

Seminář VIAMILK, 22.11.2012,

**Laboratorní testování na přítomnost
koliformních bakterií,
psychrotrofních a
termorezistentních mikroorganismů
a sporotvorných anaerobních
bakterií**

Ing. Pavel Kopunecz, ČMSCH a.s.

Seminář VIAMILK, 22.11.2012,

Přehled metod hodnocení mikrobiologických ukazatelů mléka

Stanovení celkového počtu mikroorganismů přímým počítáním bakteriálních buněk

Princip

Nepřímá přístrojová metoda založená na snímání elektronických impulzů emitovaných (odraz světelných paprsků) obarvenými buněčnými jádry mikroorganismů

Počet impulzů se přepočítává pomocí kalibrační rovnice na CPM

Stanovení celkového počtu mikroorganismů přímým počítáním bakteriálních buněk

Výhoda

Rychlá metoda - výsledek lze ihned potvrdit opakovaným měřením

LRM opakují = potvrzují všechny vzorky přes 100 tisíc

Přesná metoda - z hlediska opakovatelnosti

Rozsah měření není omezen použitým ředěním

Příklad ze zkoušek vzorkařů výsledky CPM bazénových vzorků

Vzorkování 25.9.2012 (Choceň)

Vzorkař	Vzorek č. 1	Vzorek č. 2	Vzorek č. 3	Vzorek č. 4
A	13	14	13	9
B	12	12	11	11
C	12	12	11	12

Interval hodnot 9 až 13,

Průměr 11.8,

- 24% a + 10%

Příklad ze zkoušek vzorkařů výsledky CPM bazénových vzorků

Vzorkování 26.6.2012 (Hlinsko)

Vzorkař	Vzorek č. 1	Vzorek č. 2	Vzorek č. 3	Vzorek č. 4
A	94	101	87	101
B	114	108	98	99
C	103	112	93	125
D	114	102	103	101
E	95	95	98	100

*Interval hodnot 87 až 125,
Průměr 102.2, - 15% až + 22%*

Nejistoty měření akreditovaných metod

Metoda	Nejistota
Stanovení celkového počtu mikroorganismů kultivační metodou	25,4
Automatické stanovení bakterií v mléce přímým počítáním bakteriálních buněk	15,9
Stanovení koliformních bakterií kultivační metodou	20,4
Stanovení počtu somatických buněk fluoro-opto-elektronická metoda	9,3

Stanovení celkového počtu mikroorganismů přímým počítáním bakteriálních buněk

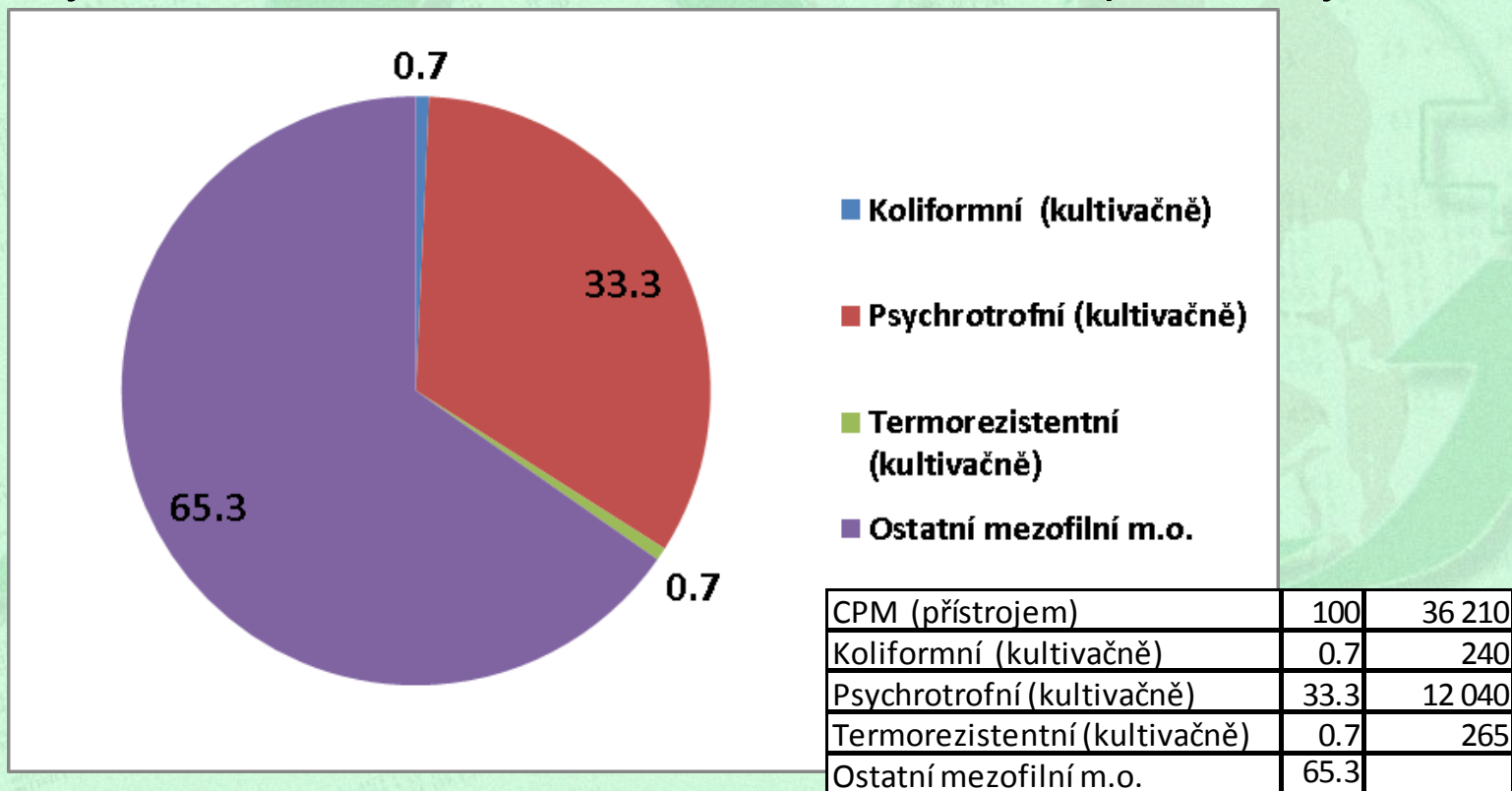
Nevýhoda

Kalibrace je nastavena na standardní (= průměrné) složení mikroflóry bazénových vzorků syrového mléka.

Vznikají tak individuální rozdíly mezi výsledky získanými pomocí klasických kultivačních metod a výsledky měřeními přístroji.

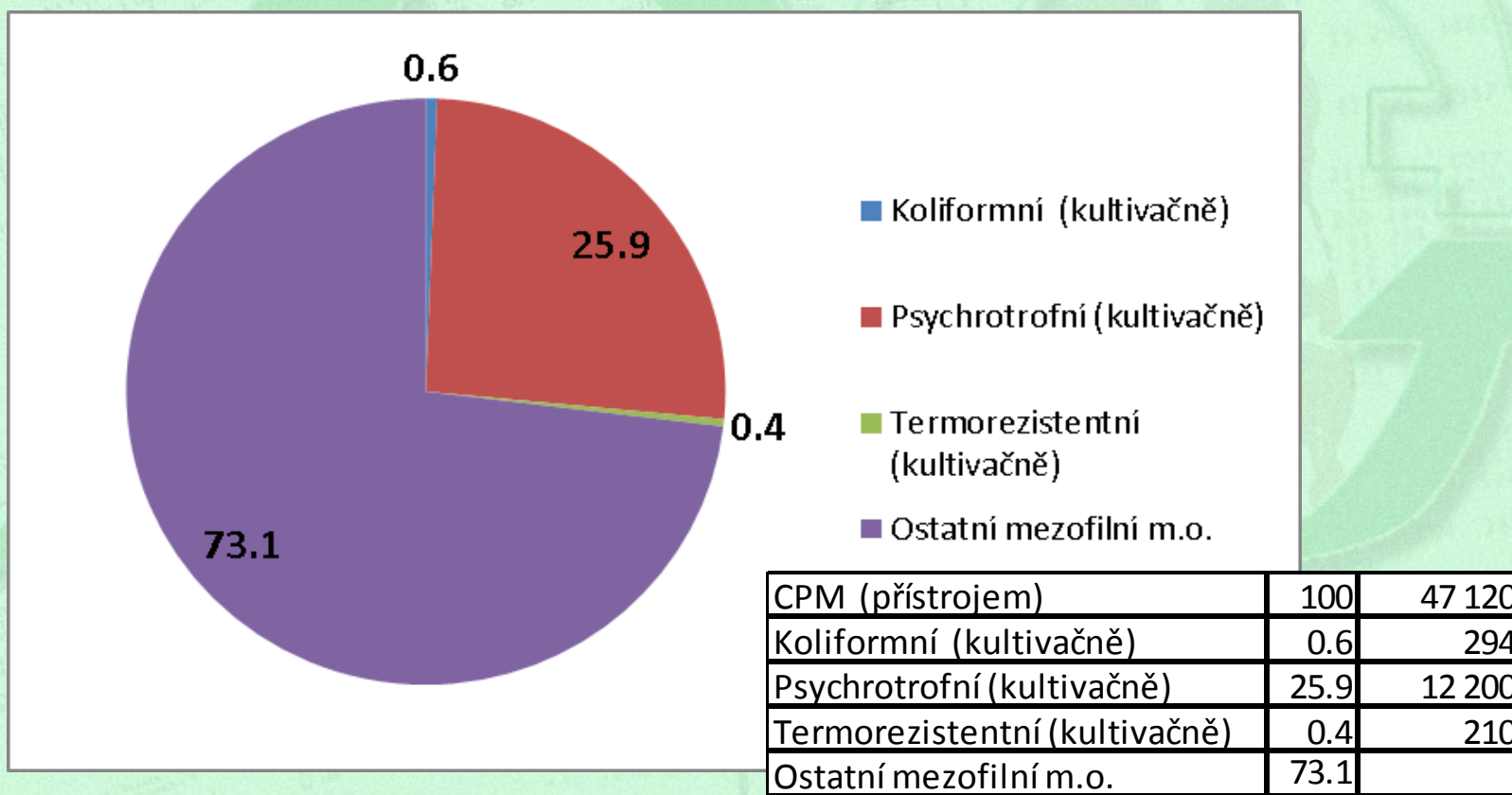
Průměrné složení mikroflóry bazénových vzorků syrového mléka podle hlavních skupin mikroorganismů

Výsledek z hodnot všech vzorků za rok 2011 zpracovaných v LRM



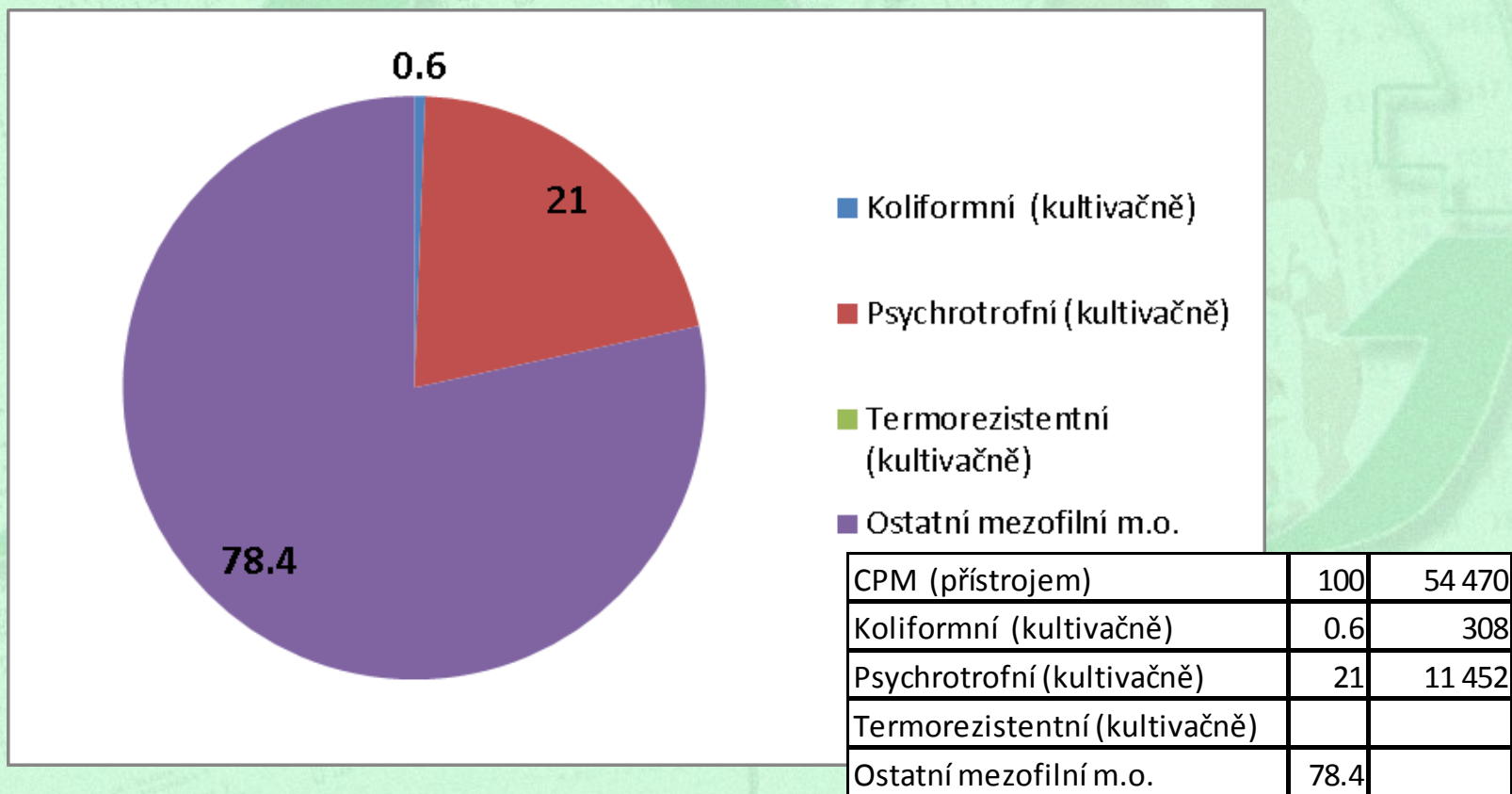
Průměrné složení mikroflóry bazénových vzorků syrového mléka podle hlavních skupin mikroorganismů

Výsledek z hodnot všech vzorků za září 2012



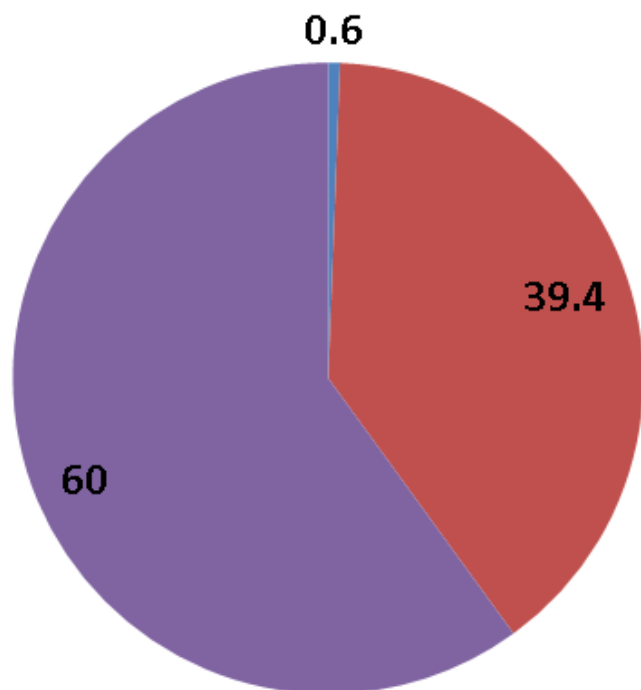
Průměrné složení mikroflóry bazénových vzorků syrového mléka podle hlavních skupin mikroorganismů

Výsledek z hodnot vzorků vybrané mlékárny za září 2012



Průměrné složení mikroflóry bazénových vzorků syrového mléka podle hlavních skupin mikroorganismů

Složení vzorků vybrané mlékárny s CPM nad 50 tisíc (září 2012)

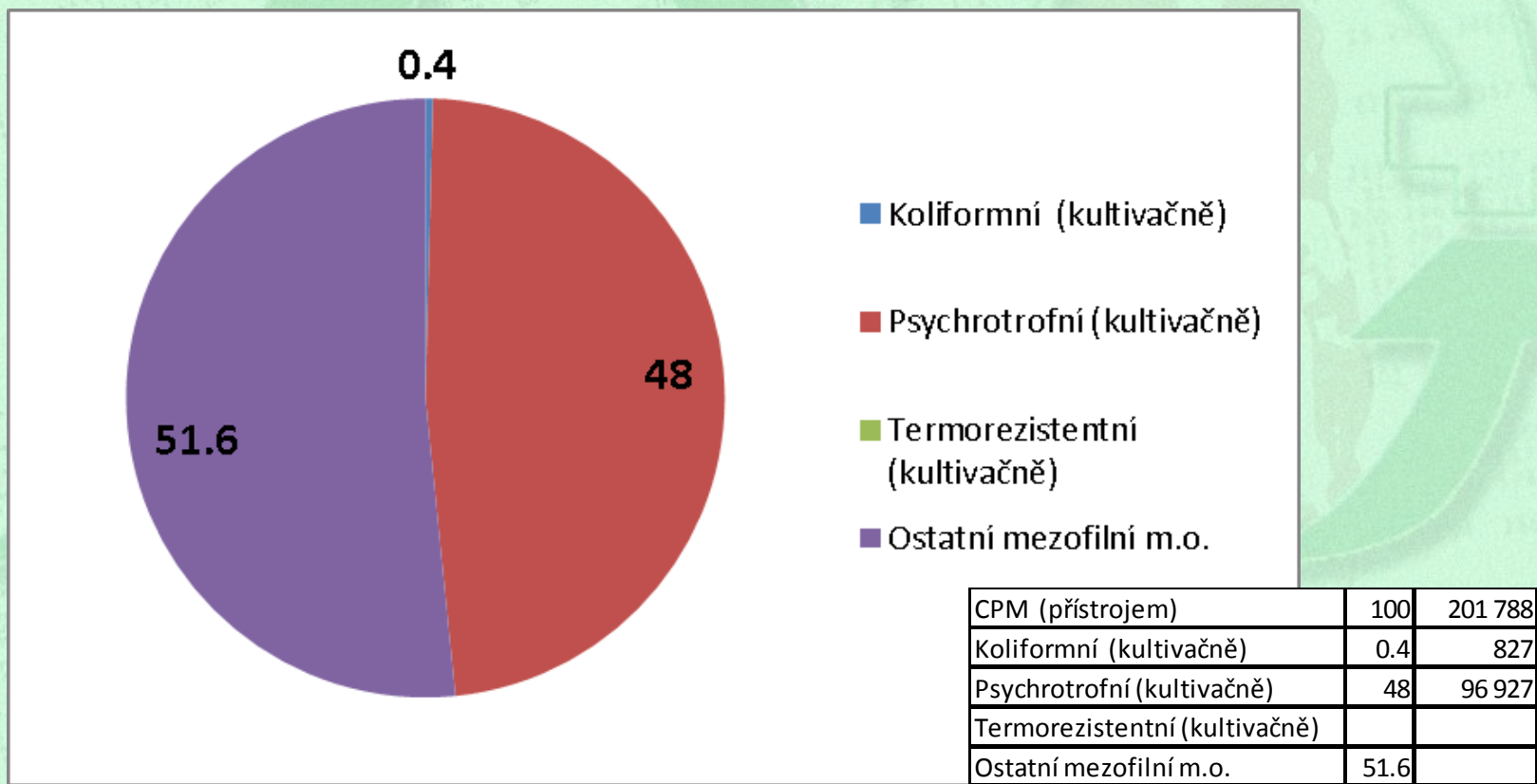


- Koliformní (kultivačně)
- Psychrotrofní (kultivačně)
- Termorezistentní (kultivačně)
- Ostatní mezofilní m.o.

CPM (přístrojem)	100	109 345
Koliformní (kultivačně)	0.6	718
Psychrotrofní (kultivačně)	39.4	43 100
Termorezistentní (kultivačně)		
Ostatní mezofilní m.o.	60	

Průměrné složení mikroflóry bazénových vzorků syrového mléka podle hlavních skupin mikroorganismů

Složení vzorků vybrané mlékárny s CPM nad 100 tisíc (září 2012)



60 120 180 240 300

Stanovení počtu koliformních bakterií vykultivovaných při 30 °C (ČSN ISO 5541/1)

Podstata zkoušky

Koliformní bakterie při 30°C zkvašují laktózu (s tvorbou plynu) a vykazují charakteristický růst za podmínek metody. Určený objem zkušební vzorku nebo řada jeho desetinásobných ředění se očkuje na Petriho misku a zalévá selektivní živnou půdou.

Inkubace misek

při 30 °C po dobu 24 hodin.

Normou stanovený limit 1000 v 1 ml

Stanovení počtu koliformních bakterií vykultivovaných při 30 °C (ČSN ISO 5541/1)

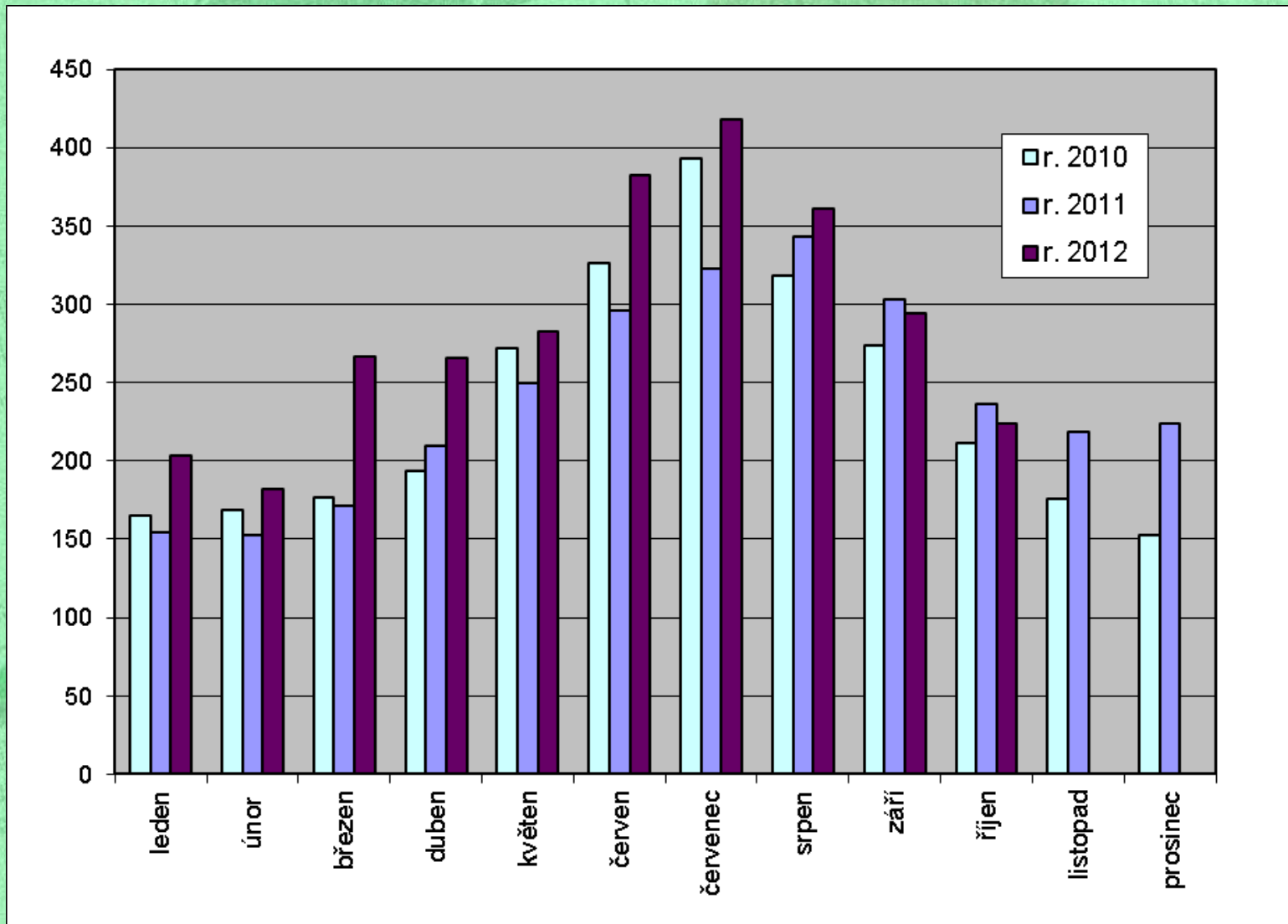
Vyhodnocení výsledků

Agarem zalité kolonie dosahují po 24 hodinách inkubace velikost 0,5 až 2 mm. Odečítají se všechny typické kolonie koliformních bakterií (jasně červené, někdy s úzkou zónou precipitátu).

Při standardně používaném ředění 10x je výsledek uváděn v hodnotách 15 až 150, to znamená po přepočtu 150 až 1500 mikroorganismů v 1 ml. Normou stanovené množství je do 1000.

Vyhodnocuje se výsledek souběžně zaočkovaných dvou Petriho misek a z nich se vypočítává průměr.

Stanovení počtu koliformních bakterií



50 100 150 200 250 300

Stanovení psychrotrofních mikroorganismů – rychlá metoda (ČSN ISO 8552)

Inkubace misek probíhá aerobně při 21 °C po dobu 25 hodin.

Nebo časově náročnější metoda kultivace při 6,5 °C po dobu 10 dnů.

Normou stanovený limit 50 tisíc v 1 ml

Stanovení psychrotrofních mikroorganismů – rychlá metoda (ČSN ISO 8552)

Vyhodnocení výsledků

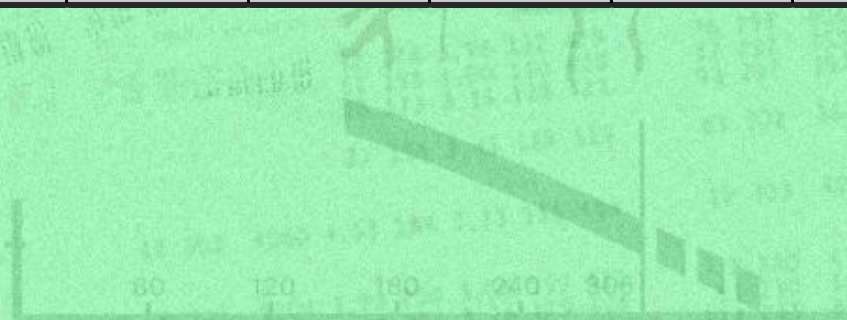
Po ukončení kultivace se počítají všechny vyrostlé kolonie bakterií, plísní a kvasinek.

Při standardně používaném ředění 1000 x je výsledek uváděn v hodnotách 30 až 300, to znamená po přepočtu 30 až 300 tisíc mikroorganismů v 1 ml.

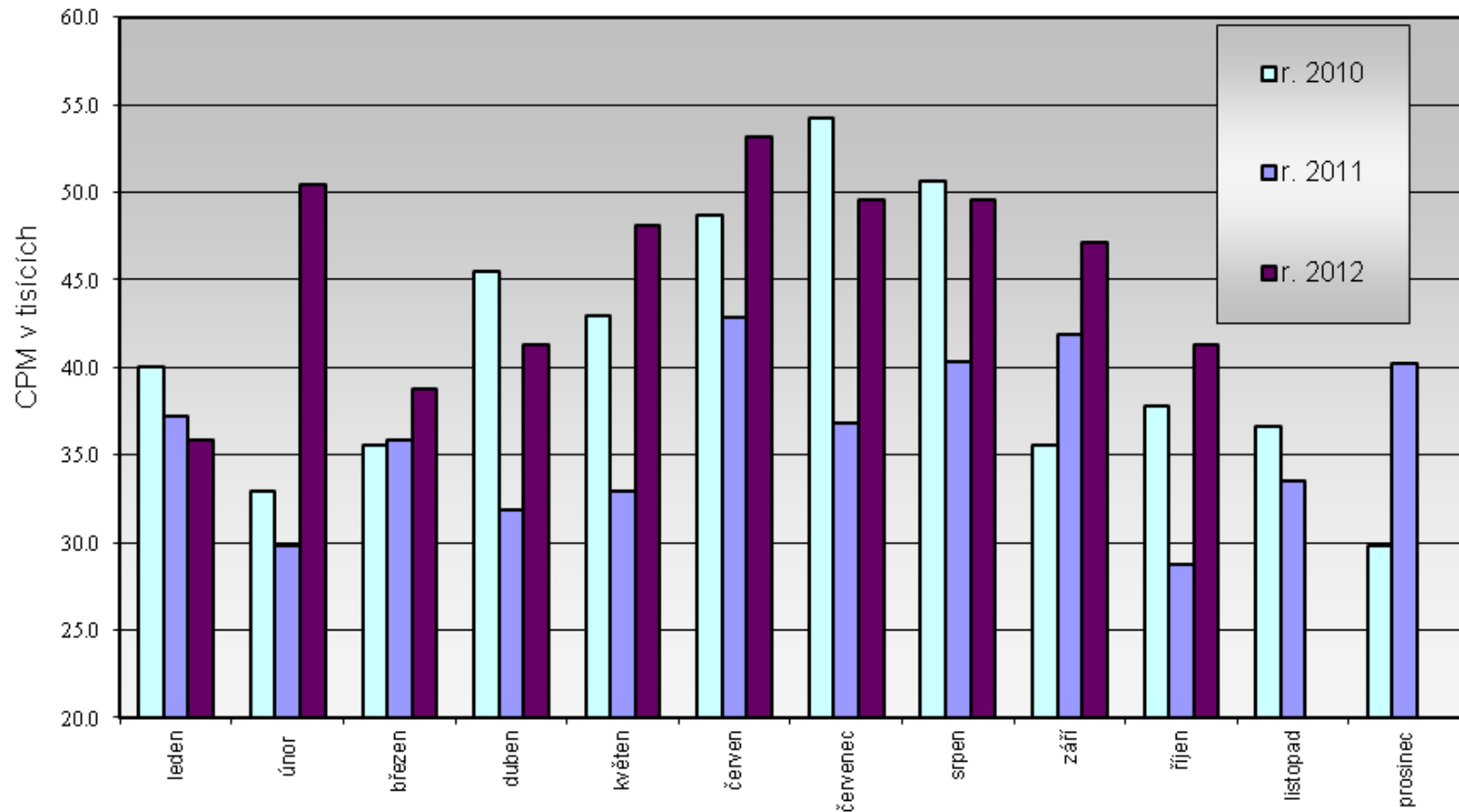
Vyhodnocuje se výsledek souběžně zaočkovaných dvou Petriho misek a z nich se vypočítává průměr.

Stanovení CPM

měsíc	r. 2004	r. 2005	r. 2006	r. 2007	r. 2008	r. 2009	r. 2010	r. 2011	r. 2012
	v tis.	v tis.	v tis.	v tis.	v tis.	v tis.	v tis.	v tis.	v tis.
leden	47.7	53.6	36.9	32.7	43.2	38.7	40.1	37.2	35.8
únor	47.9	41.8	47.0	32.0	36.4	34.9	32.9	29.8	50.4
březen	40.3	49.3	49.6	34.0	36.3	35.7	35.6	35.9	38.8
duben	38.6	45.0	49.0	37.1	46.0	39.7	45.4	31.8	41.3
květen	38.8	61.6	46.2	48.2	38.1	43.9	42.9	33.0	48.1
červen	42.8	50.2	60.9	51.3	53.4	43.4	48.7	42.8	53.2
červenec	46.9	50.0	55.9	37.9	43.7	51.0	54.2	36.8	49.6
srpen	43.7	43.1	35.7	39.9	40.4	47.9	50.6	40.3	49.6
září	36.9	42.3	44.4	40.2	33.6	44.2	35.5	41.9	47.1
říjen	37.1	34.5	34.1	55.0	38.2	37.0	37.8	28.7	41.3
listopad	49.3	33.1	33.1	40.5	39.0	35.9	36.7	33.5	
prosinec	43.4	36.8	30.8	37.3	34.9	33.8	29.8	40.2	
celkem	42.8	45.1	43.6	40.5	40.3	40.5	40.8	36.0	45.5



Stanovení CPM



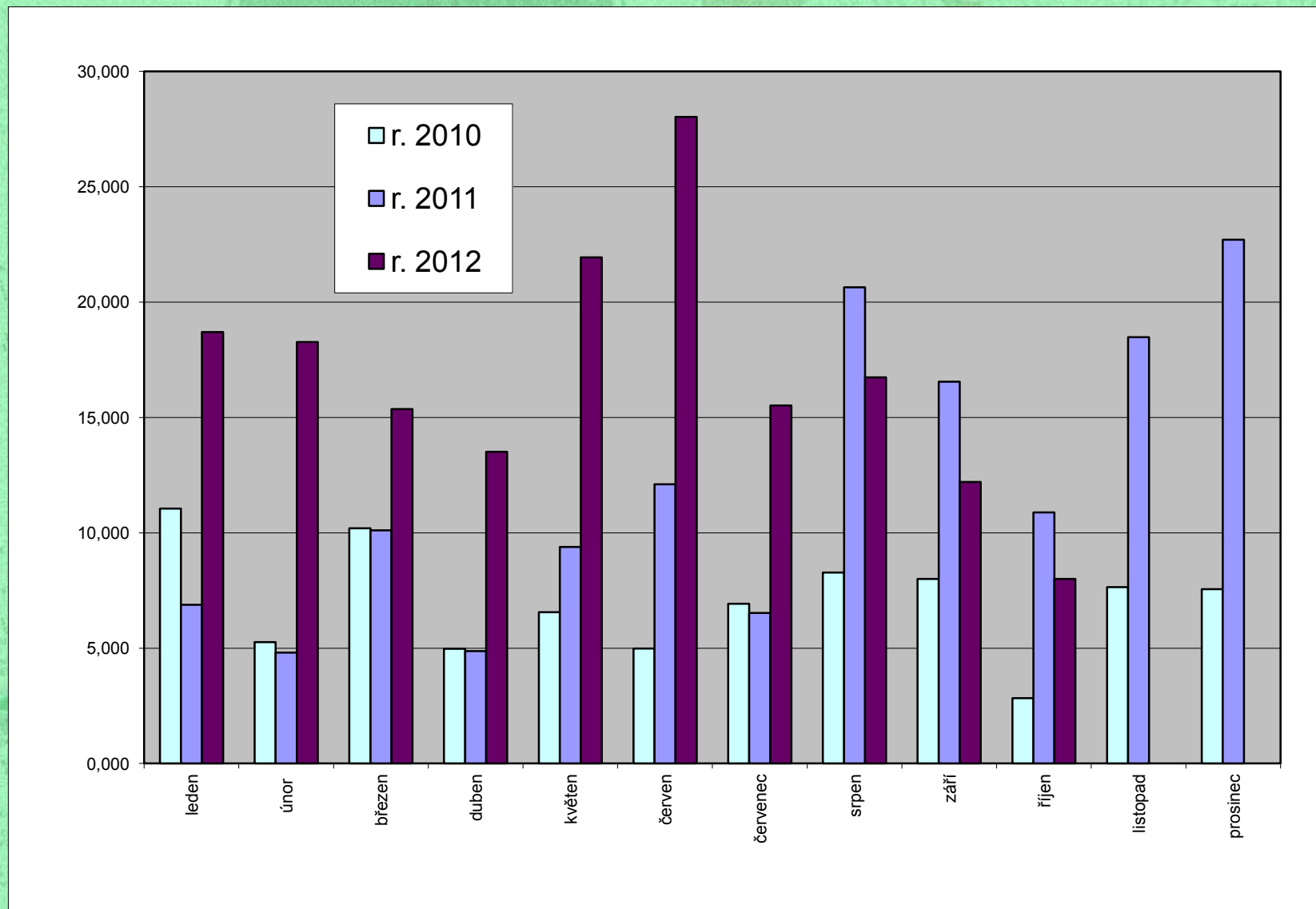
60 120 180 240 300

Stanovení psychotrofních mikroorganismů

měsíc	r. 2004	r. 2005	r. 2006	r. 2007	r. 2008	r. 2009	r. 2010	r. 2011	r. 2012
leden	7.40	5.45	5.61	16.23	10.07	6.09	11.05	6.88	18.70
únor	5.15	9.54	7.66	5.97	11.59	9.33	5.26	4.81	18.27
březen	5.50	4.26	11.52	7.58	6.00	10.15	10.19	10.11	15.36
duben	8.89	4.53	4.11	10.27	5.27	12.28	4.97	4.87	13.51
květen	10.78	11.97	4.50	4.94	14.57	7.60	6.55	9.39	21.94
červen	8.30	8.28	7.32	6.17	16.97	10.27	4.98	12.10	28.03
červenec	12.97	19.22	8.70	10.00	8.09	8.60	6.92	6.53	15.52
srpen	14.22	7.72	5.10	8.09	6.63	13.35	8.28	20.64	16.74
září	8.32	5.56	5.55	3.36	7.51	7.56	8.00	16.55	12.20
říjen	8.46	12.44	20.75	8.90	11.53	9.29	2.83	10.88	8.00
listopad	20.70	7.31	16.43	9.70	7.50	7.42	7.65	18.48	
prosinec	5.84	5.72	12.62	10.47	6.25	4.44	7.56	22.70	
celkem	9.71	8.50	9.16	8.47	9.33	8.87	7.02	12.00	16.83



Stanovení psychotrofních mikroorganismů



60 120 180 240 300

Stanovení termorezistentních mikroorganismů

Zaočkování předchází inaktivace vzorku mléka

Vzorek mléka se ve vodní lázni prohřeje při 85°C po dobu 5 minut, tím se tepelně zlikvidují všechny vegetativní skupiny mikroorganismů.

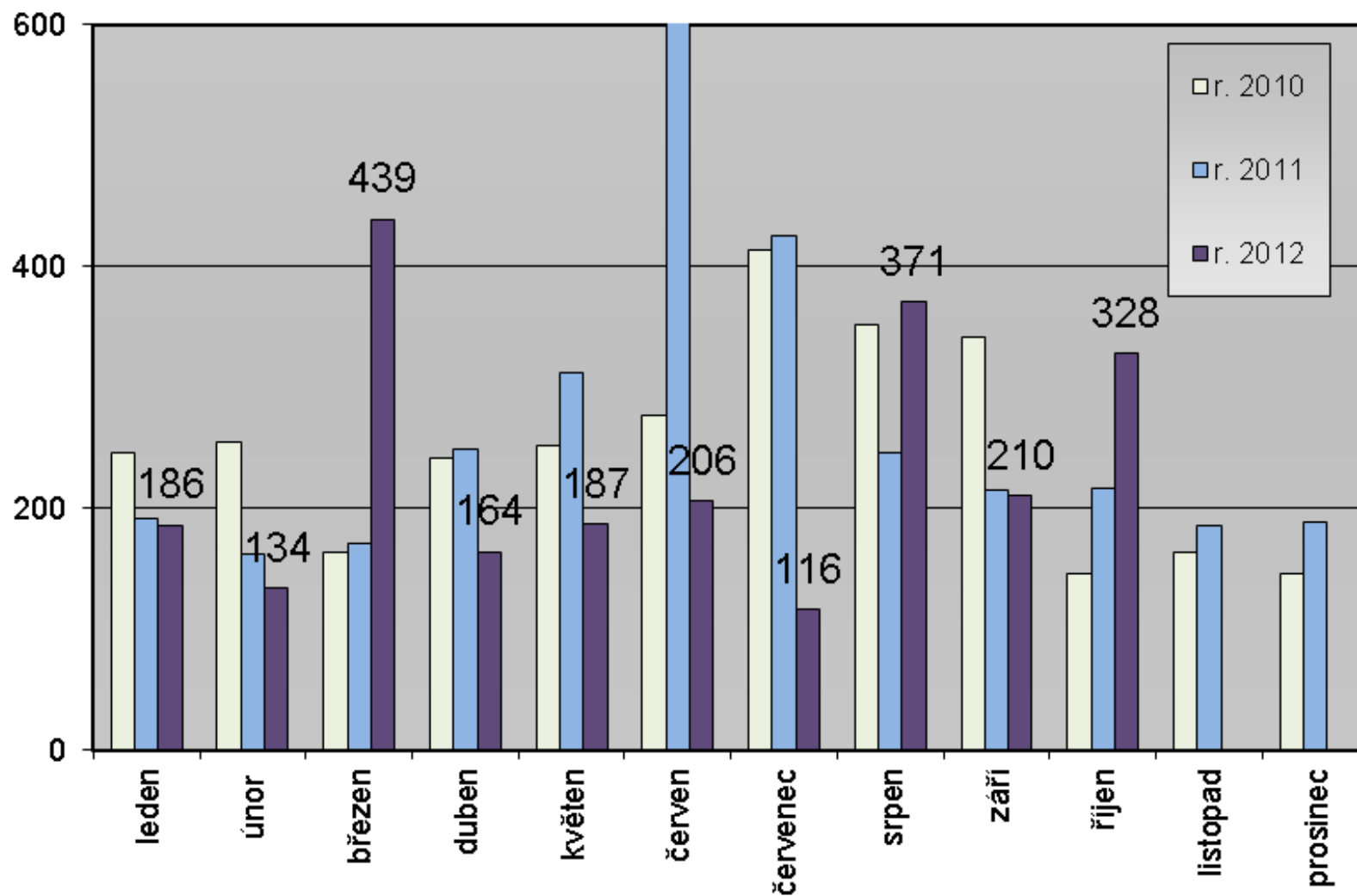
Ty mikroorganismy, které pak vyrostou na Petriho miskách jsou termorezistentní.

Při standardně používaném ředění 10 x je výsledek uváděn v hodnotách 30 až 300, to znamená po přepočtu 300 až 3000 mikroorganismů v 1 ml. Normou stanovené množství je do 2 000 v 1 ml

Inkubace misek probíhá aerobně při 30 °C po dobu 72 hodin.

Vyhodnocuje se výsledek souběžně zaočkovaných dvou Petriho misek a z nich se vypočítává průměr.

Stanovení termorezistentních mikroorganismů



Stanovení sporotvorných anaerobních bakterií průkaz přítomnosti v 0,1 ml

Před vlastním stanovením inaktivace veškeré doprovodné mikroflóry ve vodní lázni na teplotu 85 až 88 °C po dobu 10 minut.

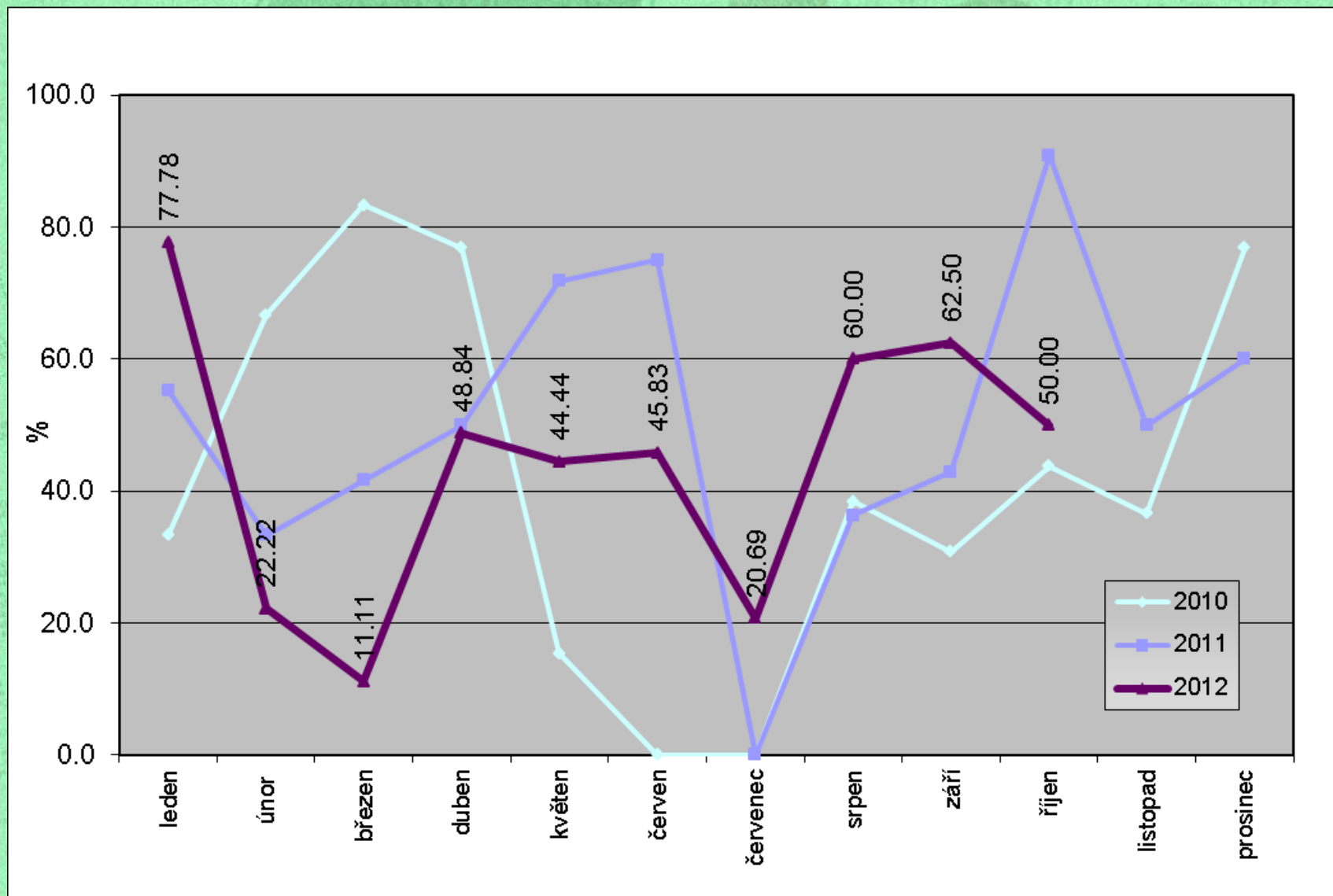
Inokulum tj. 0,1 ml vzorku mléka se naočkuje do živného media, které tvoří sterilní odstředěné mléko.

Zalítí parafinovazelinovou zátkou

Inkubace při 37°C po dobu 5 až 7 dnů.

Přítomnost sporotvorných anaerobních bakterií se projeví vznikem plynu nebo sražením živného media. Pozitivní jsou pouze vzorky, které vykazují změny v obou zkumavkách.

Stanovení sporotvorných anaerobních bakterií



60 120 180 240 300

Seminář VIAMILK, 22.11.2012,

Děkuji za pozornost