

MIKROBITESTY

Laktoflora[®]

Význam

Mikrobitesty představují **jednoduchou, levnou a praktickou mikrobiologickou metodu** k určení základních skupin mikroorganismů při mikrobiologických kontrolách v potravinářském průmyslu.

Tato metoda umožňuje **systematické sledování úrovně sanitace a dodržování technologických procesů.**

Podstata metody

Mikrobitesty jsou proužky speciálního papíru napuštěné vhodnou živnou půdou, obvykle s přídavkem indikátoru a selektivních činidel a s určitou nasávací schopností. Proužky mikrobitestu jsou uloženy v polyetylenových sáčcích, které současně slouží jako kultivační prostředí. Po namočení se nechávají kultivovat v termostatu při optimálních teplotách podle druhů určovaných skupin mikroorganismů.

Výhody

- **nižší náklady** na rozborů
- možnost provádět **velké množství rozborů najednou**
- **snazší a jednodušší** oproti klasickým metodám
- kontrolu mohou provádět **i nespécializovaní pracovníci**

Druhy mikrobitestů – podle skupin určovaných mikroorganismů

- MIKROBITEST **CA** ke stanovení koliformních bakterií
MIKROBITEST **CA-4** ke stanovení koliformních bakterií ve vodě
- MIKROBITEST **PRPM** ke stanovení všech redukujících mikrobů
- MIKROBITEST **P** ke stanovení plísní
MIKROBITEST **P-5** ke stanovení kontaminace vzdušnými plísněmi
- MIKROBITEST **K** ke stanovení kvasinek
- MIKROBITEST **CH** pro současné stanovení koliformních bakterií a *E. coli*

Všechny uvedené mikrobitesty se vyrábějí v modifikacích:

- ke stanovení v *běžných tekutinách* (s označením 1),
- ke stanovení ve *viskózních tekutinách* (s označením 2),
- ke stanovení *otiskovou metodou* (s označením 3).

Testy s označením 1, 2 a 3 se balí po 40 ks, testy s označením 4 a 5 po 2 ks v jednom expedičním balení.

MILCOM a.s. je držitelem certifikátu ČSN EN ISO 9001

MILCOM a.s.
Ke Dvoru 12a
Praha, 160 00
telefon: +420 235 354 551
+420 235 354 552
fax: +420 235 358 107
e-mail: milcom@milcom-as.cz



MILCOM a.s.

Druhy mikrobiteštů – podle povahy vyšetřovaného materiálu

- 1) **MIKROBITEŠTY základní (univerzální) s označením 1 ke stanovení v běžných tekutinách**, které nemají vysloveně viskózní charakter a jejichž pH neklesá pod 5. Nasávací schopnost testu je **0,5 ml tekutiny** a doba nasávání je **5 sekund**.
- 2) **MIKROBITEŠTY s označením 2 ke stanovení ve viskózních tekutinách** (např. smetana, vejce). Viskózní tekutiny ulpívají na papírku, čímž zvyšují množství tekutiny poutané papírkem a znesnadňují počítání kolonií. Proto jsme vyvinuli speciální mikrobitešty se stěrkou, kterou se shrne ulpělá přebytečná hmota po celé délce papírku od perforace až dolů (viz níže). Další postup je týž jako se základními mikrobitešty s tím rozdílem, že doba ponoření je podstatně delší v závislosti na teplotě a viskozitě zkoušené látky (u smetany trvá **asi 30 s**). Nasávací schopnost testu je **0,5 ml tekutiny**.
- 3) **MIKROBITEŠTY s označením 3 ke stanovení otiskovou metodou** se používají k orientačnímu průkazu mikroflóry na tuhých potravinách, na styčných plochách při kontrole sanitace apod. Mimo tekutých potravin je třeba často zkoušet i potraviny tuhé (tvrdé sýry, zmrazené potraviny), obaly potravin, čistotu rukou a styčných ploch po provedené sanitaci. K tomuto účelu máme pro Vás k dispozici speciální mikrobitešty, u nichž není deklarována savost, nýbrž otisková plocha 10 cm² (MIKROBITEŠT PRPM a K), resp. 15 cm² (MIKROBITEŠT CA, CH a P). Ke každému sáčku s mikrobiteštem je přiložen jeden prázdný průsvitný sáček. Práce s otiskovými papírkami se poněkud liší od všeobecných pokynů, a proto níže naleznete speciální metodiku.

TECHNIKA PRÁCE S MIKROBITESTY

Všeobecné směrnice pro práci s mikrobitem modifikace 1 a 2

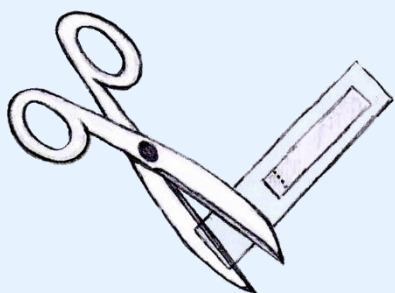
Mikrobitem vyjměte z obálky, nůžkami ožehnutými v plamenu rozstříhnete fólii na konci poblíž perforace, vysuňte papírek ze sáčku, uchopte jej za část oddělenou perforací a celý vytáhněte z obalu (obr. č. 1). Předtím pomocí papírku obal rozevřete a zmáčkněte rukou tak, aby se po celé délce rourovitě otevřel. Obal pak držte otevřený, nejlépe ve vodorovné poloze.

Proužek papírku držte za perforovanou část a krátce ponořte do zkoušené tekutiny, pro mikrobitem modifikace 1 obvykle na 5 vteřin (pokud není výslovně uvedeno jinak), pro mikrobitem modifikace 2 podstatně déle dle teploty a viskozity tekutiny (např. u smetany až 30 s). Při namáčení **rychle ponořte celý papírek kolmo na hladinu až k perforaci**. Jakýkoli jiný postup ponoření dává nepřesné, zpravidla nižší výsledky (obr. č. 2).

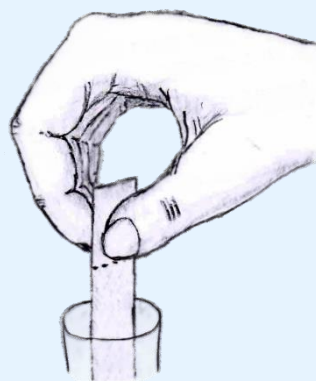
Po vytažení **přiložte papírek mikrobitemu modifikace 1 k hrdlu zkumavky, válečku nebo prachovnice** se zkoušenou tekutinou tak, aby přebytečná tekutina odtekla, čímž se zajistí, že papírek nasaje pouze deklarované množství tekutiny. **U mikrobitemu modifikace 2 přiloženou stěrkou shrňte ulpělou přebytečnou hmotu po celé délce papírku** od perforace až dolů. Vlhký **proužek papírku zasuněte do rourovitě otevřeného sáčku**, který nyní držte **ve svislé poloze**. Při zasouvání se nesmí papírek dotknout vnitřní stěny, protože jinak další zasouvání papírku vázne. Papírek se do sáčku nejlépe zasouvá v poloze, kdy je šířka papírku kolmá na šířku sáčku. Po vložení **stiskněte proužek i sáček pod perforací a ohmataný proužek v perforaci odtrhněte a odstraňte. Sáček těsně přimáčkněte na vložený proužek**, otevřený okraj stiskněte mezi dvěma skleněnými nebo kovovými destičkami nebo mezi dvěma podložními mikroskopickými sklíčky tak, aby konce přečnívaly asi 1 mm, načež okraje protáhněte nad plamenem a **sáček vzduchotěsně zatavejte** (obr. č. 3, 4, 5)¹.

Uzavřené sáčky s papírky **vložte zpět do obálky**, obálku umístěte **do termostatu a ve vodorovné poloze inkubujte po předepsanou dobu** pro daný druh mikrobitemu. Po inkubaci spočítejte **na obou stranách papírku** narostlé kolonie. Berte v úvahu jen ty papírky, které obsahují **20 až 200 kolonií**. Dávejte též pozor, aby kolonie případně prorůstající na obě strany nebyla počítána dvakrát. S výhodou lze použít prosvícení papírku, neboť pak z jedné strany můžete spočítat kolonie na obou stranách. Kolonie tvoří buď skutečné, tzv. **pravé kolonie** (papírky plísňové) nebo červené, příp. rezavé, ostře ohraničené tečky, tzv. **nepravé kolonie** (papírky k stanovení koliformních bakterií aj.). Růžové skvrny neurčitého tvaru se nepočítají.

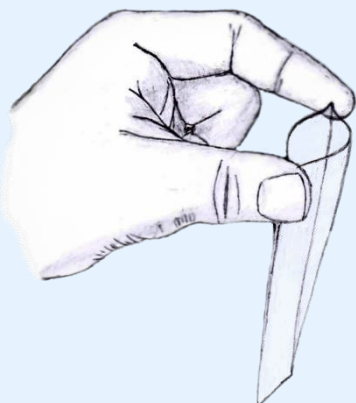
¹ Uvedený postup zatavování sáčku s mikrobitemem se liší u MIKROBITESTŮ P a K (viz níže).



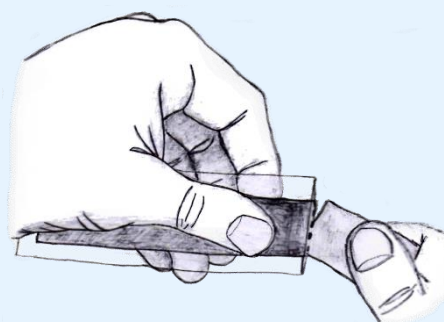
Obr. 1: Rozstřížení sáčku s mikrobitemem.



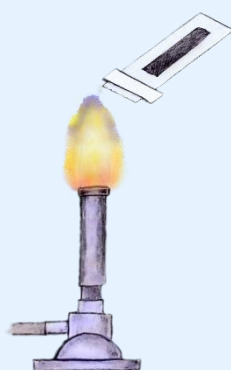
Obr. 2: Namočení mikrobitemu přímo do zkoušeného výrobku.



Obr. 3: Vložení namočeného mikrobitemu zpět do sáčku — způsob rozevření sáčku.



Obr. 4: Odtržení proužku odděleného perforací.



Obr. 5: Zatavení sáčku s mikrobitemem.

Všeobecné směrnice pro práci s mikrobitemem modifikace 3

Nůžkami ožehnutými v plamenu **ustříhnete sáček po 3 stranách kolem papírku, oddělte jednu část fólie**, uchopte papírek za část oddělenou perforací a **ponořte do fyziologického roztoku či do převařené vody na dobu 5 vteřin. Sterilní fyziologický roztok připravený k okamžitému použití lze zakoupit u firmy MILCOM a.s. (viz nabídkový list MILCOM a.s.).**

Po namočení **zbatve papírek přebytečné vody** přiložením spodku papírku k hrdlu zkumavky, válečku či jiné nádoby, v níž se roztok nachází. Papírek **přiložte po celé délce ke zkoušené ploše**, přiložte na něj jednu ze stěn průhledného sáčku, a to **sterilní vnitřní plochou**, a přitlačení této fólie **přimáčknete papírek na zkoušenou plochu**.

Průhledný obal oddělte, uchopte papírek za ohmatanou část a vložte jej **do prázdného přiloženého průhledného sáčku**, dosud nepoužitého. Papírek zasuněte jen k perforaci, **ohmatanou část papírku odtrhněte a sáček zatavte**. Zatavený sáček pak v obálce nepropouštějící světlo umístěte ve vodorovné poloze do termostatu.

Po inkubační době spočítejte kolonie. Výsledek udává znečištění plochy **10 cm²** u MIKROBITESTU PRPM a K a **15 cm²** u MIKROBITESTU CA, CH a P.

Popis jednotlivých typů mikrobitemů

MIKROBITEST CA

Tento typ mikrobitemů se používá ke **stanovení koliformních bakterií** (CA odvozeno z „coli-aerogenes“). Papírky se inkubují při **37 °C** po dobu **12-16 hodin**. Kolonie vyrůstají v podobě červených, zřetelně ohraničených teček.

MIKROBITEST PRPM

Tento typ mikrobitemů detekuje nejvíce druhů mikrobů (nejen saprofytů), čímž se velmi přibližuje ke **stanovení celkového počtu mikrobů**. Na těchto mikrobitemech rostou všechny významné patogenní druhy mikroorganismů, s výjimkou některých kmenů *Escherichiaceae*.

Papírky se inkubují při **30, příp. 37 °C po dobu 16-24 hodin**.

MIKROBITEST P

Tyto mikrobitemy se **zatavují do sáčku odlišným způsobem**, než je uvedeno v návodu (viz výše). U kvasinek a plísní je totiž důležité, aby v sáčku bylo **co nejvíce vzduchu**, a proto je třeba sáčky zatavovat **tzv. šev na šev (svár kolmo na svár)**. Hrany sáčku přitiskněte k sobě a sáček zatavte. Papírky mikrobitemu jsou výrobcem obarveny, aby mycelium dobře kontrastovalo. Kolonie plísní vyrůstají ve svých přírodních barvách.

Papírky se inkubují při **25 °C po dobu 5 dnů**.

MIKROBITESTY K

Tyto mikrobitemy se zatavují podobně jako MIKROBITESTY P. Inkubace při **30 °C po dobu 3, max. 4 dnů**.

MIKROBITESTY CH

Tyto mikrobitemy se **namáčejí do úplného smočení, tj. asi 30 s**. Inkubují se při **35-37 °C po dobu 16-24 h**. Kolonie koliformních bakterií narůstají v růžové až červené barvě, kolonie *E. coli* v barvě modré až fialové.

MIKROBITESTY CA-4

Koliformní bakterie se vyskytují v pitné vodě v malém množství, takže nebývají v 1 ml zachyceny. MIKROBITEST CA-4 je rulička papíru napuštěná živnou a indikační půdou **o savosti 10 ml**, uložená do sterilního průhledného sáčku. Ruličku **bez rozmotání namočte do zkoušené vody**. Namáčejte tak dlouho, **dokud unikají bublinky**. Poznáváme, že doba nasátí ruličky trvá **déle než jednu minutu**, někdy i několik minut. Potom **nechte ruličku odkapat** přiložením konce ruličky k hrdlu nádoby. Ruličku vložte zpět **do průhledného sáčku**, mírným stlačením ji **zploštěte** a **sáček zatavte** protáhnutím okrajem plamene. Sáček (vložený do obálky, která nepropouští světlo) pak vložte do termostatu. Kultivační podmínky jsou shodné s MIKROBITESTEM CA. Po inkubační době sáček rozevřete, ruličku po stažení gumičky rozviňte a spočítejte kolonie po obou stranách.

MIKROBITESTY P-5

Pro **stanovení nebezpečí kontaminace potravin vzdušnou mikroflórou** se používají mikrobity o ploše **100 cm²**. Jsou uzavřeny v polyetylenových sáčcích. K jejich použití je třeba cca **100 ml převařené vody nebo fyziologického roztoku**. **Sterilní fyziologický roztok připravený k okamžitému použití lze zakoupit u firmy MILCOM a.s. (viz nabídkový list MILCOM a.s.)**. Postup pro práci s těmito mikrobity je následující:

Sáček s mikrobitem **rozstříhnete na 1 straně**. Do sáčku s testem **nalijte vodu či fyziologický roztok** tak, aby se **celý test dostatečně navlhčil**. Poté vodu či fyziologický roztok ze sáčku **vylijte**. **POZOR:** Nenechte mikrobitem namáčet příliš dlouho, hrozí rozmočení a trhání testu při následné manipulaci (doporučujeme namáčet cca 5-10 s).

Sáček s mikrobitem **ostříhnete po dalších 2 stranách a rozevřete jej na způsob knihy**. Papírek nechte ležet **na vnitřní straně jedné stěny rozstříženého sáčku a ponechte 15 minut exponovat na vybraném místě**.

Poté **mikrobitem opatrně uchopte za perforaci** a vložte jej **do přiloženého sterilního sáčku** tak, aby v něm po uzavření **zůstal vzduch nutný pro kultivaci**. Před uzavřením sáčku **odtrhněte perforaci z mikrobitemu**. Mikrobitem uložte **do obálky nepropouštějící světlo** a ve vodorovné poloze **umístěte do termostatu**. Kultivační podmínky jsou shodné s MIKROBITESTEM P (25 °C/5 dní).

Po inkubační době spočítejte kolonie. **Výsledek udává nebezpečí kontaminace na ploše 100 cm² za dobu 15 min.**

Přehledná tabulka pro práci s mikrobitesty

| MIKROBITEST | použití | doba expozice | podmínky inkubace | popis kolonií |
|-------------------------------|---|--|----------------------------|--|
| CA (coli-aerogenes) | stanovení koliformních bakterií | cca 5 s | 37 °C/12-16 h | ostře ohraničené červené tečky |
| PRPM | stanovení všech redukujících mikrobů | 1 min | 30, příp. 37 °C 16-24 h | ostře ohraničené červené tečky |
| P | stanovení plísní | cca 5 s | 25 °C/5 dní | papírky dobře kontrastují s koloniemi plísní, které rostou v přírodních barvách |
| K | stanovení kvasinek | 1 min | 30 °C 3, max. 4 dny | kolonie kontrastují se zelenkavým podkladem |
| CH | současné stanovení koliformních bakterií a <i>E. coli</i> | do úplného smočení (asi 30 s) | 35-37 °C 16-24 h | růžové až červené kolonie (koliformní bakterie) modré až fialové kolonie (<i>E. coli</i>) |
| CA-4 | stanovení koliformních bakterií v pitné vodě, příp. i v jiných, nepatrně kontaminovaných tekutinách | dokud unikají bublinky (více než 1 minuta) | 37 °C/12-16 h | ostře ohraničené červené tečky |
| P-5 | stanovení kontaminace vzdušnými plísněmi | 15 min | 25 °C/5 dní | papírky dobře kontrastují s koloniemi plísní, které rostou v přírodních barvách |

Mikrobitesty skladujte v temnu a suchu.

MOŽNÉ PŘÍČINY NESPRÁVNÝCH VÝSLEDKŮ

- Papírek nebyl kolmo ponořen do zkoušené tekutiny.
- Přebytečná tekutina nestekla po stěnách zkumavky, válečku nebo prachovnice.
- Při inkubaci nebyl papírek ve vodorovné poloze a kapalina po papírku stékala, na jednom konci papírek přerůstá koloniemi a na druhém je prázdný.
- Nepostupovalo se asepticky. Sáček nebyl vzduchotěsně a vlhkotěsně uzavřen, papírek vysychal.
- Nesprávné výsledky nastávají u přerostlých papírků a při opožděném počítání kolonií.
- Nižší výsledky dostaneme tehdy, je-li zkoušená látka příliš kyselá (tzn., je-li pH vzorku nižší než 5,0) nebo příliš tučná. V takovém případě je třeba kyselou tekutinu neutralizovat v určitém poměru roztokem sody nebo zkoušet ředění tekutiny fyziologickým roztokem.
- U mikrobitestů ke stanovení koliformních bakterií nebo ke stanovení redukcí bakterií musí sáček přiléhat k papírku. Není-li tomu tak, můžete získat nesprávné výsledky. Naopak u mikrobitestů na stanovení plísní a kvasinek nesmí papírek k sáčku přiléhat.