posun objektivu provádíme hadovitým pohybem, počet polí se počítá podle obsahu mikroorganismů (viz tabulka 10).

Tabulka 10: Stanovení počtu vyšetřovaných zorných polí.

| Počet mikrobů v zorném poli | Počet vyšetřených zorných polí |
|-----------------------------|--------------------------------|
| 0 – 1 | 50 |
| 2 – 10 | 30 – 20 |
| 11 – 50 | 20 – 10 |
| 50 a více | 10 – 5 |

Výpočet počtu buněk v 1 ml vyšetřované kultury provedeme následujícím způsobem:

1. spočítáme průměrný počet buněk v zorném poli,
2. průměrný počet buněk v zorném poli násobíme konstantou mikroskopu a stupněm ředění vzorku (10^{-1} , tj. 0,1),
3. výsledek upravíme na obvyklý tvar.

Poznámka: U jogurtové kultury vyjádříme mimo celkového počtu buněk v 1 ml (pro výpočet sečteme počet koků a tyček v jednotlivých zorných polích) také poměr tyček a koků.

Příklad 25:

- u smetanové kultury bylo v zorných polích spočítáno 67, 91, 56, 83 a 49 koků, konstanta mikroskopu je 835 000
- průměrný počet koků v zorném poli činí: $(67 + 91 + 56 + 83 + 49):5 = 69,2$
- počet buněk v 1 ml kultury činí: $69,2 \times 835\,000 \times 0,1 = 5\,778\,200$, tj. $5,8 \cdot 10^6$ buněk

Příklad 26:

- u jogurtové kultury bylo v zorných polích spočítáno 42, 57, 32, 12 a 49 koků a dále 10, 23, 15, 3 a 28 tyčinek, konstanta mikroskopu je 835 000
- průměrný počet koků v zorném poli činí: $(42 + 57 + 32 + 12 + 49):5 = 38,4$
- průměrný počet tyčinek v zorném poli činí: $(10 + 23 + 15 + 3 + 28):5 = 15,8$
- průměrný počet buněk v zorném poli činí: $38,4 + 15,8 = 54,2$
- počet buněk v 1 ml kultury činí: $54,2 \times 835\,000 \times 0,1 = 4\,525\,700$, tj. $4,5 \cdot 10^6$ buněk
- poměr koků a tyčinek činí: $38,4 : 15,8$, tj. $2,4 : 1$

5.3. Mikrobiologické vyšetření pitné vody

Pitná voda je voda zdravotně nezávadná, která ani při dlouhodobém používání není příčinou zdravotních poruch a onemocnění. Pitná voda nesmí obsahovat mikroorganismy, parazity a látky jakéhokoli druhu v počtu nebo koncentraci, které by mohly ohrozit veřejné zdraví a musí splňovat hygienické limity stanovené **vyhláškou Ministerstva zdravotnictví č. 252/2004 Sb., ve znění pozdějších předpisů, kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontrol pitné vody**.

5.3.1. Odběr vzorků

Vzorek se odebírá do sterilní odběrové láhve se šroubovacím uzávěrem (vzorkovnice) o objemu 500 ml. Vypouštěcí otvor, z něhož se vzorkuje, se sterilizuje plamenem popř. jiným způsobem srovnatelné účinnosti. Voda se nechá 2 – 3 minuty stejnoměrně odtékat. Poté se následně napustí do vzorkovnice potřebné množství vzorku. Láhev se otevírá těsně před odběrem, plní se přímo bez vyplachování a mezi hladinou a zátkou se ponechá asi 2 cm vzduchový prostor.

Ze studny bez čerpacího zařízení se vzorek odebere spuštěním odběrové láhve do studny. Tato láhev musí být vysterylizována v obalu z hliníkové folie, který se odstraní těsně před odběrem.

Vzorky se dopraví do laboratoře v co nejkratší době v přepravních boxech a pokud je to možné, teplota okolí se má udržet mezi 1 – 5 °C. Zpracují se nejpozději do 24 hod. V laboratoři musí být vzorky uskladněny při teplotě 1 až 5 °C.

5.3.2. Vlastní rozbor

Platná vyhláška stanovuje minimální roční četnost odběru vzorků pitné vody včetně rozsahu rozborů – tj. počet vzorků pro krácený rozbor a počet vzorků pro úplný rozbor. Úplný rozbor zahrnuje 62 mikrobiologických, biologických, fyzikálních, chemických a organoleptických ukazatelů. V případě kráceného rozboru je počet ukazatelů snížen na 23. Účelem krácených rozborů je získat pravidelné informace o stabilitě vodního zdroje a účinnosti úpravy vody.

Hygienické limity pro pitnou vodu jsou platnou legislativou vyjádřeny formou **mezních hodnot** (MH) a **nejvyšších mezních hodnot** (NMH). U nevýznamného překročení mezních hodnot mohou být nápravná opatření prováděna až po potvrzení výsledku opakovaným rozбором. V případě překročení ukazatelů s nejvyšší mezní hodnotou nemůže být voda označena za pitnou a nápravná opatření jsou činěna neprodleně.

Mikrobiologické ukazatele a jejich hygienické limity stanovené při úplném rozboru pitné vody používané v potravinářském zařízení, pitné vody dodávané z rozvodné sítě a pitné vody dodávané ze studní jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 11: Mikrobiologické ukazatele stanovené při úplném rozboru pitné vody.

| Ukazatel | Jednotka | Limit | Typ limitu |
|-------------------------|------------|-------|------------|
| enterokoky | KTJ/100 ml | 0 | NMH |
| <i>Escherichia coli</i> | KTJ/100 ml | 0 | NMH |
| koliformní bakterie | KTJ/100 ml | 0 | MH |
| počet kolonií při 22 °C | KTJ/ml | 200 | MH |
| počet kolonií při 36 °C | KTJ/ml | 20 | MH |

Při kráceném rozboru pitné vody používané v potravinářském zařízení, pitné vody dodávané z rozvodné sítě a pitné vody dodávané ze studní se stanovují: *Escherichia coli*, koliformní bakterie, počty kolonií při 22 °C, počty kolonií při 36 °C. Ačkoli to platná legislativa nevyžaduje, i v případě kráceného rozboru stanovuje řada laboratoří také enterokoky.

Pro účely rozboru vod lze považovat enterokoky a *E. coli* za indikátory fekálního znečištění. Výskyt koliformních bakterií není vždy důkazem fekálního znečištění, protože některé koliformní bakterie se běžně vyskytují v půdě a povrchových sladkých vodách a nejsou vždy intestinálního původu. Koliformní bakterie mohou pouze indikovat závady při úpravě vody či její distribuci. Stanovení počtu kolonií při 22 °C a při 36 °C je účelné pro posouzení čistoty podzemních vod a účinnosti procesů úpravy vody, jako je koagulace, filtrace a dezinfekce, a indikuje čistotu a neporušenost distribučního systému. Hlavní význam stanovení počtu kolonií spočívá v detekci změn očekávaných hodnot v průběhu dlouhodobého sledování. Každé náhlé zvýšení počtu organismů může být včasným varováním před vážným znečištěním a vyžaduje okamžité opatření.

U kráceného i úplného rozboru v případě pitných vod upravovaných přímo z **vod povrchových** nebo u podzemních vod ovlivněných povrchovými vodami se stanovuje *Clostridium perfringens*. Platná vyhláška stanovuje další mikrobiologické ukazatele (např. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, atypická mykobakteria, legionely) s hygienickými limity pro **balenou pitnou vodu**, vodu dodávanou pro **náhradní zásobování a teplou vodu**.

5.3.3. Metody rozboru



Obr. 16: Umístění filtru do filtrační aparatury.

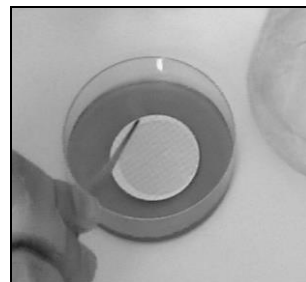
Stanovení koliformních bakterií a *Escherichia coli* se provádí metodou membránových filtrů (póry o velikosti 0,45 µm). Filtruje se 100 ml vzorku. Filtry se kladou na povrch agarů s tergitolem (TTC). Inkubace se provádí aerobně při 37 °C po dobu 24 hod. Typické laktózapozitivní kolonie vykazují tvorbu žlutého zbarvení média pod membránovým filtrem. Následnou biochemickou charakterizací se stanoví počet kolonií koliformních bakterií a *E. coli*. Jako koliformní bakterie se počítají všechny kolonie, které mají negativní oxidázový test. Jako *E. coli* se počítají všechny kolonie, které mají negativní oxidázový test a pozitivní test na tvorbu indolu (viz schéma 24). Jejich počet na membránovém filtru se vyjádří jako KTJ ve 100 ml vzorku.

Stanovení enterokoků se provádí metodou membránových filtrů (póry o velikosti 0,45 µm). Filtruje se 100 ml vzorku. Filtry se kladou na povrch Slanetz-Bartley agarů (S-B). Inkubace se provádí aerobně při 37 °C po dobu 48 hod. Typické kolonie mají hnědočervenou barvu, jejich počet na membránovém filtru se vyjádří jako KTJ ve 100 ml vzorku.

Počet kolonií při 22 °C se stanovuje metodou zalití 1 ml neředěného vzorku agarem s kvasničním extraktem. Inkubace se provádí aerobně při 22 °C po dobu 72 hod. Celkový počet kolonií vyrostlých v kultivačním médiu se vyjádří jako KTJ v 1 ml vzorku.

Počet kolonií při 36 °C se stanovuje metodou zalití 1 ml neředěného vzorku agarem s kvasničním extraktem. Inkubace se provádí aerobně při 36 °C po dobu 48 hod. Celkový počet kolonií vyrostlých v kultivačním médiu se vyjádří jako KTJ v 1 ml vzorku.

Metoda **membránových filtrů** je založena na filtraci určitého objemu vzorku vody membránovým filtrem s velikostí pórů, která je dostatečná pro zachycení bakterií. Filtr se pokládá na povrch pevného kultivačního média a po inkubaci se počítají typické kolonie (viz kapitola 2.1.3.).



Obr. 17: Umístění filtru na živnou půdu.

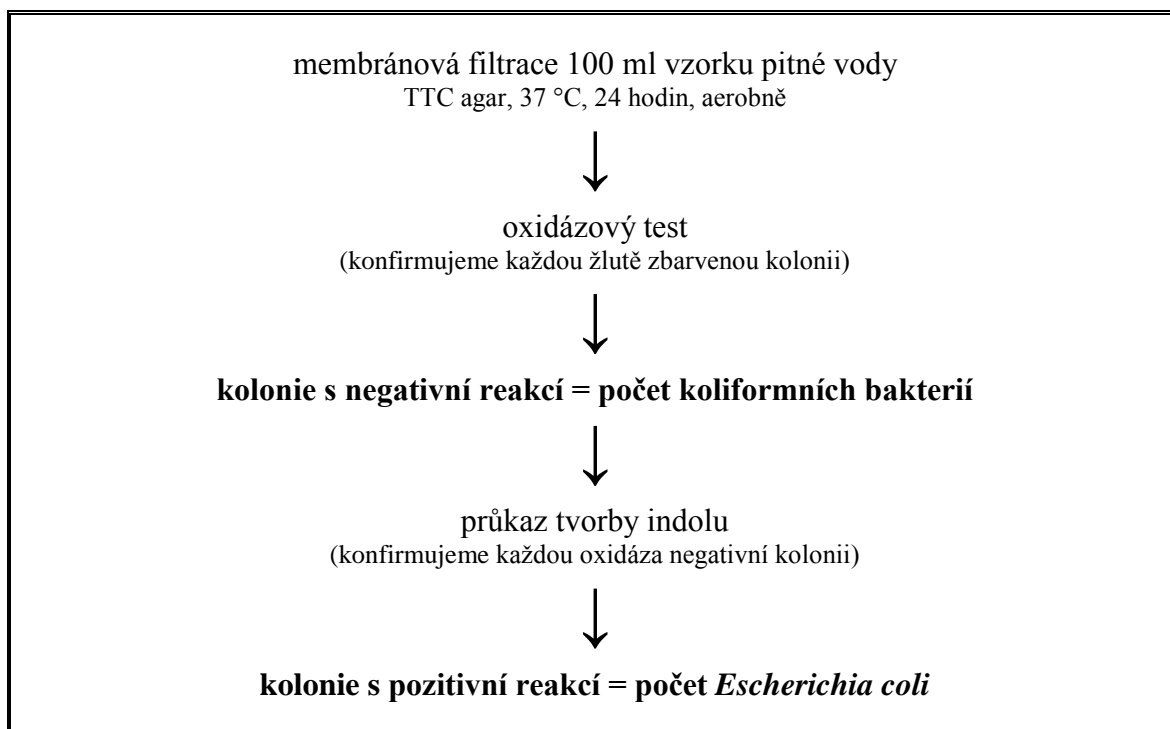


Schéma 24: Stanovení koliformních bakterií a *E. coli* v pitné vodě.

5.4. Stanovení mikrobiální kontaminace prostředí potravinářských provozů

Při výrobě potravin, jejich úpravě, přepravě a ostatní manipulaci je potřeba kontrolovat hygienickou úroveň pracovních a jiných ploch, náčiní, strojního zařízení, rukou a oděvů pracovníků, a to v návaznosti na systém HACCP. Mikrobiologická kontrola povrchů se realizuje pomocí rychlých, levných a jednoduše proveditelných metod. Využívá se ke kvantitativnímu i kvalitativnímu stanovení, hodnotit lze rovné i členité plochy.

5.4.1. Používané metody

Vzorky z povrchů lze odebrat různými metodami, v současnosti nejpoužívanějšími jsou metoda stěrová a metoda otisková (např. Hygicult®, Petrifilm™, kontaktní plotny). Z nepřímých metod potom ATP bioluminiscenční metoda či přímá epifluorescenční technika (DEFT).

Stěrová metoda vyhovuje téměř všem povrchům, postup provedení je uveden v kapitole 2.1.4. Reprodukovatelnost výsledků stěrové metody významně ovlivňuje zkušenost osoby odebírající vzorky. Zvládnutí metody vyžaduje praxi a pečlivost, odběrový tampon musí být tlčen na stíraný povrch určitým tlakem. Po odběru se musí tampon vložit do zkumavky, aniž by došlo k jeho kontaminaci. Metoda rovněž vyžaduje laboratorní zázemí pro kultivaci vzorků plotnovými metodami. Provedení stěrové metody je v porovnání s otiskovou pomalejší a vyžaduje větší zkušenost provádějící osoby. Na druhé straně jsou výsledky přesnější než je tomu u otiskové metody.

Otisková metoda (viz kapitola 2.1.6., resp. 2.1.10.) se nejlépe hodí pro rovné povrchy. Nerovný povrch (např. dřevěný povrch) může znemožnit dotek celého povrchu agarů s vyšetřovaným místem a tím odběr nereprezentativního vzorku. Otisková metoda je jednoduchá a nevyžaduje moc zkušeností. Výsledky nedosahují úrovně stěrové metody, ale pro zhodnocení hygienické úrovně vyšetřovaného povrchu jsou dostačující.

Množství bakterií stanovené stěrovou nebo otiskovou metodou je v korelaci se skutečnou úrovní kontaminace daného povrchu. Nicméně z povrchu je uvolněna pouze část přítomných bakterií, u otiskové metody je to pouze 0,1 % a u stěrové metody 10 – 40 %. Velkou měrou to závisí na charakteru vyšetřovaného povrchu. Ačkoli jak stěrová, tak otisková metoda odhalí pouze část mikroorganismů přítomných na površích, jsou tyto mikroorganismy s největší pravděpodobností těmi, které kontaminují výrobky, jež přijdou s daným povrchem do styku.

Dvojstupňová technika stěru: zkoušený povrch vymezený šablonou nejprve otíráme zvlčeným tamponem, který následně umístíme do zkumavky s 10 ml ředícího roztoku. Poté se táž plocha otírá suchým tamponem, který vložíme do téže zkumavky. Zkumavku s oběma tampony protřepáváme na Vortexu po dobu 5 sekund.

Pokud předpokládáme na zkoušeném povrchu přítomnost reziduí dezinfekčních prostředků, vzorkování provádíme nejdříve po dvou hodinách po ukončení dezinfekce a přednostně z povrchů, které již oschly. V některých případech je vhodné, aby živná média i ředící roztok obsahovaly vhodné neutralizační prostředky, např. Tween 80 a lecitin pro neutralizaci kvartérních amonných solí a amfotenzidů.

Nedílnou součástí hodnocení mikrobiologické čistoty prostředí výrobních podniků či laboratoří je také kontrola mikrobiologického zatížení ovzduší. K běžné kontrole se používá metoda spadu (viz kapitola 2.1.9.), k objektivnímu hodnocení lze využít aeroskop.

5.4.2. Hodnocení výsledků

Jednou z možností hodnocení výsledků mikrobiologického zkoušení povrchů je použití tzv. *hygienického skóre*. Jednotlivá hygienická skóre mohou mít různé hodnoty, a to v závislosti na zkoušeném povrchu.

Kontrola účinnosti čištění a dezinfekce je zahrnuta ve **vyhlášce Ministerstva zemědělství č. 289/2007 Sb. ve znění pozdějších předpisů, o veterinárních požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství**.

Podle této vyhlášky *stěry z povrchu výrobního zařízení* odebrané z plochy 10 cm² po skončení čištění a dezinfekce nesmí obsahovat:

- více než 10² aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů (CPM).
- salmonely.

5.5. Mikrobiologické vyšetření obalů a obalových materiálů

Obal hraje důležitou roli při ochraně potravin před kontaminací z vnějšího prostředí, současně však může být i zdrojem sekundární kontaminace potravin. Z tohoto důvodu musí být obaly potravin mikrobiologicky vyhovující a nesmí zhoršovat nejen mikrobiologické, ale i fyzikálně-chemické a senzorické vlastnosti potraviny. Tuto problematiku řeší **vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 38/2001 Sb. ve znění pozdějších předpisů, o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmami**.

Na základě této vyhlášky výrobky určené pro styk s potravinami nesmějí:

- a) obsahovat patogenní nebo podmíněně patogenní mikroorganismy,
- b) být zdrojem mikrobiálního znečištění potravin,
- c) narušovat žádoucí mikrobiální a enzymatické pochody v potravina.

V současné době nejsou legislativně stanoveny konkrétní limitní hodnoty mikrobiální kontaminace obalů. Obecně jsou vždy vyšší požadavky kladeny na obaly přicházející do přímého styku s potravinami oproti obalům, které do přímého styku s potravinami nepřichází. Zvláštní požadavky jsou potom kladeny na obaly, přicházející do přímého styku s výrobky dětské a kojenecké výživy.

Pro orientační zhodnocení úrovně mikrobiální kontaminace obalů lze použít následující doporučené hodnoty:

- obaly přicházející do přímého styku s potravinou: čistý obal – CPM maximálně 10² KTJ/100 cm²
- obaly nepřicházející do styku s potravinou či jen krátkodobě: čistý obal – CPM maximálně 10³ KTJ/100 cm²
- skleněné obaly: dobře umytá láhev – CPM maximálně 10¹ KTJ/1 ml výplachového roztoku

Mimo stanovení celkového počtu mikroorganismů se při vyšetření obalů věnuje pozornost také stanovení počtu plísní, a to z důvodu možného zdravotního ohrožení konzumenta jejich toxickými metabolity (mykotoxiny). U některých typů obalů (např. jedlé střevo – cutisin) je vhodné vyšetření zaměřit také na stanovení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* či koliformních bakterií.

5.5.1. Odběr vzorků

Způsob odběru vzorků se liší podle druhu a uspořádání obalů:

- *kelímky či jiné obaly, které jsou složeny do sebe ve sloupcích*: odebereme několik kusů vložených do sebe a zabalíme do sterilního papíru či polyetylenového sáčku. Odebíráme-li jednotlivé kusy, potom každý kus balíme zvlášť. Obal vzorku uzavřeme, přelepíme a označíme.
- *obalový materiál v rolích*: po odvinutí části obalu sterilním skalpelem vyřízneme několik vrstev o rozměrech cca 10 x 10 cm tak, že se nejdříve vyříznou tři strany, vyříznutá část se odklopí, uchopí do sterilní pinzety a dalším řezem se odřízne zbývající strana. Vzorek se uloží do sterilní obálky či polyetylenového sáčku, uzavře, přelepí a označí.
- *obalový materiál v balících*: sejmemе několik vrchních listů a vlastní odběr provedeme stejně jako u rolí.
- *sáčky*: odebereme několik kusů a vložíme do sterilního polyetylenového sáčku, uzavřeme přeložením okraje sáčku, přelepíme a označíme.

5.5.2. Používané metody

K vyšetřování mikrobiologické kvality obalů lze použít různé metody, přičemž použitelnost jednotlivých metod je v určitých případech dána materiálem nebo druhem obalu, popř. i jeho tvarem či velikostí.

Nejčastěji používanou a současně nejúčinnější metodou je **stěr**, který lze použít u různých druhů obalových materiálů. Při jeho provedení se doporučuje k ředicímu médiu (obvykle se používá tzv. Butterfieldův roztok) přidávat detergenční přípravek v množství 0,1 % (např. Tween 80), který umožní lepší smáčitelnost povrchu obalu a tím i vyšší záchyt mikroorganismů. Popis provedení stěrové metody je uveden v kapitole 2.1.4.

Při vyšetření kelímků stíráme navlhčeným tamponem u malých kelímků celou vnitřní plochu, u víček celou plochu, která je při uzavření obrácena dovnitř. U větších obalů se setře rýha mezi dnem a stěnou a taková část vnitřní stěny, aby celková plocha byla asi 50 cm².

Další možností je **otisková metoda**, při které můžeme využít různé druhy kontaktních ploten či otiskových nosičů (např. Hygiculty). Záchyt mikroorganismů je však u otiskové metody nejnižší. Na druhou stranu je to metoda rychlá a jednoduše proveditelná (popis metody viz kapitola 2.1.6.).

U skleněných obalů či plastových lahví a sáčků, dále přepravních obalů a nádob se provádí **metoda výplachu** (popis viz kapitola 2.1.8.).

Při vyšetření papírových obalů, různých fólií či obalů propustných pro koloidy (např. cutisin) lze využít **metody přelivu**. Nezbytným předpokladem použití této metody je schopnost obalu umožnit difúzi živných látek z půdy.

Při metodě přelivu můžeme postupovat dvojím způsobem:

- a) obal odvážíme, nastříháme na malé kousky (cca 1 x 1 cm), položíme na dno sterilní Petriho misky a přelijeme živným médiem, po ukončení kultivace počítáme kolonie vyrostlé na vnější i vnitřní ploše obalu a výsledek přepočítáme na 1 g vzorku.

- b) kousky obalu klademe na živné médium v Petriho misce a následně zalijeme tenkou vrstvou téže půdy. Výhodou tohoto způsobu je vyšší zachyt mikroorganismů na spodní straně obalu a lepší manipulace se vzorky.

U fólií či jedlých střev lze použít také **metodu oplachu**, kdy je vzorek intenzivně protřepáván v ředícím médiu s přidavkem detergentu (poměr 1:10), popis metody je uveden v kapitole 2.1.7.

K mikrobiologickému vyšetření silných papírů, zejména kartonů a lepenek je vhodné použít **dezintegrační metodu**, kdy po navážení přidáme k vzorku ředící médium a homogenizujeme ho. Výhodou je, že při dezintegrační metodě zachytíme i mikroorganismy nacházející se mezi jednotlivými vrstvami obalu, tj. vnitřní kontaminaci obalu.

5.6. Stanovení reziduí inhibičních látek

Jako inhibiční látky označujeme látky, které omezují nebo zastavují růst mikroorganismů. Screeningové mikrobiologické stanovení reziduí inhibičních látek (RIL) se provádí plotnovými metodami a komerčně vyráběnými širokospektrálními testy (např. Eclipse 50 test, BR test). Pro rychlé stanovení RIL slouží také selektivní rychlotesty, používané hlavně pro prvotní diagnostiku v mlékárenské praxi (např. Beta-Star test, Delvo-X-Press test, Snap testy, Charm ROSA testy).

Vlastní stanovení RIL je dáno **Metodickým pokynem na stanovení reziduí inhibičních látek ve tkáních, mléce, vejcích a potravinách ze dne 1. 6. 2008**, který vydala Národní referenční laboratoř SVS pro mykotoxiny a další přírodní toxiny, barviva a antibakteriální (inhibiční) látky a rezidua veterinárních léčiv.

5.6.1. Plotnové metody

Plotnové metody pracují na principu agarového difúzního testu, kdy se vzorky umístí na Petriho misku obsahující agarovou půdu inokulovanou testovacím kmenem. Růst testovacího kmene se projeví zakalením testovací agarové plotny po inkubaci. Difúze antibakteriální látky se projeví tvorbou zóny inhibice růstu testovacího kmene okolo vyšetřovaného vzorku.

K testování přítomnosti RIL se používají následující metody:

- 4-plotnová metoda (plotny č. 1 – 4)
- metoda s kmenem *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 (plotna č. 5)
- metoda s kmenem *Escherichia coli* (plotna č. 6)

5.6.1.1. Příprava testovacích ploten

Postup přípravy testovacích ploten je uveden ve zmíněném metodickém pokynu. Jednotlivá živná média se připravují dle předepsané receptury, provede se úprava pH a po sterilizaci se půda obohatí suspenzí příslušného testovacího mikroorganismu. Připravené testovací agary se dávkuje po 4 ml do předehřátých sterilních skleněných Petriho misek o průměru 90 mm, v případě metody s *Escherichia coli* v množství 5 ml. Použitelnost takto připravených ploten je 7 dnů při chladničkové teplotě, kde musí být umístěny dnem vzhůru v mikroténových sáčkách, abychom zabránili jejich vysychání.

Tabulka 12: Přehled testovacích kmenů a inkubačních podmínek.

| Bakteriální kmen | Inkubační podmínky | Plotna |
|--|-------------------------|---------|
| <i>Bacillus subtilis</i> BGA CCM 4062 | 30 °C, 24 hod., aerobně | 1, 2, 4 |
| <i>Kocuria rhizophila</i> CCM 552 | 37 °C, 24 hod., aerobně | 3 |
| <i>Geobacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> C953 CCM 5965 | 64 °C, 5 hod., aerobně | 5 |
| <i>Escherichia coli</i> CCM 7372 | 37 °C, 24 hod., aerobně | 6 |

5.6.1.2. Kontrola citlivosti testovacích ploten

Plotny 1-5: Citlivost testovacích ploten sledujeme v den přípravy použitím sterilních papírových disků o průměru 6 mm, na které přímo na plotně aplikujeme automatickou pipetou 10 µl příslušného pracovního roztoku antibiotika (PNC – penicilin, STM – streptomycin) nebo sulfonamidu (SU).

Plotna 6: V případě plotny s *E. coli* použijeme sterilní papírový disk o průměru 9 mm, na který dávkuje 30 µl pracovního roztoku ciprofloxacinu (CIP).

Tabulka 13: Kontrola citlivosti testovacích ploten.

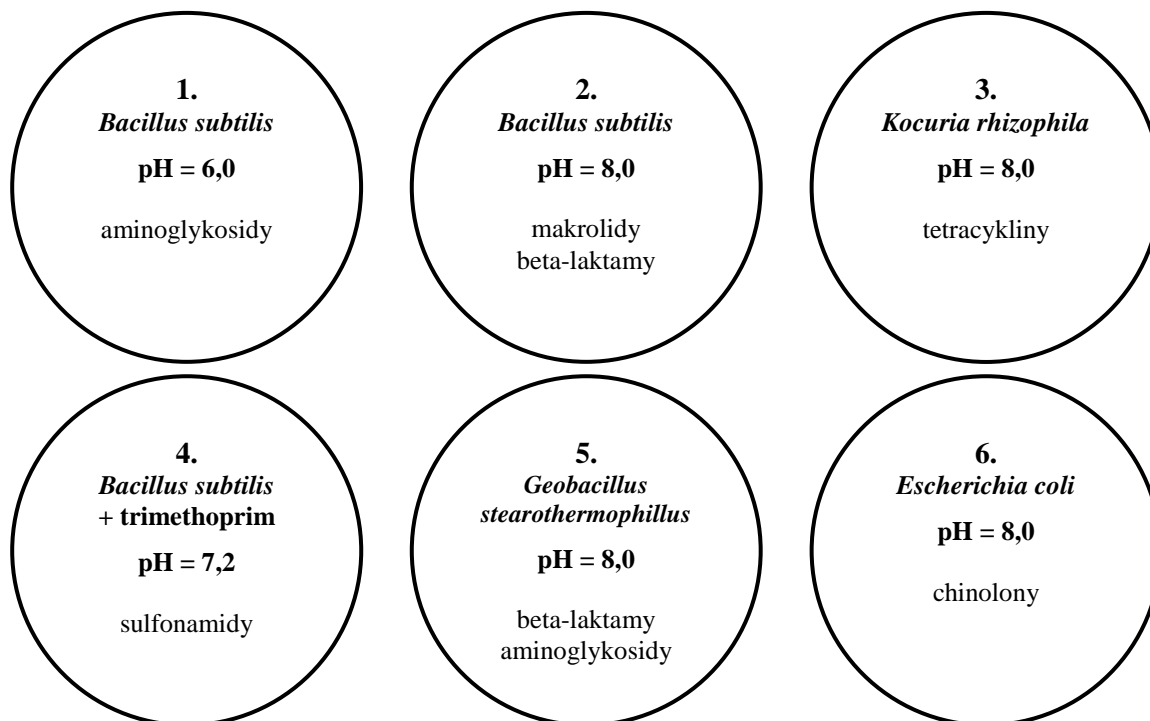
| Ředění pracovního roztoku / ml | Výsledná koncentrace na plotně / 10 µl* | Testovací kmen a pH půdy | Velikost inhibiční zóny v mm |
|--------------------------------|---|---|------------------------------|
| PNC 1 IU | 0,01 IU | <i>Bacillus subtilis</i> pH 6,0 | 6 ± 1,5 |
| STM 100 µg | 1,00 µg | <i>Bacillus subtilis</i> pH 8,0 | 8 ± 1,5 |
| STM 100 µg | 1,00 µg | <i>Kocuria rhizophila</i> pH 8,0 | 6 ± 1,5 |
| SU 50 µg | 0,50 µg | <i>Bacillus subtilis</i> pH 7,2 | 6 ± 1,5 |
| PNC 1 IU | 0,01 IU | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> pH 8,0 | 11 ± 1,5 |
| CIP 0,1 µg | 0,003 µg | <i>Escherichia coli</i> pH 8,0 | 5,5 ± 1,5 |

* v případě plotny s *E. coli* 30 µl

5.6.1.3. Obecné zásady provedení plotnových metod

- v den testování při použití jedné šarže půd dáváme kontrolní disk s pozitivní kontrolou jen na jednu testovací plotnu;
- vzorky připravujeme za aseptických podmínek;
- odstranění vlivu přirozených inhibitorů v čerstvém syrovém mléce lze provést inaktivací vzorku mléka zahřátím na 85 °C po dobu 5 minut;
- vzorky vyšetřované plotnovými metodami musí mít pH větší než 6,0 - **kyselé vzorky na plotnových metodách způsobují falešnou pozitivitu vzorku!**
- vzorky silně mikrobiálně kontaminované nejsou vhodné k vyšetření;
- vzorky by měly být doručeny do laboratoře buď chlazené s minimálním časovým zpožděním nebo ve zmrazeném stavu;

- plotny se vzorky aplikovanými na disk se inkubují dnem vzhůru;
- plotny se vzorky tkání, tuhých potravin a vzorky aplikované do dutých válečků se neobracejí!
- mikrobiologické metody **nejdou vhodné** pro zjišťování RIL v medu.



Obr. 18: Přehled používaných ploten a typ testovaných antimikrobiálních látek.

5.6.1.4. Pracovní postup pro zpracování vzorků

Mléko: Vzorek mléka dobře promícháme, sterilní papírový disk (průměr 12,7 mm) ponoříme částečně do vzorku a necháme rovnoměrně nasáknout, přebytek vzorku odstraníme otřením o vnitřní stranu vzorkovnice. Disky se vzorky dáváme dvojmo – úhlopříčně na povrch agarů v Petriho misce + disk s pozitivní kontrolou. Na jednu plotnu dáváme maximálně 4 disky se vzorky. *Tento způsob se používá také v případě vyšetření konzumního mléka, syrovátky, sušeného mléka a syrovátky, šlehačky a kondenzovaného mléka.*

Tkáně: vzorky tkání zpracujeme tak, že sterilními nůžkami z hloubky tkáně vystříháme vzorek o velikosti 7x7x7 mm, vzorky dáváme dvojmo – úhlopříčně na povrch agarů v Petriho misce + disk s pozitivní kontrolou. Na jednu plotnu dáváme maximálně 4 vzorky tkáně. Doporučuje se nedávat na jednu plotnu současně vzorky svalů a orgánů.

Vejce: V případě vyšetření syrových vajec je nutné nejprve provést tepelnou inaktivaci inhibičních látek přirozeně se vyskytujících v bílku. Žloutek i bílek zhomogenizujeme. Do 2 mikrozkušavek Eppendorf napipetujeme 0,5 ml fosfátového pufru a přidáme 0,5 ml vaječné melanže, necháme 5 minut protřepat na mikrotřepače. Jednu zkumavku inaktivujeme 20 minut ve vodní lázni při teplotě 71 °C. Druhá neinaktivovaná zkumavka slouží jako pozitivní kontrola. Na živnou půdu v Petriho misce umístíme sterilní duté válečky, do kterých dávujeme po 100 ml inaktivovaného vzorku. Vzorky dáváme dvojmo – úhlopříčně na povrch agarů v Petriho misce. Stejným způsobem se aplikuje i neinaktivovaný vzorek vajec (pozitivní kontrola).

Potraviny: Vzorky pevných potravin zpracujeme stejným způsobem jako tkáň, vzorky polotekutých potravin dáváme do sterilních kovových válečků. Kyselé potraviny s $\text{pH} < 6,0$ se musí před analýzou upravit 5 M NaOH tak, aby vzorek měl hodnotu $\text{pH} > 6,0$.

Inkubační podmínky pro jednotlivé plotny jsou uvedeny v tabulce 12.

5.6.1.5. Hodnocení výsledků

Po ukončení inkubace měříme velikost vzniklé číré **inhibiční zóny**, a to od okraje vzorku po okraj inhibice růstu. Dojde-li k uvolnění tekutiny ze vzorku (např. při vyšetření masa či orgánů), měříme inhibiční zónu od okraje vysrážené tekutiny k okraji inhibice růstu.

Plotnové metody umožňují skupinovou identifikaci inhibiční látky (viz obrázek 16) a podle velikosti inhibiční zóny i odhad její přibližné koncentrace.

Mléko:

- Plotna 1 – 4 negativní výsledek = inhibiční zóna < 2 mm
 pozitivní výsledek = inhibiční zóna ≥ 2 mm
- Plotna 5 negativní výsledek = inhibiční zóna < 1 mm
 pozitivní výsledek = inhibiční zóna ≥ 1 mm
- Plotna 6 negativní výsledek = inhibiční zóna < 2 mm
 pozitivní výsledek = inhibiční zóna ≥ 2 mm

Tkáň, vejce, potraviny:

- Plotna 1 – 4 negativní výsledek = inhibiční zóna < 2 mm
 pozitivní výsledek = inhibiční zóna ≥ 2 mm
- Plotna 5 negativní výsledek = inhibiční zóna < 4 mm
 pozitivní výsledek = inhibiční zóna ≥ 4 mm
- Plotna 6 negativní výsledek = inhibiční zóna < 2 mm
 pozitivní výsledek = inhibiční zóna ≥ 2 mm

Tabulka 14: Minimální rozsah vyšetření na RIL pro potřeby státního dozoru.

| | Plotna 1 | Plotna 2 | Plotna 3 | Plotna 4 | Plotna 5 | Plotna 6 |
|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Mléko | + | | | + | + | + |
| Tkáň | + | + | + | + | + | + |
| Vejce | + | | | + | + | + |
| Potraviny | + | + | + | + | + | + |

Vzorek označíme za pozitivní, jestliže výsledek obou paralelních vzorků je pozitivní. Vzorek označíme za negativní, jestliže výsledek obou paralelních vzorků je negativní. Vyjde-li jeden paralelní vzorek pozitivní a druhý negativní, jedná se o podezřelý vzorek a test je nutné opakovat. Je-li výsledek opakovaného testu pozitivní, označíme vzorek za pozitivní a obráceně.

5.6.2. Širokospektrální testy

Širokospektrální rychlotesty jsou mikrobiologické testy umožňující screeningové vyšetření syrového kravského mléka či jiných produktů živočišného původu, ať už v prvovýrobě, v potravinářských podnicích či akreditovaných laboratořích. Jejich výhodou je široké detekční spektrum, jednoduché provedení, relativně nízká cena a použitelnost pro vyšetření

velkého počtu vzorků. Na druhou stranu neumožňují specifickou detekci antibiotik, mají limitované detekční limity a jsou pouze kvalitativní.

Jednotlivé druhy širokospektrálních rychlotestů se vzájemně liší druhem testačního mikroorganismu (nejčastěji se používá *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*), použitým indikátorem, inkubační dobou a teplotou, spektrem a detekčními hladinami stanovovaných látek. Mezi používané metody patří např. Eclipse Test, Charm Farm Test či BR-Test®.

5.6.2.1. Test Eclipse 50

Test Eclipse 50 je založen na principu inhibice mikrobiálního růstu. Test je ve formě mikrodestiček, jejichž jamky obsahují agar s testovacím mikroorganismem (*Geobacillus stearothermophilus*) a indikátor pH. Test je vhodný pro detekci penicilinu a tetracyklinových antibiotik, je citlivý také na detergenty a desinfekční látky. Národní referenční laboratoří je doporučen jako širokospektrální rychlotest pro stanovení RIL v mléce a vejcích.

Provedení testu:

Po oddělení přilnavé fólie se vzorek mléka v množství 50 µl napipetuje do jamky mikrotitrační destičky. Po nanesení vzorků a kontrol vzorků destičku překryjeme fólií a necháme inkubovat při teplotě 65 °C po dobu asi 2,5 – 3 hodin (sledujeme změnu barvy kontroly na žlutozelenou a poté inkubujeme ještě 15 minut).

Hodnocení testu:

negativní vzorek – žlutozelené zbarvení, nejsou přítomna antibiotika nad stanovený limit

podezřelý vzorek – modrozelené zbarvení, koncentrace přítomných antibiotik je blízko detekčního limitu a analýzu je třeba opakovat

pozitivní vzorek – fialové zbarvení, potvrzena přítomnost antibiotik

5.6.2.2. BR-Test® AS Brilliant

BR-Test® AS Brilliant je test určený pro stanovení reziduí antibiotik a sulfonamidů v syrovém mléce. Agarové živné médium modré barvy je umístěno v mikrotitračních destičkách, stripech či jednotlivých zkumavkách. Živné médium obsahuje spory testovacího mikroorganismu – *Geobacillus stearothermophilus* a redox indikátor brilliantovou čern.

Hodnocení testu:

negativní vzorek – změna barvy agarového média z modré na žlutou

pozitivní vzorek – zůstává modré zbarvení, potvrzena přítomnost antibiotik

6. Legislativní předpisy v oblasti mikrobiologie potravin

Cílem následující kapitoly není podat úplný přehled platných právních předpisů v oblasti mikrobiologie potravin. Je zaměřena na stručný výklad nařízení komise (ES) č. 2073/2005, jehož znalost a schopnost interpretace je pro absolventy Fakulty veterinární hygieny a ekologie VFU Brno prioritní.

6.1. Nařízení komise (ES) č. 2073/2005

Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny ve znění nařízení komise (ES) č. 1441/2007 je základním legislativním předpisem pro mikrobiologickou kontrolu potravin. Doplnuje tzv. hygienický balíček (Nařízení (ES) č. 852/2004, 853/2004, 854/2004, 882/2004).

Hlavní odpovědnost za bezpečnost potravin je kladena na provozovatele potravinářských podniků, kteří musí zajistit, aby potraviny splňovaly příslušná mikrobiologická kritéria. Za tímto účelem musí ve všech fázích výroby, zpracování a distribuce zajistit, aby suroviny a potraviny splňovaly kritéria hygieny výrobního procesu a aby po celou dobu udržitelnosti potravin byla dodržována kritéria bezpečnosti potravin.

6.1.1. Příloha I

Nejdůležitější částí nařízení 1441/2007 je **příloha I**, která je rozdělena do tří kapitol:

- Kapitola 1 – **Kritéria bezpečnosti potravin** obsahuje ukazatele zdravotní nezávadnosti a jejich nedodržení musí vést ke stažení závadné potraviny z tržní sítě. Zdravotní nezávadnost je až na výjimky určena patogenními mikroorganismy *Listeria monocytogenes* a rodem *Salmonella*. Z dalších mikroorganismů je to *Cronobacter sakazakii* (sušená počáteční kojenecká výživa) a *E. coli* (živí plži, mlži), metabolit histamin (některé druhy ryb) a stafylokokové enterotoxiny (sýry, sušené mléko).
- Kapitola 2 – **Kritéria hygieny výrobního procesu** obsahuje ukazatele hygieny výroby. K těmto ukazatelům patří většinou indikátorové mikroorganismy (čeled' *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, počet kolonií aerobních mikroorganismů – CPM), ale také rod *Salmonella*, koagulázopozitivní stafylokoky a *Bacillus cereus*. Jejich nedodržení musí vést k takovému opatření ke zlepšení hygieny ve výrobě, aby byla zajištěna náprava nevyhovujícího stavu.
- Kapitola 3 – **Pravidla pro odběr vzorků a přípravu zkušebních vzorků** stanovuje četnost odběru u některých komodit např. jatečně upravených těl skotu, prasat, ovcí, koz, drůbeže, mletého masa, masných polotovarů.

Kapitola 1 a 2 obsahuje tabulky uvádějící pro jednotlivé **kategorie** potravin **mikroorganismy**, jejich toxiny nebo metabolity, jejichž vyšetření je požadováno. Dále tabulky obsahují vzorkovací schéma, kdy je vzorek tvořen několika dílčími vzorky. Minimální počet **dílčích vzorků (n)** je zpravidla určen počtem $n = 5$. Pro jednotlivé ukazatele je dána limitní hodnota (např. počet KTJ/g nebo nepřítomnost daného mikroorganismu v 10 g). U některých ukazatelů je **limit** určen rozmezím dvou hodnot **m** a **M**, v takovém případě je vždy stanoven **počet jednotek vzorku (c)**, jejichž hodnoty převyšují m, ale maximální hodnota, které mohou dosáhnout je M.

| Kategorie potravin | Mikroorganismy | Plán odběru vzorků (?) | | Limity (?) | | Analytická referenční metoda (?) | Fáze, na níž se kritérium vztahuje | Opatření v případě nevyhovujících výsledků |
|--------------------|--|------------------------|---|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|------------------------------------|---|
| | | n | c | m | M | | | |
| 2.1.6 Mleté maso | počet kolonií aerobních mikroorganismů (?) | 5 | 2 | 5×10^5 KTJ/g | 5×10^6 KTJ/g | ISO 4833 | konec výrobního procesu | zlepšení hygieny výroby a zlepšení v oblasti výběru a/nebo původu surovin |

Obr. 19: Nařízení č. 2073/2005 – Příloha I - Kapitola 1 – ukázka.

Příklad: mleté maso – stanovení počtu kolonií aerobních mikroorganismů (CPM): je požadováno vyšetření 5 dílčích vzorků (n), limitní hodnota (m) je 5.10^5 KTJ/g, ale pro 2 dílčí vzorky z pěti (c) je možný limit (M) 5.10^6 KTJ/g.

Další součástí tabulek je uvedení **analytické referenční metody** číslem příslušné ISO normy, výrobní **fáze na níž se kritérium vztahuje** (např. produkty uvedené na trh během doby údržnosti, konec výrobního procesu) a v Kapitole 2 také **opatření v případě nevyhovujících výsledků** (např. zlepšení hygieny výroby, zlepšení v oblasti výběru surovin).

V následujících kapitolách (6.1.2 a 6.1.3) se pokusíme přiblížit nejdůležitější informace týkající se problematiky stanovení *Listeria monocytogenes* a mikrobiologického vyšetření těl jatečně upravených zvířat, předem upozorňujeme, že se jedná o uvedení základních informací nikoli o úplný výčet.

6.1.2. Stanovení *Listeria monocytogenes*

Baktérie *Listeria monocytogenes* je uvedena v Kapitole 1 na prvním místě (část 1.1, 1.2, 1.3). Potraviny určené k přímé spotřebě, u nichž je vyšetření v souvislosti s *Listeria monocytogenes* požadováno, se dělí na tři skupiny:

- Výrobky pro kojence a zvláštní léčebné účely – u těchto produktů uvedených na trh během doby údržnosti nesmí být *L. monocytogenes* přítomna ve 25 g;
- výrobky podporující růst** *L. monocytogenes* – před opuštěním potravinářského podniku a distribucí do tržní sítě nesmí být přítomnost *L. monocytogenes* ve 25 g potraviny a během doby údržnosti na trhu je limit 10^2 KTJ/g. V případě, že výrobce je schopen na základě provedené speciální studie prokázat, že výrobek nepřekročí limit 10^2 KTJ/g po celou dobu údržnosti potraviny, nemusí výrobek splňovat limit nepřítomnost *Listeria monocytogenes* ve 25 g potraviny před distribucí do tržní sítě.
- výrobky nepodporující růst** *L. monocytogenes* – limit pro počty LM u těchto produktů uvedených na trh během doby údržnosti je 100 KTJ/g.

Je důležité potraviny určené k přímé spotřebě správně zařadit do příslušné kategorie. **Nařízení jednoznačně definuje výrobky růst *L. monocytogenes* nepodporující, všechny ostatní výrobky se považují za růst podporující.** Aby byly výrobky zařazeny do skupiny nepodporující růst *L. monocytogenes*, musí splnit alespoň jedno z následujících kritérií:

- výrobek s dobou údržnosti pod 5 dnů
- $\text{pH} \leq 4,4$
- $a_w \leq 0,92$
- $\text{pH} \leq 5$ a zároveň $a_w \leq 0,94$.

Pravidelné provádění vyšetření v souvislosti s *L. monocytogenes* není užitečné u těchto potravin určených k přímé spotřebě: výrobky tepelně ošetřené v konečném obalu, čerstvá nekrájená a nezpracovaná zelenina a ovoce (vyjma naklíčených semen), chleba a sušenky,

vody, nealko nápoje, pivo, víno, lihoviny, cukr, med a cukrovinky, výrobky z kakaa a čokolády.

V případě průkazu nepřítomnosti *L. monocytogenes* ve 25 g potraviny se používá analytická metoda ČSN EN ISO 11290-1 (viz kapitola 4.3.1.). Při kvantitativním vyšetření se postupuje dle ČSN EN ISO 11290-2 (viz kapitola 4.3.2.), kde se 1 ml inokula naočkuje na Petriho misku o průměru 140 mm nebo se rozdělí na tři Petriho misky o průměru 90 mm.

6.1.3. Mikrobiologické vyšetření jatečně upravených těl

Kapitola 2. Kritéria hygieny výrobního procesu uvádí v části 2.1. Maso a výrobky z něj limity pro mikrobiologické vyšetření jatečně upravených těl. U jatečně upravených těl po úpravě, ale před chlazením jsou požadovány tyto limity:

- skot, ovce, kozy, koňovití: počet kolonií aerobních mikroorganismů (CPM) $\log 3,5 - 5,0$ KTJ/cm², *Enterobacteriaceae* $\log 2,0 - 3,0$ KTJ/cm² ($\log 5,0 = 10^5$)
- prasata: CPM $\log 4,0 - 5,0$ KTJ/cm², *Enterobacteriaceae* $\log 2,0 - 3,0$ KTJ/cm² (v případě překročení těchto limitů je nutné zlepšení hygieny porážky)
- prasata, skot, ovce, kozy, koňovití: *Salmonella* spp. nepřítomna na vyšetřovaném místě jatečně upraveného těla u 50 vzorků (v případě překročení limitu je nutné zlepšení hygieny porážky a opatření biologické bezpečnosti v hospodářstvích původu)

Postup při mikrobiologickém vyšetření poražených kusů je popsán v **Metodickém návodu SVS ČR č. 2/2006 – postupy pro pravidelné kontroly všeobecné hygieny u jatečně opracovaných těl**.

Vyšetření pro stanovení počtu baktérií čeledi *Enterobacteriaceae* a CPM lze provádět dvěma metodami:

- **destruktivní metoda** – odříznutí plátku na 4 místech jatečně upraveného těla (5 mm x 5 cm²)
- **nedestruktivní metoda** – stěr se provádí pomocí 4 navlhčených a 4 suchých tampónů na 4 místech jatečně upraveného těla; každé odběrové místo je nejdříve setřeno navlhčeným tampónem a poté suchým; na 1 jatečný kus se tedy použije 1 šablona 100 cm², 8 tampónů a sterilní médium k navlhčení.

Limity uvedené v nařízení č. 1441/2007 se vztahují pouze na vzorky odebrané destruktivní metodou, limit pro nedestruktivní metodu je 3,6krát nižší než u destruktivních metod, je nutné použít přepočet a teprve pak porovnávat s limity v nařízení.

Vyšetření pro průkaz rodu *Salmonella* se provádí:

- **nedestruktivní metodou** pomocí abrazivní houbičky; pro 1 vyšetřovaný kus se použije 1 houbička, 1 šablona 100 cm² a každé ze 4 míst jatečně upraveného těla se setře 10x jinou plochou houbičky.

Odběru vzorků jatečně opracovaných kusů se provádí vždy jeden den v týdnu, každý týden se stanovené dny odběru mění, vzorky se odebírají nejlépe v polovině porážecího dne - namátkově 5 vepřových a 5 hovězích jatečně opracovaných těl.

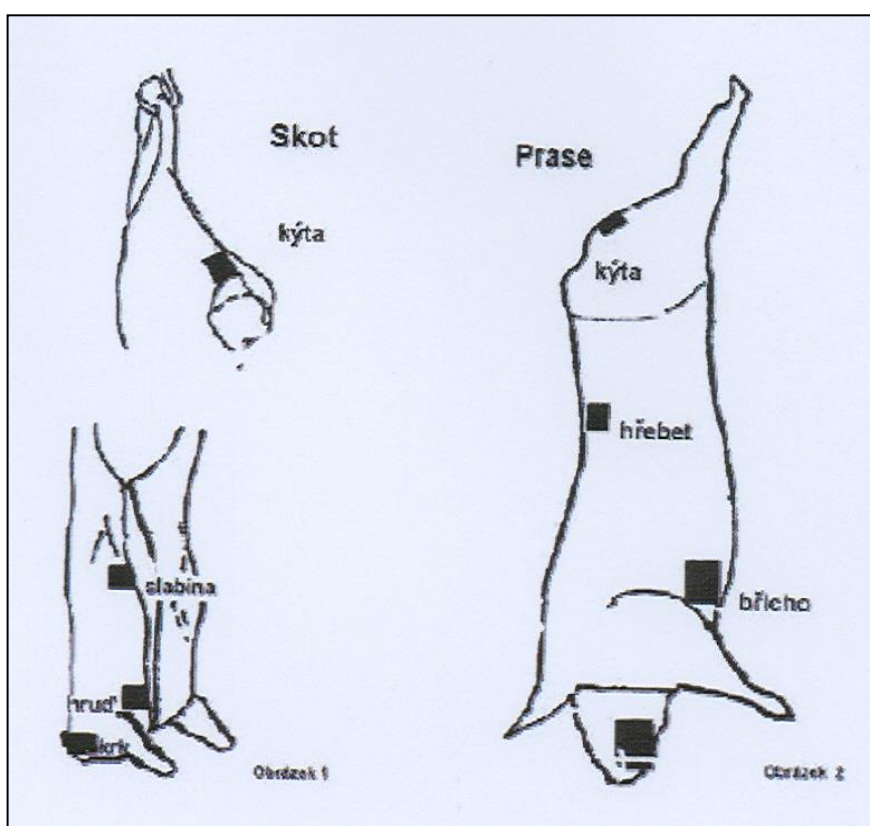
- Pokud 6 po sobě jdoucích týdnů jsou výsledky na CPM a čeleď *Enterobacteriaceae* vyhovující nařízení č. 2073/2005, může být četnost testování snížena na 14 denní interval.
- Pokud 30 po sobě jdoucích týdnech výsledky na rod *Salmonella* vyhovují nařízení č. 2073/2005, může být četnost testování snížena na 14 denní interval.

Malým jatkům lze udělit výjimka pro počty odebíraných vzorků. Výsledky vyšetření se zaznamenávají do schématu (sledování trendů mikrobiálních hodnot za delší časové období) – minimálně 12 měsíců zpětně.

Kapitola 2. Kritéria hygieny výrobního procesu uvádí v části 2.1.5. limity pro mikrobiologické vyšetření jatečně upravených těl drůbeže. Kritérium se vztahuje na jatečně upravená těla po chlazení a jsou požadovány tyto limity:

- drůbež: *Salmonella* spp. nepřítomna ve 25 g směsného vzorku kůže z krku u 50 vzorků (je tolerován průkaz salmonely u 7 vzorků z 50); v případě překročení limitů je nutné zlepšení hygieny porážky a přezkoumat procesní kontroly, původ zvířat a opatření biologické bezpečnosti v hospodářstvích původu.

Při vyšetření na salmonely u drůbeže se při každém vzorkování odebírají namátkově vzorky z nejméně 15 jatečně upravených těl drůbeže po chlazení. Z každého jatečně upraveného těla se odebere kousek kůže krku o přibližné hmotnosti 10 g. Před vlastním vyšetřením se z každých 3 odebraných vzorků vytvoří vždy směsný vzorek tak, aby se nakonec připravilo přesným navážením 5 x 25 g konečných vzorků. Vzorky se uchovávají při teplotě 2 – 4 °C.



Obr. 20: Místa odběru vzorků u jatečně upravených těl skotu a prasat.

6.2. ČSN 56 9609 – pravidla správné hygienické a výrobní praxe

Nařízení č. 2073/2005 uvádí velmi úzké spektrum vyšetřovaných mikroorganismů. V rámci vnitřních kontrol v závodech (ověřování funkce HACCP) se doporučuje využívat další mikrobiologická kritéria. Mikroorganismy významné pro jednotlivé potraviny (patogeny, indikátorové mikroorganismy nebo mikroorganismy způsobující kažení potravin) jsou uvedeny v **ČSN 56 9609 – Pravidla správné hygienické a výrobní praxe – Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace**, a to včetně mikrobiologických limitů. Používání této normy je pro zajištění bezpečnosti potravin pouze doporučováno a dodržení limitů stanovených touto normou není povinné.

Norma vyjmenovává bakteriální původce onemocnění z potravin a toxické produkty mikroorganismů a pro jednotlivé kategorie potravin stanovuje jejich nejvyšší mezní hodnotu. Nejrozsáhlejší částí normy jsou tabulky s tolerovanými hodnotami pro jednotlivé druhy, skupiny nebo podskupiny potravin. Požadavky jsou uvedeny podobně jako v nařízení č. 2073/2005 pomocí symbolů n, c, m, M. Symbol 0/25 značí požadavek nepřítomnosti mikroorganismů ve 25 g nebo 25 ml vzorku, 0/1 značí požadavek nepřítomnosti mikroorganismů v 1 g nebo 1 ml vzorku.

6.3. Přehled vybraných norem pro mikrobiologické zkoušení potravin

V následující kapitole je uveden přehled norem, které se vztahují k obecným principům mikrobiologického zkoušení a k metodikám mikrobiologického vyšetření potravin uvedeným v tomto díle skript.

6.3.1. Kapitola 1 a 2

ČSN EN ISO 7218 (2008): Mikrobiologie potravin a krmiv – Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení

ČSN EN ISO 6887-1 (1999): Mikrobiologie potravin a krmiv – Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinásobných ředění – Část 1: Všeobecné pokyny pro přípravu výchozí suspenze a desetinásobných ředění

6.3.2. Kapitola 3

ČSN ISO 4833 (2003): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C

ČSN ISO 21528-1 (2006): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metody pro průkaz a stanovení počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* – Část 1: Průkaz a stanovení počtu technikou nejvýše pravděpodobného počtu s předpomnožením

ČSN ISO 21528-2 (2006): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metody pro průkaz a stanovení počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* – Část 2: Technika počítání kolonií

ČSN ISO 4832 (1995): Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu koliformních bakterií. Technika počítání kolonií

ČSN ISO 16649-2 (2003): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu beta-glukuronidázopozitivních *Escherichia coli* – Část 2: Technika

počítání kolonií vykultivovaných při 44 °C s použitím 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glukuronidu

ČSN ISO 21527-1 (2009): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní. – Část 1: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody vyšší než 0,95

ČSN ISO 21527-2 (2009): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní. – Část 1: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody nižší nebo rovnou 0,95

ČSN ISO 15214 (2000): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu mezofilních bakterií mléčného kvašení – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C

ČSN ISO 17410 (2003): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů

6.3.3. Kapitola 4

ČSN EN ISO 6579 (2003): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Salmonella*

ČSN EN ISO 10272-1 (2006): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Campylobacter* spp. – Část 1: Metoda průkazu

ČSN EN ISO 11290-1 (1999): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* – Část 1: Metoda průkazu

ČSN EN ISO 11290-2 (1999): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* – Část 2: Metoda stanovení počtu

ČSN EN ISO 16654 (2002): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu *Escherichia coli* O157

ČSN P ISO/TS 22964 (2006): Mléko a mléčné výrobky – Průkaz *Enterobacter sakazakii*

ČSN EN ISO 7937 (2006): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu *Clostridium perfringens* – Technika počítání kolonií

ČSN EN ISO 6888-1 (1999): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy) – Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera

ČSN EN ISO 6888-2 (1999): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy) – Část 2: Technika s použitím agarové půdy s králičí plasmou a fibrinogenem

ČSN EN ISO 7932 (2005): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu presumptivního *Bacillus cereus* – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C

6.3.3. Kapitola 5

ČSN EN ISO 6222 (2000): Jakost vod – Stanovení kultivovatelných mikroorganismů – Stanovení počtu kolonií očkovaním do živného agarového kultivačního média

ČSN EN ISO 7899-2 (2001): Jakost vod – Stanovení intestinálních enterokoků – Část 2: Metoda membránových filtrů

ČSN EN ISO 9308-1 (2001): Jakost vod – Stanovení *Escherichia coli* a koliformních bakterií – Část 1: Metoda membránových filtrů