

Navážka nebo odměření množství vzorku k rozboru

Hmotnost nebo objem vzorků odebraných k mikrobiologickému rozboru je obvykle 100 – 200 g (ml). Ze spotřebitelských balení se pro vlastní mikrobiologický rozbor odměřuje reprezentativní vzorek (např. výseč sýra nebo odpovídající počet balení): 1 – 25 g (ml) navažováním nebo pipetováním. Navážka se odebírá z různých míst vzorku tak, aby v ní byly zastoupeny všechny složky v přibližně ve stejném poměru jako v původním vzorku. Tekuté vzorky ve vzorkovnici nebo ve spotřebitelské balení se před odběrem důkladně promíchají protřepáním, krouživými pohyby nebo převrácením obalu či vzorkovnice dnem vzhůru. Během navažování nebo pipetování vzorku nesmí dojít k jeho kontaminaci (v místě otevření se obal otře roztokem 70 % obj. ethanolu).

Homogenizace vzorku

Důkladná homogenizace je jedním ze základních předpokladů získání správného výsledku při mikrobiologickém rozboru. Při homogenizaci dochází k rovnoměrnému rozptýlení přítomných mikroorganismů ve vzorku nebo jeho ředění.

Postup homogenizace je závislý na charakteru vzorku. Nejjednodušší je homogenizace tekutých vzorků třepáním, které nesmí být příliš intenzivní, aby nedocházelo k napěnění vzorku. Viskózní, rosolovité a sypké vzorky se protřepávají v ředícím roztoku, který obsahuje skleněné perly. Pevné vzorky se asepticky roztírají ve sterilní třecí misce. U vzorků s vysokým obsahem tuku se provádí homogenizace při teplotě 40 – 45 °C.

Pro výrobky jiné než tekuté konzistence se doporučuje použít k přípravě výchozí suspenze (tzv. základního, prvního ředění) peristaltický homogenizátor (stomacher) se sterilními plastovými sáčky.

Objem sáčků homogenizátoru má být asi dvojnásobný proti objemu vzorku, který má být homogenizován.

Z analyzovaného vzorku se odváží vzorek do plastového sáčku (obecně 10 g), přidá se vhodný ředící roztok v poměru 1 díl vzorku a 9 dílů ředícího roztoku předepsané teploty. Stomacherem se homogenizace provádí 1 – 2 min podle charakteru výrobku. Stomacher není vhodný pro výrobky obsahující ostré nebo nesnadno desintegrovatelné částice.

Po ukončení homogenizace se ponechají velké částice sedimentovat (nejdéle 15 min), poté se přenese potřebný objem horní vrstvy suspenze do sterilní nádoby vhodné kapacity pipetou. Je-li horní vrstva tvořena tukem, odebere se vzorek z vodné fáze.

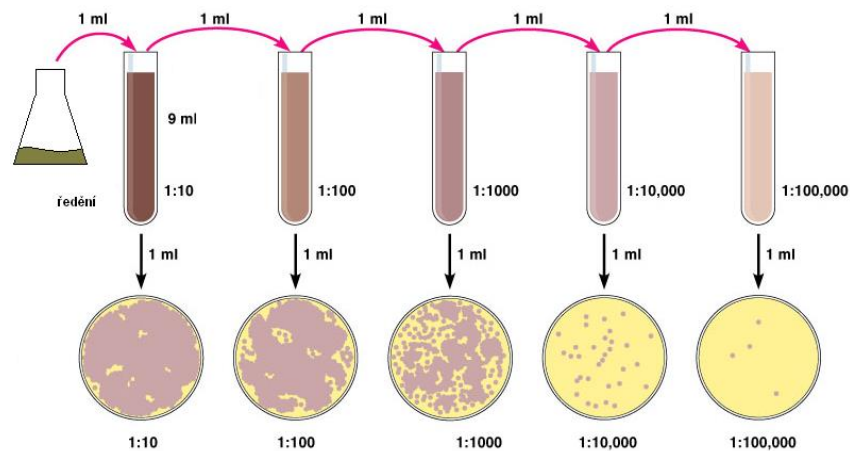
Ředění vzorku

Jestliže se předpokládá, že vzorek obsahuje vyšší počet mikroorganismů, je třeba podle předběžně odhadnutého počtu zvolit ředění, která budou analyzována. Tekuté vzorky s nízkým počtem mikroorganismů se očkují neředěné. Vzorky viskózní a pevné je třeba ředit vždy.

Výchozí (základní) ředění je definováno takto: suspenze, emulze nebo roztok, získané z naváženého nebo odměřeného množství vzorku smíchané s devítinásobným množstvím ředícího roztoku a důkladně promíchané. Jedná se tedy o I. ředění vyšetřovaného vzorku.

Další ředění se připraví smísením 1 ml I. ředění s 9 ml ředícího roztoku (viz obrázek). Tímto postupem se připraví ředění, která jsou potřebná pro provedení mikrobiologického rozboru tak, aby výsledek bylo možno objektivně vyhodnotit.

Jestliže se předpokládá nízký počet mikroorganismů, vzorky se neředí, případně se mikroorganismy koncentrují (např. membránovou filtrací).



Schematické znázornění přípravy ředění.

Ředící roztoky

Fyziologický roztok: 8,5 g chloridu sodného, 1 g peptonu, 1000 ml destilované vody; pH před sterilací 7,2.

Fyziologický roztok s Tweenem

Citrátový pufr: 20 g citranu sodného, 1000 ml destilované vody; pH před sterilací 7,5.

Očkování suspenze, kultivace a výpočet kolonie tvořících jednotek

Metoda přelivu

Na Petriho misku se aplikuje 1 ml z vybraného vhodného ředění a suspenze se přelije vhodným kultivačním médiem (cca 15 ml) vytemperovaným na 45 °C. Směs se důkladně promíchá krouživými pohyby a nechá se zatuhnout. Petriho misky se následně přemístí do termostatu o zvolené kultivační teplotě, otočí se dnem vzhůru (kvůli případné precipitaci vody na povrch zaočkované půdy) a nechají se kultivovat po dobu potřebnou dle jednotlivých druhů stanovovaných mikroorganismů.

Metoda roztěru

Na Petriho misku se nalije vhodné kultivační médium, nechá se zatuhnout a povrch misky s médiem se nechá předsušit ve flow-boxu. Na předsušenou misku se aplikuje 100 µl z vybraného vhodného ředění a pomocí sterilní hokejky se rovnoměrně rozetře. Po dokonalém vsáknutí aplikované suspenze do média se Petriho misky následně přemístí do termostatu o zvolené kultivační teplotě, otočí se dnem vzhůru (kvůli případné

precipitaci vody na povrch zaočkované půdy) a nechají se kultivovat po dobu potřebnou dle jednotlivých druhů stanovovaných mikroorganismů.

Výpočet kolonie tvořících jednotek (KTJ)

Po inkubaci se vyberou plotny vhodné k počítání: 10 - 300 kolonií na plotně (při stanovení celkového počtu mezofilních mikroorganismů, celkový počet psychrotrofních mikroorganismů apod.) nebo 10 – 150 kolonií na plotně (specifická stanovení např. koliformní mikroorganismy), přičemž musí být splněna důležitá podmínka, že alespoň na jedné plotně je více než 10 kolonií.

Celkový počet mikroorganismů N přítomných ve vzorku se počítá jako vážený průměr po sobě následujících ředění podle následující rovnice:

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d} \quad [\text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}] \text{ či } [\text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}]$$

Kde je:

$\sum C$ součet kolonií ze všech ploten vybraných pro výpočet po sobě jdoucích ředění,

V objem inokula v mililitrech zaočkovaného na plotny,

n_1 počet ploten vybraných k výpočtu z prvního vybraného ředění,

n_2 počet ploten vybraných k výpočtu z druhého vybraného ředění,

d faktor odpovídající prvnímu pro výpočet zvolenému ředění.

Pozn.: Dle normy ČSN EN ISO 7218 (560103) v případě aplikace 2 po sobě následujících ředění lze použít pouze jednu misku od každého ředění. Ve jmenovateli rovnice 1 se pak závorka nahrazuje koeficientem 1,1. Pokud se provádí pouze jedno ředění, tak zůstávají nutné 2 misky od ředění.

Rozbor prostředí

Mikrobiologická kontrola vzduchu – sedimentační metoda

Princip

Na vhodné půdě se zjišťuje počet mikroorganismů, které za určitou časovou jednotku sedimentují ze vzduchu na standardní plochu. Po kultivaci se spočítají vyrostlé kolonie, případně se provede jejich identifikace.

Postup

Dvě nebo více Petriho misek s vhodnou živnou půdou pro průkaz zjišťovaných mikroorganismů se položí na vybrané místo ve vyšetřovaném prostoru, na kterém chceme zjistit intenzitu kontaminace sedimentujícími mikroby. Plotny se exponují sejmutím víček. Délka expozice se řídí předpokládanou intenzitou mikrobiálního znečištění ovzduší (obvykle se používá 10, 15 nebo 30 min). Po skončení expozice se misky uzavřou víčky a po přepravení do laboratoře (při pokojové teplotě) se inkubují při teplotě a po dobu odpovídající druhu sledovaných mikroorganismů a použitých kultivačních půd.

Výpočet

Po skončení inkubace se spočítají kolonie mikroorganismů (na živném agaru všechny kolonie, na selektivně-diagnostických půdách pouze charakteristické kolonie) a vypočte se jejich aritmetický průměr. Výsledky se přepočítávají na plochu 100 cm² a dobu expozice 10 min podle vztahu:

$$Sm_{10} = \frac{K \cdot 10}{P \cdot T} \cdot 100 \quad (\text{rovnice 2})$$

Kde je:

Sm₁₀.....počet mikroorganismů sedimentujících na plochu 100 cm² za 10 min,

K.....aritmetický průměr počtu kolonií na miskách,

P.....plocha misky [cm²],

T.....délka expozice [min].

Mikrobiologická kontrola provozního zařízení a obalového materiálu

Metoda stěru

Princip

Mikroorganismy kontaminující vyšetřovaný předmět se setřou sterilním tampónem a převedou se do ředícího roztoku nebo do živné půdy. Kultivují se za podmínek optimálních pro zjišťovaný typ mikroorganismů.

Postup

Sterilní tampón se namočí ve sterilním ředícím roztoku a dvacetí tahy ve směrech na sebe kolmých se jím setře 100 cm² vyšetřovaného povrchu. Při kvantitativním stanovení počtu kontaminujících mikroorganismů se tampón vloží do zkumavky s 10 ml sterilního univerzálního ředícího roztoku (např. fyziologický roztok), při kvalitativním průkazu přítomnosti mikroorganismů nebo určitého typu mikroorganismů do zkumavky s 10 ml nutričního nebo selektivně – diagnostického média. Zachycené mikroorganismy se vytřepou 25 úhozy o dlaň. Při kvantitativním stanovení se z tohoto roztoku očkuje 1 ml na Petriho misku a přelije agarovou živnou půdou. Mikroorganismy se následně inkubují za podmínek předepsaných pro stanovení jednotlivých druhů prokazovaných mikroorganismů.

Vyhodnocení výsledků

Po inkubaci se spočítají na živném agaru všechny vyrostlé kolonie, na selektivně-diagnostických půdách všechny charakteristické kolonie a vypočte se jejich aritmetický průměr. Výsledek se vyjádří v počtu mikroorganismů na 100 cm² vyšetřené plochy.

Mikrobiologický rozbor výrobku

Inokulace a podmínky kultivace

	Půda		Kultivace		
Celkový počet MO	PCA	1 ml přelivem	72 h	30 °C	aerobně víčky dolů
Koliformní MO	VČŽL	1 ml přelivem dále přelit cca 4 ml půdy po utužení agaru	24 h	37 °C	aerobně víčky dolů
Koliformní MO + E. coli	Chromocult	0,1 ml roztěrem	24 h	37 °C	aerobně, po zasátí víčky dolů
Kvasinky + plísňe	GKCh	0,1 ml roztěrem	5-7 dní	25 °C	aerobně víčky nahoru

Vzorky se vždy odměřují sterilní pipetou!

Roztěr vzorků se provádí sterilní roztírací tyčkou - skleněnou nebo plastovou.

Od každého ředění kultivujeme vždy dvě misky s výjimkou stanovení koliformních MO na Chromocultu - zde pouze 1 miska!

Mikrobiologický rozbor prostředí

Mikrobiologická kontrola povrchů - metoda stěru

Použijte 1. a 2. ředění a od každého zaočkujte 1 misku na stanovení celkového počtu mikroorganismů.

Mikrobiologická kontrola znečištění vzduchu - sedimentační metoda

Použijte připravené misky - 1 misku pro stanovení celkového počtu a 1 misku pro stanovení kvasinek a plísňí (kultivace dle tabulky).