M.2.
Počet charakteristických mikroorganizmov v kyslomliečnych výrobkoch.

1. Určenie metódy

Metóda je určená pre kyslomliečne výrobky, v ktorých sú prítomné živé mikroorganizmy rodov: Lactobacillus, Streptococcus a Bifidobacterium.

2. Princíp metódy

Vhodné riedenia vyšetrovanej vzorky sa očkujú na agarove pôdy, ktoré sú špecifické pre rast sledovaných rodov mikroorganizmov:

a) Rod Lactobacillus - kultivačná pôda MRS: bezfarebné, šošovicovité alebo hviezdicovité, často ostro ohraničené kolónie o priemere 1 – 3 mm.
Mikroskopicky: tyčinky, väčšinou krátke, ale niekedy aj v dlhšej forme. Netvorí spóry, je grampozitívny, nepohyblivý a katalázo negatívny.

b) Rod Streptococcus - kultivačná pôda M17: šošovicovité kolónie o priemere 1 – 2 mm.
Mikroskopicky: guľaté alebo vajcovité koky (priemer 0,7µm až 0,9 µm) vyskytujúce sa v párach alebo dlhých retiazkach. Sú grampozitívne a katalázo negatívne.

c)Rod Bifidobacterium: Kultivačná pôda TOS: typická kolónia rastie v bielej farbe a s vôňou kyseliny octovej v priemere 1 – 4 mm.
Mikroskopicky: nepravidelne tvarované tyčinky (zväčšenie 300 x pri fázovom kontraste).

3. Pomôcky

3.1. Kultivačné média a činidlá

3.1.1. Riediace roztoky:
podľa STN EN ISO 8261

3.1.2. Kultivačné pôdy:
A. Kultivačná pôda MRS – komerčne dostupná

B. Kultivačná pôda M17 – komerčne dostupná

C. Kultivačná pôda TOS agar – komerčne dostupná

3.2. Prístroje a pomôcky:

1. prístroje pre mikrobiologické laboratórium (STN EN ISO 7218)
- termostat 37°C, 45°C, 48°C
- anaeróbne kultivačné nádoby

- Stomacher
- Váhy
- Mikroskop
- Počítacie zariadenie, lupa
- Sterilné laboratórne sklo

2. Anaerocult A, C.

3. chemikálie:
   - etanolový roztok methylénovej modrej 6g/l
   -70% etanol
   -chemikálie na Grammovo farbenie
   - peroxid vodíka 1,5%

4. Bezpečnosť pri práci

Keďže sledované rody mikroorganizmov z bezpečnostného hľadiska (podľa STN EN ISO 7218) zaraďujeme do „rizikovej kategórie 1“ (žiadne alebo veľmi malé riziko pre jednotlivca aj pre spoločnosť), dodržiavame bežné bezpečnostné opatrenia pri práci v mikrobiologickom laboratóriu.

5. Pracovný postup

5.1. *Príprava vzorky*:

a) Pred otvorením obalu vyšetrovaného kyslomliečneho výrobku je potrebné očistiť vonkajší povrch bezprostredne súvisiaci s oblasťou, z ktorej sa odoberá vzorka napr. 70% etanolom aby sa zabránilo kontaminácii vzorky. Obal so vzorkou sa otvára asepticky.

b) Obsah nádobky so vzorkou sa v závislosti na konzistencii dôkladne premieša, vzorky hustejšej konzistencie vhodným sterilným nástrojom.
Pri stanovení bifidobaktérií premiešavame jemne bez vzniku vzduchových bublín!

c) Naváži sa 10g ± 0,1 g do vhodnej nádobky („Stomacher“ vrecko, sterilná sklenená kadinka)

d) Prevedie sa predbežná mikroskopická skúška vyšetrovanej vzorky rozotrenej na sklíčku, vopred ofarbenej methylénovou modrou – na zistenie vhodného riedenia pre stanovenie počtu charakteristických mikroorganizmov.

5.2. *Vlastný pracovný postup:*

! príprava primárneho aj desaťnásobných riedení nesmú byť vykonávané na priamom slnečnom svetle**!**

a) Primárne riedenie: k naváženej vzorke sa pridáva riediaci roztok, tak aby hmotnosť naváženej vyšetrovanej vzorky a riediaceho roztoku bola 50 g.

- Dôkladne sa homogenizuje cca 1 minútu na Stomacheri
pri dôkaze bifidobaktérií sa homogenizuje ručne vhodným sterilným nástrojom dôkladne ale opatrne bez vzniku vzduchových bublín.

- Doplní sa na 100 g rovnakým riediacim roztokom, aby sa získalo riedenie 10^{1}.

Riediaci roztok: 1. Peptónový roztok
2. Ringerov roztok so štvrtinovou silou – pre rod Bifidobacterium

b) Príprava desaťnásobných riedení: podľa STN EN ISO 8261.

c) Očkovanie a inkubácia:

1. očkovanie : metóda zalievania vzorky agarom.
Prenáša sa 1 ml z dvoch vhodných po sebe nasledujúcich riedení, paralelne do sterilných Petriho misiek.

- Zalieva sa 15 ml kultivačnej pôdy udržovanej: MRS kultivačná pôda na 45 °C, M17 kultivačná pôda v rozpätí 44 ±47 °C, TOS kultivačná pôda na 48 °C.

- Bezprostredne po zaliatí sa zmes inokula s pôdou v Petriho miskách dôkladne premieša krúživým pohybom.

Poznámka:
Pre redukciu stresu pre laktobacily a bifidobaktérie na čo najnižšiu úroveň čas od prípravy primárneho riedenia až po zaliatie vzorky agarom by nemal presiahnuť 15 minút.

- Petriho misky sa umiestnia na chladnom vodorovnom mieste, aby zmes stuhla.

2. Inkubácia:

Pripravené misky sa inkubujú v termostate obrátene (viečkom dole).
1. misky na stanovenie počtu laktobacilov sa inkubujú teplote 37°± 1°C 72 hodín anaeróbne (Anaerocult C).
2. misky na stanovenie počtu streptokokov sa inkubujú pri 37°± 1°C 48 hodín aeróbne.
3. misky na stanovenie počtu bifidobaktérií sa inkubujú pri 37°± 1°C 72 hodín ± 3 hodiny anaeróbne (Anaerocult A).

6. Počítanie kolónií

Po predpísanej inkubácii sa počítajú kolónie vykazujúce charakteristické rysy uvedených rodov mikroorganizmov – viď.: 2. Princíp metódy a),b),c).

Pre stanovenie počtu laktobacilov, streptokokov sa vyberajú misky, kde vyrástlo 10 až 300 charakteristických kolónií
Pre stanovenie bifidobaktérií sa vyberajú misky s počtom kolónií ≤ 300.
Petriho misky sa prezerajú v nepriamom osvetlení.

Pre potvrdenie sa na miskách vyberú kolónie, ktoré sa ofarbia podľa Grama a potvrdia, že sú grampozitívne a katalázonegatívne tyčinky (v prípade rastu na kultivačnej pôde MRS), a grampozitívne, katalázonegatívne reťazce kokov alebo diplokokov (v prípade rastu na kultivačnej pôde M17).

7. Výpočet a vyjadrenie výsledku.

Postupuje sa podľa ČSN ISO 7889.

8. Literatúra

1.STN 56 0094 Stanovenie počtu baktérií rodu Lactobacillus
2.ČSN ISO 7889 Jogurt - Stanovenie počtu charakteristických mikroorganizmov - Technika stanovenia počtu kolónií pri 37 °C.
3.STN EN ISO 8261 Mlieko a mliečne výrobky. Všeobecné pravidlá úpravy analytických vzoriek, prípravy základných suspenzií a desaťnásobných riedení na mikrobiologické skúšanie.
4. Merck Microbiology Manual 12 th Edition: TOS Propionátový agar, základ
5. Bergy´s manuál