

Indikátorové mikroorganismy v potravinách

Žádoucí

- přirozená mikroflóra
- čisté potravinářské kultury

Nežádoucí

- patogenní mikroorganismy
- mikroorganismy s nežádoucí enzymatickou aktivitou

Pozitivní účinek MO v potravinách

Výroba:

- fermentovaných mléčných výrobků
- fermentovaných masných výrobků
- droždí, vína, piva, octa, lihu, pečiva, kysané zeleniny, atd.

Uplatnění: přirozená mikroflóra x kulturní mikroflóra

Vliv: trvanlivost, organoleptické, fyzikální a chemické vlastnosti, zvýšení nutriční hodnoty, atd.

Negativní účinek MO v potravinách

MO přítomné v potravinách se mohou podílet na:

- mikrobiálním kažení potravin
- vzniku alimentárních infekcí (patogenní MO)
- vzniku alimentárních intoxikací (toxinogenní MO)

Sacharolytické MO

- bakterie, kvasinky, plísně
- tvorba alkoholů, kyselin
- a plynů (CO₂, H₂)

Proteolytické MO

- rody *Bacillus*, *Clostridium*, *Proteus*, dále *E. coli*, *Pseudomonas*, zástupci čeledě *Micrococcaceae*, některé plísně
- tvorba aminů a toxických biogenních aminů
- tvorba amoniaku, sirovodíku, indolu, skatolu (hnilobné bakterie)

Lipolytické MO

- *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, plísně – *Penicillium*, *Aspergillus*,
- kvasinky – *Geotrichum*, *Torulopsis*
- tvorba mastných kyselin, ketonů a methylketonů

Mikrobiologická analýza potravin

Mikrobiologické vyšetření potravin je nezbytné pro:

- kontrolu správnosti technologických postupů
- ověření trvanlivosti potravin
- zajištění bezpečnosti potravin

V praxi nelze vyšetřovat všechny nežádoucí mikroorganismy - vyšetřování pouze vytypovaných skupin, rodů, druhů = **indikátorové mikroorganismy**.

Indikátorové mikroorganismy

Stanovení indikátorových mikroorganismů, nám poskytuje důležité informace o mikrobiální kvalitě testovaných vzorků, údržnosti a bezpečnosti potravin.

Jedná se především o údaje o:

- kvalitě použitých surovin
- údaje poukazující na úroveň hygieny a sanitace v potravinářském provozu
- nedostatky v technologii výroby potravin
- sekundární kontaminaci

Výhody stanovení indikátorových (indexových) MO:

- rychlost
- jednoduchost (plotnové metody, hygikulty, Petrifilmy,...)
- finanční nenáročnost
- snadná rozpoznatelnost od jiných MO
- jejich výskyt a přežívání, pomnožování v potravině musí korelovat s patogenními MO

1. skupina indikátorových MO

Tato skupina indikátorových MO informuje o:

- primární a sekundární kontaminaci surovin, potravin a výrobních ploch
- dodržování technologických postupů a principů správné výrobní praxe (GMP=Good Manufacturing Practise).

Zahrnuje:

- celkový počet mikroorganismů (CPM)
- počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*
- počet koliformních bakterií
- počet *Escherichia coli*
- počet *Enterococcus* spp.
- počet psychrotrofních bakterií
- počet termorezistentních bakterií
- počet termofilních bakterií

2. skupina indikátorových MO

Tyto MO a jejich počty informují o kažení potravin.

Zahrnuje:

- počet kvasinek a plísní
- počet aerobních sporotvorných bakterií
- počet anaerobních sporotvorných bakterií
- počet proteolytických bakterií
- počet lipolytických bakterií
- bakterie rodu *Proteus*
- celkový počet mikroorganismů
- psychrotrofní mikroorganismy
- počet koliformních bakterií
- bakterie č. *Enterobacteriaceae*

Indexové mikroorganismy

Indexové MO informují o možné přítomnosti patogenních bakterií v potravinách nebo ve vodě.

- *Escherichia coli*
- termotolerantní koliformní bakterie
- Enterokoky

Celkový počet mikroorganismů (CPM)

Vyšší počty CPM v potravině (výrobku):

- byl vyroben ze surovin s vyšším CPM
- byl vyroben nevhodnou technologií
- hygienicky nevhodné prostředí, nářadí, zařízení
- nedostatečné chlazení, nevhodné podmínky skladování

Alternativní metoda pro CPM:

- 3M™ Petrifilm™ – Aerobic Count Plate
- Počítány všechny červené kolonie nezávisle na tvaru

Psychrotrofní MO

- MO, které bez ohledu na svou optimální teplotu růstu rostou i při teplotách do 7 °C.
- Psychrotrofnost se vyskytuje u různých rodů a druhů. Tyto bakterie mají v cytoplazmatické membráně větší množství nenasycených mastných kyselin, což jim umožňuje aktivní metabolismus při nízkých teplotách.
- G- psychrotrofy produkují extracelulární lipolytické i proteolytické enzymy.
- v přírodě jsou psychrotrofní MO hojně rozšířeny v půdě a vodě, způsobují kažení potravin (zejména skladovaných při chladírenských teplotách)
- indikátorový význam je podobný jako u CPM, zvýšené počty poukazují na primární či sekundární kontaminaci potravin z hlediska jejich chladírenského skladování
- stanovení: 10 dní při 6 °C, aerobně, GTK agar, počítáme všechny narostlé kolonie

Zástupci rodů: *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Proteus*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*

Termofilní MO

- MO s optimální teplotou růstu 45 - 50 °C, maximální teplota růstu je 80 °C
- při optimálních teplotách se vyznačují mimořádně vysokou metabolickou aktivitou a rychlostí růstu
- v potravinách způsobují senzorické změny
- tyto bakterie mají odlišné složení bílkovinných složek enzymů

Zástupci rodů: *Bacillus*, *Geobacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, aktinomycety

Stanovení: 48 h při 55 °C, aerobně, GTK agar, počítáme všechny narostlé kolonie

Termorezistentní MO

- MO odolné k vyšším teplotám 60 - 80 °C.
- stupeň rezistence závisí na fyziologickém stavu a genovém vybavení
- další faktory vyšší rezistence: shluky buněk => vyšší ochrana bakterií, vyšší termorezistence; obsah vody, přítomnost ochranných látek, vhodné pH
- spory – vyšší odolnost oproti vegetativním buňkám (přítomnost dipikolinátu vápenatého, morfologie spor)

Zástupci rodů: *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Clostridium*

Stanovení: vzorky se zahřejí na teplotu 63 °C/5 min, rychle ochladí a stanovují aerobně při 30 °C/72 h, GTK agar, počítáme všechny narostlé kolonie

Stanovení sporotvorných indikátorových bakterií

Aerobní sporotvorné bakterie

Vzorky se zahřejí na teplotu 80 °C/10 min

Podmínky inkubace: 30 °C/2-3 dny, aerobně, GTK či KA

Anaerobní sporotvorné bakterie

Vzorky se zahřejí na teplotu 80 °C/10 min

Podmínky inkubace: 37 °C/2-3 dny, anaerobně, GTK či KA

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*

Fakultativně anaerobní, nesporulující gramnegativní, oxidáza negativní, pohyblivé rovné tyčinky se zaoblenými konci v průměru 2-3 µm dlouhé.

Z pohledu potravinářského průmyslu se v rámci této čeledě vyskytují mikroorganismy:

- technologicky škodlivé (psychrotrofní druhy s proteolytickou a lipolytickou aktivitou, např. *Proteus*, *Serratia*)
- zdravotně škodlivé (patogenní a toxinogenní bakterie, např. salmonely, shigely, některé kmeny *E. coli*)
- indikátorové mikroorganismy fekální kontaminace

Stanovení: VČŽG agar, 37 °C, 24 h, aerobně, červené až fialové kolonie

Alternativní metoda pro *Enterobacteriaceae*:

- 3M™ Petrifilm™ – Enterobacteriaceae Count Plate
- *Enterobacteriaceae* jsou červené kolonie se žlutou zónou a červené kolonie s bublinkami plynu s nebo bez žluté zóny

Koliformní bakterie

- zástupci: *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Cronobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp.
- náleží do čeledi *Enterobacteriaceae*
- koliformní bakterie jsou fakultativně anaerobní nesporulující pohyblivé gramnegativní tyčinky
- koliformní bakterie jsou součástí intestinální mikroflóry člověka a teplokrevných živočichů
- indikátor fekálního znečištění a tím i možné přítomnosti patogenních MO z GIT
- indikátory dodržení sanitačních a technologických postupů
- ukazatel úrovně hygieny
- výskyt v pasterovaných výrobcích je známkou sekundární kontaminace nebo hrubých závad při tepelném ošetření
- význam mají některé psychrotrofní druhy a termorezistentní formy
- při fermentaci laktózy produkují kyseliny a plyn

Stanovení koliformních bakterií: VČŽL agar, 30 °C (37 °C), 48 h, aerobní kultivace, červenofialové kolonie s / bez zóny načervenalé precipitace žluče

Alternativní metoda pro koliformní bakterie:

- 3M™ Petrifilm™ – Rapid Coliform Count Plate
- červené kolonie se žlutou zónou

Escherichia coli

- *E. coli* (*Enterobacteriaceae*) běžná součást intestinální mikroflóry
- 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
- *E. coli* - indexový mikroorganismus pitné vody, indikuje možné riziko přítomnosti *Salmonella* spp.
- 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

Stanovení: TBX agar, 44 °C, 18-24 h, aerobně, *E. coli* s enzymem β -D-glukuronidáza: modré až tyrkysové kolonie

Alternativní metody pro stanovení *E. coli*:

- 3M™ Petrifilm™ – *E. coli*/Coliform Count Plate
- *E. coli* jsou modré až červenomodré kolonie s plynovou bublinkou
- koliformní bakterie jsou červené s plynovou bublinkou

***Enterococcus* spp.**

- rod *Enterococcus* je reprezentován G+ koky vyskytujícími se ve dvojicích či krátkých řetězcích, morfologicky velmi podobné streptokokům
- enterokoky vykazují značnou odolnost vůči nepříznivým vnějším podmínkám (60 °C/30 min, 6,5 % NaCl, 40 % žluči)
- jsou schopny růst v širokém rozmezí teplot (10 i 45 °C) a hodnot pH (9,6)
- enterokoky jsou indikátory fekální kontaminace
- výskyt enterokoků u tepelně opracovaných potravin je citlivým ukazatelem defektů pasteračního režimu a dalších technologických postupů
- mohou signalizovat přítomnost G+ patogenních bakterií s podobnou osmo a termotolerancí, např. *Listeria* spp. and *Staphylococcus* spp.

Stanovení: Slanetz-Bartley agar, 37 °C, 24-48 h, aerobně, enterokoky rostou v malých červenohnědých koloniích

Kvasinky a plísně

Kvasinky – jednobuněčné houby, hojně rozšířené v přírodě, většinou mají sacharolytické vlastnosti (často na ovoci, potravinách bohatých na cukry, odolávají kyselému prostředí, vyššímu osmotickému tlaku)

Plísně – obecně nenáročné, schopné využívat vzdušnou vlhkost, rozmnožovat se při nízké a_w , nízkých teplotách, vyšším osmotickém tlaku, kyselém prostředí, striktně aerobní, produkují proteolytické, lipolytické, sacharolytické enzymy

Stanovení: DRBC agar (chloramfenikolový agar s dichloranem a bengálskou červení), 25 °C, 5 dní, aerobně, kvasinky – narůžovělé, okrouhlé, matné nebo lesklé, pravidelný okraj, vypouklé; plísňe – velké, chmýřovité kolonie, s různě zbarvenými plodíci nebo sporujícími strukturami

Proteolytické a lipolytické MO

- rozklad bílkovin a tuků
- vedou ke zhoršení organoleptických vlastností a kažení potravin
- zástupci se vyskytují mezi psychrotrofními, mezofilními, termorezistentními, termofilními i obligátně anaerobními MO

Proteolytické mikroorganismy

- agar s odstředěným mlékem, 30 °C, 72 h, aerobně
- kolonie se zónou projasnění

Alternativní metoda:

agar se želatinou, po inkubaci přelití kyselým roztokem chloridu rtuťnatého, během minuty se kolem kolonií proteolytických MO vytvoří zóna želatinolýzy

Lipolytické mikroorganismy

- agar s želatinou a Tweenem, 30 °C, 72 h, aerobně
- kolonie se zónou precipitace

Stanovení mikrobiální kontaminace prostředí potravinářských podniků

Monitoring výrobního prostředí

- suroviny, pracovní plochy a zařízení, finální výrobky, potravináři
- odběry vzorků
- detekce patogenních, indikátorových MO
- typizace bakterií

Cílem je získat přesné informace o úrovni hygieny ve výrobním prostředí

Možná úskalí při odběru vzorků

- často špatně dostupná místa s výskytem nežádoucích mikroorganismů
- schopnost adheze mikroorganismů k povrchu a tvorby biofilmu
- subletální poškození mikroorganismů odebraných po sanitaci
- možnost ulpívání sanitačního prostředku na povrchu stěrových materiálů
- délka doby od odebrání vzorku po jeho zpracování v laboratoři

Odběr vzorků z prostředí

- identifikace míst ve výrobním prostředí, kde by se mohly vyskytovat nežádoucí mikroorganismy
- stanovení četnosti a vhodné doby odběru klíčových oblastí
- určení velikosti vzorkované plochy
- výběr vhodného odběrového materiálu

Stanovení mikrobiální kontaminace prostředí potravinářských podniků

Stěrová metoda

- ke zjišťování MO kontaminace povrchů výrobních ploch, zařízení, pomůcek, rukou, obalů i některých výrobků
- princip: přenesení MO z vyšetřovaného povrchu pomocí zvlhčeného tamponu do živného média
- kvalitativní – cílem je vyloučit/potvrdit přítomnost MO
- kvantitativní - provádí se z přesně definované plochy (sterilní šablona), stanovení počtu MO na vyšetřovanou plochu

Metoda seškrabu

- účinnější než stěr
- např. při hodnocení povrchové kontaminace drůbeže
- princip: přenesení MO z vyšetřovaného povrchu pomocí sterilního skalpelu do živného prostředí
- kvalitativní x kvantitativní

Otisková metoda

- princip: přenesení MO z vyšetřovaného povrchu lehkým přitlačením přímo na povrch živného média
- kontaktní Petriho misky – živné médium na misce převyšuje hranu spodního dílu misky, překryto upraveným víčkem
- Hygikulty – sklopné oboustranné nosiče pokryté živným médiem a uzavřené ve sterilních zkumavkách, výhody: snadné a rychlé použití mimo laboratoř

Metoda oplachu

- využívá se při MO vyšetření obtížně homogenizovatelných potravin (např. celé koření, sušené testoviny), některých typů obalů
- princip: přenesení MO na povrchu vzorku opláchnutím do živného média, uvolnění MO se je podpořeno protřepáváním vzorku

Metoda výplachu

- využívá se při MO vyšetření uzavíratelných obalů (lahví, krabic), potrubních systémů, úchovných tanků, přepravek
- princip: přenesení MO přítomných na vnitřní ploše obalu vypláchnutím do živného média

Metoda spadu

- využívá se při hodnocení MO čistoty ovzduší (obvykle se stanovuje CPM, někdy kvasinky, plísně)
- princip: pasivní přenesení MO přítomných v ovzduší spadem na povrch živného agarů v Petriho misce, expozice alespoň 10 min.
 - dobrá mikrobiální čistota ovzduší: max. 10 KTJ/Petriho miska/10 min. (tj. 1 KTJ/min.)
 - Aeroskop – přístroj umožňující vyšetřit přesně definovaný objem vzduchu, vzduch je nasáván hlavicí, ve které je Petriho miska s živným agarem

Petrifilmy

- Petrifilm je destička potažená živným médiem ve formě gelu.
- Inokuluje se 1 ml naředěného vzorku, po překrytí fólií a roztlačení vzorku se inkubují v termostatu.
- Další použití je při metodě otisku či spadu po předchozí rehydrataci gelu sterilním fyziologickým roztokem.

Výhody

- destička je opatřena mřížkou pro snazší počítání kolonií
- speciální indikátory zbarvují narostlé kolonie a tím je zvýrazňují
- některá stanovení jsou mezinárodně validována a mohou sloužit jako rovnocenná náhrada referenční kultivační metody (např. stanovení počtu *S. aureus*)