

## Stanovení celkového počtu mikroorganismů

*zpracování vzorku*

navážení, homogenizace a desetinasobné ředění vzorku



*inokulace*

**GTK agar**

zalití 1 ml

**30 °C, 72 h, aerobně**



*odečet výsledků*

počítání všech narostlých kolonií



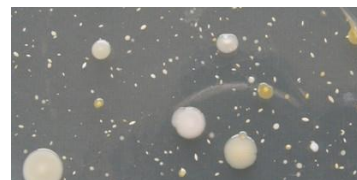
*stanovení počtu*

výpočet

**GTK** – agar s glukosou, tryptonem a kvasničným extraktem

### Typické kolonie – CPM

**GTK agar:** počítáme všechny narostlé kolonie bez ohledu na jejich barvu, velikost či tvar.



## Stanovení počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*

**zpracování vzorku**

navážení, homogenizace a desetinasobné ředění vzorku



**inokulace**

**VČŽG agar**

zalití 1 ml, opakované přelití

**37 °C, 24 h, aerobně**



**odečet výsledků**

počítání suspektních kolonií



**konfirmace**

5 charakteristických kolonií (z každé misky)

**test na průkaz oxidasy**

**fermentace glukosy s tvorbou kyseliny a plynu**



**stanovení počtu**

úprava počtu kolonií a výpočet

**VČŽG** – agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi a glukosou

## Typické kolonie bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*

**VČŽG agar:** kolonie růžovočervené, červené nebo fialové barvy, velikost 0,5 – 2 mm, mohou být obklopeny růžovou zónou precipitované žluče.



## Interpretace konfirmačních testů

**průkaz oxidasy**

**fermentace glukosy**

**tvorba plynu**

-

+

+

**Pozn.** Teplota 37 °C se používá tehdy, kdy stanovení počtu *Enterobacteriaceae* slouží jako hygienický indikátor. Lze využít i alternativní kultivační teplotu 30 °C, pokud se stanovení počtu *Enterobacteriaceae* provádí pro technologické účely a chceme zahrnout i psychrotrofní *Enterobacteriaceae*.

## Stanovení počtu koliformních bakterií

**zpracování vzorku**

navážení, homogenizace a desetinasobné ředění vzorku



**VČŽL agar**

**inokulace**

zalití 1 ml, opakované přelití  
**30 °C nebo 37 °C (podle dohody), 24 h, aerobně**  
(mléko a mléčné výrobky vždy 30 °C)



**odečet výsledků**

počítání suspektních kolonií



**konfirmace**

**typické kolonie – bez konfirmace**  
atypické kolonie – 5 kolonií (z každé misky)  
**fermentace laktosy s tvorbou kyseliny a plynu**



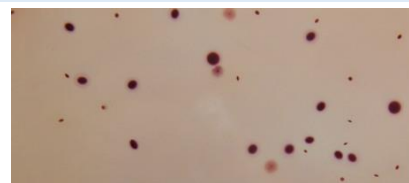
**stanovení počtu**

úprava počtu kolonií a výpočet

**VČŽL** – agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi a laktosou

### Typické kolonie koliformních bakterií

**VČŽL agar:** kolonie purpurově červené barvy, o průměru nejméně 0,5 mm, mohou být obklopeny načervenalou zónou precipitované žluče.



### Interpretace konfirmačních testů

**fermentace laktosy**

+

**tvorba plynu**

+

**Konfirmujeme** atypické formy kolonií a také všechny kolonie vyrostlé z mléčných výrobků obsahujících jiné sacharidy než laktosu (*metabolická přeměna jiných sacharidů než laktosy může vést k tvorbě kolonií podobajících se typickým koloniím koliformních bakterií*).

## Stanovení počtu $\beta$ -glukuronidázopozitivních *Escherichia coli*

**zpracování vzorku**

navážení, homogenizace a desetinasobné ředění vzorku



**inokulace**

**TBX agar**

roztěr 0,2 ml

**44 °C, 18 – 24 h, aerobně**



**odečet výsledků**

počítání suspektních kolonií



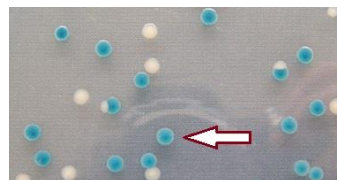
**stanovení počtu**

výpočet

**TBX** – agar s tryptonem, žlučovými solemi a glukuronidem

## Typické kolonie $\beta$ -glukuronidázopozitivních *Escherichia coli*

**TBX agar:** kolonie modré nebo modrozelené barvy, velikost 0,5 – 2 mm.



**Pozn.** Při použití chromogenního TBX agaru není confirmace normou vyžadována. Pro potvrzení výsledků lze použít test na průkaz indolu (*E. coli* je indol pozitivní). Dále, touto metodou nezachytíme kmeny *E. coli*, které nerostou při 44 °C a ty, které jsou  $\beta$ -glukuronidasa negativní (například *E. coli* O157).

## Stanovení počtu enterokoků

**zpracování vzorku**

navážení, homogenizace a desetinasobné ředění vzorku



**inokulace**

**S-B agar**

roztěr 0,2 ml

**37 °C, 24 – 48 h, aerobně**



**odečet výsledků**

počítání suspektních kolonií



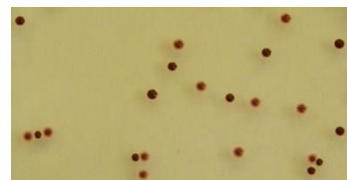
**stanovení počtu**

výpočet

S-B – Slanetz-Bartley agar

## Typické kolonie enterokoků

**S-B agar:** kolonie červené, červenohnědé až kaštanové barvy, pravidelné, okrouhlé, velikost 0,5 – 2 mm, může se objevit kovový lesk.



**Pozn.** Pro případnou confirmaci enterokoků lze využít růst na žluč-eskulinovém agaru (růst v přítomnosti 40 % žluče, hydrolýza eskulinu).

## Stanovení počtu kvasinek a plísní v potravinách s $a_w$ vyšší než 0,95

**zpracování vzorku**

navážení, homogenizace a desetinasobné ředění vzorku

**inokulace**

DRBC agar

roztěr 0,1 ml

25 °C, 5 dní, aerobně

**odečet výsledků**

počítání suspektních kolonií

**stanovení počtu**

výpočet

**DRBC** – chloramfenikolový agar s dichloranem a bengálskou červení

### Typické kolonie kvasinek a plísní

**DRBC agar – kvasinky:** matné nebo lesklé okrouhlé kolonie narůžovělé barvy, obvykle s pravidelným okrajem a více či méně vypouklým povrchem, velikost 3 mm a více.



**DRBC agar – plísně:** obrovské ploché nebo chmýřovité kolonie či propagule/zárodky často s různě zbarvenými plodíci nebo sporulujícími strukturami.



**Pozn.** Mezi potraviny s aktivitou vody vyšší než 0,95 patří vejce, maso, mléčné výrobky (s výjimkou sušeného mléka), ovoce, zelenina, čerstvé těstoviny, atd.

## Stanovení počtu kvasinek a plísní v potravinách s $a_w$ nižší nebo rovnou 0,95

**zpracování vzorku**

navážení, homogenizace a desetinasobné ředění vzorku

**inokulace**

↓  
**DG 18 agar**

roztěr 0,1 ml

25 °C, 5 dní, aerobně

**odečet výsledků**

↓  
počítání suspektních kolonií

**stanovení počtu**

↓  
výpočet

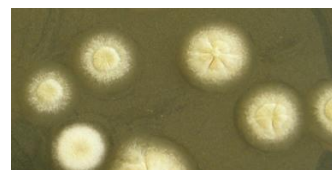
DG 18 – dichloran glycerolový agar

### Typické kolonie kvasinek a plísní

**DG 18 agar – kvasinky:** matné nebo lesklé okrouhlé kolonie bílé až smetanové barvy, obvykle s pravidelným okrajem a více či méně vypouklým povrchem, velikost 3 mm a více.



**DG 18 agar – plísně:** obrovské ploché nebo chmýřovité kolonie či propagule/zárodky často s různě zbarvenými plodíci nebo sporulujícími strukturami.



**Pozn.** Touto metodou se stanovují tzv. osmofilní kvasinky a xerofilní plísně. Mezi potraviny s aktivitou vody nižší nebo rovnou 0,95 patří sušené ovoce, pečivo, džemy, sušené maso, solené ryby, zrniny, cereálie a cereální produkty, mouka, ořechy a koření. Metodu nelze použít pro dehydrované výrobky s aktivitou vody nižší než 0,60 (např. sušené mléko).

## Stanovení počtu mezofilních bakterií mléčného kvašení

**zpracování vzorku**

navážení, homogenizace a desetinasobné ředění vzorku



**inokulace**

**MRS agar**

roztěr 0,2 ml

**30 °C, 72 h, anaerobně či mikroaerofilně**



**odečet výsledků**

počítání suspektních kolonií



**stanovení počtu**

výpočet

**MRS** – De Man, Rogosa a Sharpe agar (pH 5,7)

## Typické kolonie mezofilních bakterií mléčného kvašení

**MRS agar:** kolonie bezbarvé až smetanové barvy, pravidelné, okrouhlé, velikost 0,5 – 2 mm, typickým znakem je nakyslý zápach.



**Pozn.** Pro případnou confirmaci mezofilních bakterií mléčného kvašení lze použít Gramovo barvení (grampozitivní) či test na průkaz katalasy (katalasa negativní).

**Alternativní stanovení:** použití metody zalití 1 ml v kombinaci s aerobní kultivací.



## Stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů

**zpracování vzorku**

navážení, homogenizace a desetinasobné ředění vzorku



**inokulace**

**GTK agar**

roztěr 0,2 ml

**6,5 °C, 10 dnů, aerobně**



**odečet výsledků**

počítání suspektních kolonií



**stanovení počtu**

výpočet

**GTK** – agar s glukosou, tryptonem a kvasničným extraktem

### Typické kolonie psychrotrofních mikroorganismů

**GTK agar:** počítáme všechny narostlé kolonie bez ohledu na jejich barvu, velikost či tvar, včetně kolonií bodových.



**Pozn.** Pro stanovení psychrotrofních mikroorganismů v syrovém mléce lze využít zkrácený způsob, kdy se naočkované Petriho misky inkubují při teplotě 21 °C po dobu 25 hodin, aerobně.

## Stanovení počtu proteolytických mikroorganismů

*zpracování vzorku*

navážení, homogenizace a desetinasobné ředění vzorku



*inokulace*

**MO agar**

roztěr 0,2 ml

**30 °C, 72 h, aerobně**



*odečet výsledků*

počítání suspektních kolonií



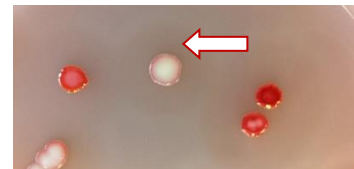
*stanovení počtu*

výpočet

**MO** – agar s odstředěným mlékem

## Typické kolonie proteolytických mikroorganismů

**MO agar:** počítáme všechny kolonie obklopené zónou projasnění, a to bez ohledu na jejich barvu, velikost či tvar.



## Stanovení počtu lipolytických mikroorganismů

*zpracování vzorku*

navážení, homogenizace a desetinasobné ředění vzorku



*inokulace*

**TW agar**

roztěr 0,2 ml

**30 °C, 72 h, aerobně**



*odečet výsledků*

počítání suspektních kolonií



*stanovení počtu*

výpočet

**TW** – agar s želatinou a Tweenem

## Typické kolonie lipolytických mikroorganismů

**TW agar:** počítáme všechny kolonie obklopené zónou precipitace, a to bez ohledu na jejich barvu, velikost či tvar.

