Praktické cvičení 1

1. Příprava kultivačních médií

navážka dehydrovaného média → **rozpuštění** v destilované vodě (obvykle v objemu 500 ml) → **bobtnání** (15 min při laboratorní teplotě; *pouze pevné půdy*) → **rozvaření** (vodní lázeň, proudící pára, mikrovlnná trouba; *pouze pevné půdy*) → **úprava pH** (na hodnotu danou výrobcem; *v některých laboratořích upravují pH aseptickým způsobem až po sterilizaci*) → **sterilizace** (obvykle autoklávování při 121 °C po dobu 15 minut; *pozor na výjimky např. VČŽL nebo S-B agar*) → **přídavek suplementů** (např. žloutková emulze, beraní krev, roztoky antibiotik) → **rozplnění** do Petriho misek

Praktický úkol:

- příprava určeného živného média

2. Kvantitativní metody kultivace mikroorganismů

- cílem je stanovení co nejpřesnějšího **počtu** dané skupiny či konkrétního mikroorganismu, výsledek se uvádí v **KTJ** (kolonie tvořící jednotky) **v 1 g či ml vzorku**
- popis Petriho misek provádíme vždy na **víčko**
- Petriho misky inkubujeme v termostatu **otočené dnem vzhůru**

Krok 1 – zpracování a ředění vzorku

- konkrétní postup bude uveden v rámci 3. cvičení

Krok 2 – inokulace vzorku na pevné půdy

- metoda zalití
- metoda roztěru
- konkrétní postup bude uveden v rámci 3. cvičení

3. Kvalitativní metody kultivace mikroorganismů

- cílem je průkaz **přítomnosti/nepřítomnosti daného mikroorganismu v dané navážce vzorku** (obvykle v 25 g vzorku, výjimky viz Nařízení 2073/2005)
- popis Petriho misek provádíme vždy na **dno**
- Petriho misky inkubujeme v termostatu **otočené dnem vzhůru**

Krok 1 – pomnožení v tekutých médiích

- ***jednostupňové*** (selektivní médium; např. průkaz *Campylobacter* spp.)
- ***dvoustupňové*** (neselektivní a selektivní médium, příp. selektivní médium se sníženou a selektivní médium s plnou koncentrací inhibitorů; např. průkaz *Listeria monocytogenes* či *Salmonella* spp.)

Krok 2 – izolace na pevné půdy

- vyočkování bakteriologickou kličkou (tzv. křížový roztěr)
- vyočkování skleněnou tyčinkou (rutinní způsob)

Krok 3 – konfirmace (potvrzení)

- vybrané morfologické, biochemické či serologické testy

Praktický úkol:

1. příprava suspenze *Staphylococcus aureus* o denzitě 0,5 McFarlanda

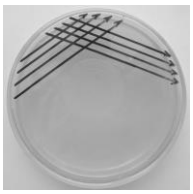
- do sterilní zkumavky pipetujeme 2 ml sterilního fyziologického roztoku
- kličkou nabereme 1-2 kolonie *S. aureus* a rozetřeme je ve fyziologickém roztoku ve zkumavce
- zkumavku důkladně promícháme na vortexu
- porovnáme intenzitu zákalu se standardem 0,5 McFarlanda (protřepat)
- dle potřeby postup opakujeme

2. vyočkování bakteriologickou kličkou

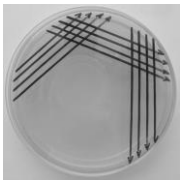
- GTK agar, inkubace 37 °C, 24 h, aerobně

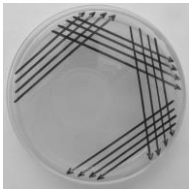
a) sterilní kličku namočíme do připravené suspenze a provedeme první vodorovné čáry

b) vezmeme novou kličku (**nenamáčíme do suspenze!)**, provedeme druhou sadu vodorovných čar tak, že vždy překřížíme čáry původní

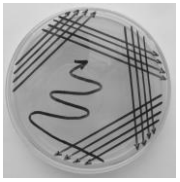


c) celý postup opakujeme ještě 2x, na každou sérii čar použijeme novou sterilní kličku





d) na závěr novou sterilní kličkou uděláme hadovitou čáru směrem ke středu misky

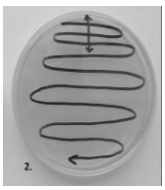


3. vyočkování skleněnou tyčinkou

- GTK agar, inkubace 37 °C, 24 h, aerobně

a) sterilní skleněnou tyčinku namočíme do připravené suspenze a uděláme krátkou čáru kolmo k okraji Petriho misky

b) vezmeme novou tyčinku (**nenamáčíme do suspenze!)**, hadovitým pohybem od okraje k okraji uděláme čáru po celé ploše Petriho misky, na začátku 3x přejedeme původní čáru



Praktické cvičení 2

1. Hodnocení morfologie mikroorganismů

Makroskopická morfologie

- hodnotíme vzhled kolonií narostlých na pevné živné půdě
- velikost, tvar, okraje, profil, barva (na základních a obohacených půdách tvorba pigmentu), povrch, konzistence (po nabrání na bakteriologickou kličku), interakce s živným médiem (projasnění, precipitace, změna barvy média), rychlost růstu

Mikroskopická morfologie

- hodnotíme vzhled buněk mikroorganismů v obarveném mikroskopickém preparátu ve světelném mikroskopu
- velikost (objektivně či subjektivně), tvar, uspořádání buněk, barvitelnost podle Grama

Příprava mikroskopického preparátu

na čisté a suché odmaštěné podložní sklíčko kápneme kapku sterilního fyziologického roztoku → bakteriologickou kličkou nabereme 1 izolovanou kolonii a rozetřeme ji ve fyziologickém roztoku na sklíčku → vzniklou suspenzi roztáhneme po celé ploše podložního sklíčka → necháme volně zaschnout → fixujeme 3x protažením v plameni

Barvení podle Grama

- preparát převrstvíme **krystalovou violetí** (Gram I), necháme působit 20 – 30 sekund
- barvivo slijeme a preparát převrstvíme **Lugolovým roztokem** (Gram II), necháme působit 20 – 30 sekund
- rychle odbarvujeme směsí **aceton-ethanol** (Gram III) dokud odtéká barva, ale maximálně 30 sekund
- preparát opláchneme destilovanou vodou
- preparát převrstvíme **karbolfuchsinem** (Gram IV), necháme působit 1 minutu
- preparát opláchneme destilovanou vodou, osušíme filtračním papírem přes hranu sklíčka a necháme volně zaschnout
- mikroorganismy pozorujeme ve světelném mikroskopu za použití imerzního oleje a imerzního objektivu (zvětšení 100×)

Praktický úkol:

- makroskopické a mikroskopické hodnocení morfologie zadaných mikroorganismů
- vyplnění protokolu

2. Biologické a biochemické vlastnosti mikroorganismů

- průkaz pohyblivosti, průkaz glykosidas (glukosový a laktosový bujon), růst na TSI agaru (glykosidasy, tvorba sirovodíku), průkaz katalasy, průkaz cytochromoxidasy (OXI test), tvorba indolu a průkaz β-D-glukuronidasy (COLI test), průkaz vázané koagulasy
- přesné pracovní postupy jsou uvedeny ve skriptech (1. díl)

3. Serologické metody

- rychlá sklíčková aglutinace, latexová aglutinace (Wellcolex® Colour *Salmonella* test)
- přesné pracovní postupy jsou uvedeny ve skriptech (1. díl)

Praktické cvičení 3

1. Stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám – disková difúzní metoda

- Stanovení citlivosti na základě hodnocení, zda vyšetřovaná bakterie ve stanovené koncentraci buněk vytvoří na agarové půdě **(Mueller-Hinton agar**, M-H) přípustnou kruhovou **zónu inhibice** kolem disku s určitou koncentrací antimikrobiální látky.
- Měří se **průměr** vzniklé inhibiční zóny (včetně disku), hodnoty se porovnávají s referenčními hodnotami pro citlivé kmeny. Bakterie se označí jako **citlivé**, intermediálně rezistentní či **rezistentní** k dané antimikrobiální látce.

Praktický úkol:

1. příprava bakteriální suspenze o denzitě 0,5 McFarlanda

- do sterilní zkumavky pipetujeme 2 ml sterilního fyziologického roztoku
- kličkou nabereme 1 kolonii vyšetřované bakterie a rozetřeme je ve fyziologickém roztoku ve zkumavce
- zkumavku důkladně promícháme na vortexu
- porovnáme intenzitu zákalu se standardem 0,5 McFarlanda (protřepat)
- dle potřeby postup opakujeme

2. disková difúzní metoda

- sterilním tamponem rozetřeme suspenzi po celé ploše předsušeného M-H agaru
- necháme chvíli zaschnout
- pomocí dispenzoru aplikujeme antibiotické disky
- každý disk lehce přitlačíme sterilní skleněnou tyčinkou
- inkubujeme při 37 °C, 18 – 24 hodin, aerobně
- po skončení inkubace měříme průměr vzniklé inhibiční zóny včetně disku, zjištěné hodnoty porovnáme s referenčními hodnotami pro citlivé kmeny (tabulka)

2. Odběr, zpracování a desetinásobné ředění vzorku

- Při odběru analytického vzorku nejprve vhodným způsobem dekontaminujeme jeho obal v místě otevření (opálení, otření 70% ethanolem), poté vhodnými sterilními nástroji obal otevřeme. Analytický vzorek musí být tzv. **průměrný** (zajistíme promícháním vhodným způsobem či odběrem z různých částí vzorku).
- Pro kvantitativní vyšetření odebíráme vždy **10 g vzorku**, u tekutých vzorků můžeme odebrat pouze **1 ml** (nebo inokulujeme vzorek přímo). K odběru použijeme vhodné sterilní nástroje či pomůcky.
- **Výchozí ředění (tj. 10^{-1}) pevného vzorku:** do sterilního homogenizačního sáčku odvážíme 10 g vzorku → přidáme 90 ml fyziologického roztoku → homogenizujeme 1,5 minuty na stomacheru.
- **Výchozí ředění (tj. 10^{-1}) tekutého vzorku:** do sterilní zkumavky napipetujeme 9 ml fyziologického roztoku → přidáme 1 ml vzorku → důkladně promícháme na vortexu.
- **Další desetinásobná ředění vzorku:** do sterilní zkumavky napipetujeme 9 ml fyziologického roztoku → přidáme 1 ml předchozího ředění vzorku → důkladně promícháme na vortexu. Opakujeme dle potřeby.

3. Stanovení celkového počtu mikroorganismů

- mezofilní aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy (bakterie, kvasinky, plísně) rostoucí na obohacených médiích při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin
- **agar s glukosou, tryptonem a kvasničným extraktem (GTK)**
- metoda: zalití 1 ml
- inkubace: 30 °C, 72 h, aerobně
- počítáme všechny narostlé kolonie bez ohledu na jejich tvar, velikost či barvu

Praktický úkol:

- vzorek: cukrářský výrobek s krémem
- použitá ředění: 10^{-3} a 10^{-4}, pro každé ředění připravíme 2 Petriho misky
- metoda: zalití 1 ml
- inkubace: 30 °C, 72 h, aerobně

Metoda zalití

- do prázdné sterilní Petriho misky napipetujeme 1 ml zvoleného ředění vzorku
- zalijeme asi 15 ml živného média vytemperovaného na teplotu cca 48 °C
- Petriho misku uzavřeme a opatrným krouživým pohybem promícháme inokulum s živnou půdou, necháme ztuhnout na vodorovné ploše
- poté misky umístíme do termostatu otočené **dnem vzhůru** a necháme inkubovat

Praktické cvičení 4

1. Metoda nejpravděpodobnější počtu mikroorganismů (metoda MPN)

- stanovení nízkých počtů mikroorganismů za použití tekutých živných půd, metoda je založena na pravděpodobnosti záchytu mikroorganismů ze vzorku
- hodnotíme počet pozitivních zkumavek v každém ředění (zákal, změna barvy, atd.), sestavíme tzv. trojčíselný kód, nejvýše pravděpodobný počet se zjistí v tabulkách MPN

Praktický úkol:

- vyhodnocení třízkumavkového testu stanovení CPM

2. Stanovení počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*

- gramnegativní střevní tyčinky (např. salmonely, shigelly, *Escherichia coli*), oxidasa negativní, fermentují glukosu s tvorbou kyseliny a plynu
- **agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi a glukosou (VČŽG)**
- metoda: zalití 1 ml, opakované přelití
- inkubace: 37 °C, 24 h, aerobně *(chceme-li z technologických důvodů zachytit i psychrotrofní kmeny použijeme teplotu 30 °C)*
- počítáme kolonie růžovočervené, červené nebo fialové barvy *(fermentace glukosy)* o průměru 0,5 – 2 mm, které mohou být obklopeny růžovou zónou precipitované žluče
- konfirmace: oxidasa (negativní), fermentace glukosy s tvorbou plynu (pozitivní)

Praktický úkol:

- vzorek: syrové kravské mléko
- použitá ředění: 10^{-2} a 10^{-3}, pro každé ředění připravíme 2 Petriho misky
- metoda: zalití 1 ml, opakované přelití
- inkubace: 37 °C, 24 h, aerobně

3. Stanovení počtu koliformních bakterií

- gramnegativní střevní tyčinky patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, společným znakem je fermentace laktosy s tvorbou kyseliny a plynu (např. *Escherichia coli*)
- **agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi a laktosou (VČŽL)**
- metoda: zalití 1 ml, opakované přelití
- inkubace: 30 či 37 °C (dle dohody), 24 h, aerobně (mléko a mléčné výrobky vždy 30 °C)
- počítáme kolonie purpurově červené barvy *(fermentace laktosy)* o průměru nejméně 0,5 mm, mohou být obklopeny načervenalou zónou precipitované žluče
- konfirmace atypických kolonií: fermentace laktosy s tvorbou plynu (pozitivní)

Praktický úkol:

- vzorek: syrové kravské mléko
- použitá ředění: 10^{-2} a 10^{-3}

Petrifilm™

- odklopíme krycí folii a doprostřed výseče napipetujeme 1 ml vzorku
- krycí folii opatrně přiklopíme, dáváme pozor na bublinky vzduchu
- pomocí roztlačovátka rozprostřeme vzorek po celé ploše kruhové výseče
- inkubujeme v termostatu při 37 °C, 24 h, aerobně

4. Stanovení počtu β-glukuronidázopozitivních *Escherichia coli*

- gramnegativní pohyblivá střevní tyčinka z čeledi *Enterobacteriaceae*, nejvýznamnější zástupce koliformních bakterií, indol pozitivní, β-D-glukuronidasa pozitivní, fermentuje sorbitol
- **agar s tryptonem, žlučovými solemi a glukuronidem (TBX)**
- metoda: roztěr 0,2 ml
- inkubace: 44 °C, 18 – 24 h, aerobně
- počítáme kolonie modré nebo modrozelené barvy *(aktivita β-D-glukuronidasy)* o průměru 0,5 – 2 mm
- konfirmace: v případě potřeby lze využít průkaz tvorby indolu (pozitivní)

Praktický úkol:

- vzorek: majonézový salát
- použitá ředění: 10^{-2} a 10^{-3}, pro každé ředění připravíme 1 Petriho misku
- metoda: roztěr 0,2 ml
- inkubace: 44 °C, 18 – 24 h, aerobně

Metoda roztěru

- do předsušené Petriho misky s agarem napipetujeme 0,2 ml zvoleného ředění vzorku
- pomocí sterilní skleněné hokejky inokulum opatrně rozetřeme po celé ploše Petriho misky (ve třech směrech) a necháme vsáknout
- poté misky umístíme do termostatu otočené **dnem vzhůru** a necháme inkubovat

5. Stanovení počtu bakterií rodu *Enterococcus* (počet enterokoků)

- grampozitivní koky vyskytující se ve dvojicích či krátkých řetízcích schopné růstu v širokém rozmezí teplot a hodnot pH a značně odolné vůči nepříznivým vnějším podmínkám (růst při 10 i 45 °C, v bujónu s 6,5 % NaCl, při pH 9,6 i v přítomnosti 40 % žluči či 0,1% methylenové modři, přežívají záhřev na 60 °C po dobu 30 minut), nejčastější druhy *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*
- **Slanetz-Bartley agar (S-B)**
- metoda: roztěr 0,2 ml
- inkubace: 37 °C, 24 – 48 h, aerobně
- počítáme drobné červené, červenohnědé či kaštanové kolonie *(redukce triphenyl-tetrazolium-chloridu),* případně se může objevit kovový lesk
- konfirmace: v případě potřeby lze využít růst v přítomnosti 40 % žluči a průkaz hydrolýzy eskulinu (žluč-eskulinový agar, BE)

Praktický úkol:

- vzorek: sušené mléko
- pro homogenizaci vzorku se doporučuje použít temperovaný fyziologický roztok (37 °C)
- použitá ředění: 10^{-2} a 10^{-3}, pro každé ředění připravíme 1 Petriho misku
- metoda: roztěr 0,2 ml
- inkubace: 37 °C, 24 – 48 h, aerobně

Praktické cvičení 5

1. Stanovení počtu mezofilních bakterií mléčného kvašení

- mezi bakterie mléčného kvašení (BMK) patří celá řada rodů grampozitivních bakterií, např. laktokoky, enterokoky, streptokoky, leukonostoky, pediokoky či laktobacily, které metabolizují hexosy homo- či heterofermentativní cestou na kyselinu mléčnou a další produkty
- **De Man, Rogosa a Sharpe agar (MRS)**
- metoda: roztěr 0,2 ml
- inkubace: 30 °C, 72 h, anaerobně či mikroaerofilně (v případě použití metody zalití lze kultivovat aerobně)
- počítáme pravidelné, drobné, okrouhlé kolonie bezbarvé až smetanové barvy o průměru 0,5 – 2 mm, typickým znakem je nakyslý zápach
- konfirmace: v případě potřeby Gramovo barvení, průkaz katalasy (negativní)

Praktický úkol:

- vzorek: tvaroh
- použitá ředění: 10^{-2} a 10^{-3}, pro každé ředění připravíme 1 Petriho misku
- metoda: roztěr 0,2 ml
- inkubace: 30 °C, 72 h, anaerobně (v anaerostatu se zapálenou svíčkou)

2. Stanovení počtu kvasinek a plísní

- kvasinky a plísně patří mezi mikrobiální eukaryota, použitá metoda stanovení se volí podle charakteru vyšetřované potraviny (její aktivity vody)
- **chloramfenikolový agar s dichloranem a bengálskou červení (DRBC)** pro potraviny a aktivitou vody vyšší než 0,95
- **dichloran glycerolový agar (DG 18)** pro potraviny s aktivitou vody nižší nebo rovnou 0,95
- metoda: roztěr 0,1 ml
- inkubace: 25 °C, 5 dní, aerobně (odečet výsledků se provádí průběžně)
- misky ukládáme do termostatu v otevřeném sáčku **víčkem vzhůru**
- ***kvasinky*** – matné nebo lesklé okrouhlé kolonie, obvykle s pravidelným okrajem a více či méně vypouklým povrchem, bílé až smetanové barvy (na DRBC narůžovělé), velikost 3 mm a více
- ***plísně*** – obrovské ploché nebo chmýřovité kolonie či propagule/zárodky často s různě zbarvenými plodícími nebo sporulujícími strukturami

Praktický úkol:

1. potravina s a_w vyšší než 0,95

- vzorek: tvaroh
- použitá ředění: 10^{-2} a 10^{-3}, pro každé ředění připravíme 1 Petriho misku
- metoda: roztěr 0,1 ml
- inkubace: 25 °C, 5 dní, aerobně

2. potravina s a_w nižší nebo rovnou 0,95

- vzorek: celé koření
- zpracování vzorku: metoda oplachu
- použitá ředění: 10^{-1} a 10^{-2}, pro každé ředění připravíme 1 Petriho misku
- metoda: roztěr 0,1 ml
- inkubace: 25 °C, 5 dní, aerobně

Metoda oplachu

- vzorek navážíme do sterilní Erlenmayerovy baňky a zalijeme **desetinásobným** množstvím sterilního ředícího roztoku (**10 g vzorku + 100 ml fyziologického roztoku**)
- třepeme na třepačce při cca 300 rpm po dobu 20 minut (dle povahy vzorku)
- připravenou výchozí suspenzi (10^{-1}) můžeme dále obvyklým způsobem ředit

3. Stanovení počtu proteolytických mikroorganismů

- proteolytické mikroorganismy produkují enzymy, které rozkládají bílkoviny přidané do živného média a vytvářejí okolo kolonií zónu projasnění
- **agar s odstředěným mlékem (MO)**
- metoda: roztěr 0,2 ml
- inkubace: 30 °C, 72 h, aerobně
- počítáme všechny kolonie obklopené zónou projasnění, a to bez ohledu na jejich barvu, velikost či tvar

Praktický úkol:

- vzorek: syrové kravské mléko
- použitá ředění: 10^{-2} a 10^{-3}, pro každé ředění připravíme 1 Petriho misku
- metoda: roztěr 0,2 ml
- inkubace: 30 °C, 72 h, aerobně

4. Stanovení počtu lipolytických mikroorganismů

- lipolytické mikroorganismy produkují enzymy, které rozkládají bílkoviny přidané do živného média a vytvářejí okolo kolonií zónu projasnění
- **agar s želatinou a Tweenem (TW)**
- metoda: roztěr 0,2 ml
- inkubace: 30 °C, 72 h, aerobně
- počítáme všechny kolonie obklopené zónou precipitace, a to bez ohledu na jejich barvu, velikost či tvar

Praktický úkol:

- vzorek: syrové kravské mléko
- použitá ředění: 10^{-2} a 10^{-3}, pro každé ředění připravíme 1 Petriho misku
- metoda: roztěr 0,2 ml
- inkubace: 30 °C, 72 h, aerobně

Praktické cvičení 6

1. Průkaz bakterií rodu *Salmonella*

- čeleď *Enterobacteriaceae*, gramnegativní, fakultativně anaerobní, nesporotvorné tyčinky, zkvašují glukosu, většinou jsou katalasa pozitivní, oxidasa negativní, redukují nitráty na nitrity, dekarboxylují lyzin, arginin a ornitin, produkují sirovodík
- *neselektivní pomnožení:* **pufrovaná peptonová voda (PPV)**; 37 °C, 16 – 20 h, aerobně
- *selektivní pomnožení:* **Rappaport Vassiliadis soja médium (RVS)**; 42 °C, 24 h, aerobně; a **Mueller-Kauffman tetrathionát novobicin médium (MKTTn)**; 37 °C, 24 h, aerobně
- *izolace:* **agar s xylosou, lysinem a deoxycholátem (XLD)** a volitelná půda např. **agar s brilantovou zelení a fenolovou červení (BR)**; obojí 37 °C, 24 – 48 h, aerobně
- *konfirmace:* biochemická konfirmace, serologická konfirmace a serotypizace
- ***XLD*** – kolonie pravidelné, malé až středně velké (1 – 3 mm), okrouhlé, téměř průsvitné a narůžovělé (*negativní laktosa*) s černým středem *(produkce sirovodíku)*, dochází ke změně barvy živného média – červenání *(alkalizace)*
- ***BR*** – kolonie pravidelné, malé až středně velké (1 – 3 mm), okrouhlé, bezbarvé či mléčně zakalené *(negativní laktosa)*, dochází ke změně barvy živného média – pivoňkově červená *(alkalizace)*

Praktický úkol:

- vzorek: mleté maso určené pro tepelnou úpravu
- neselektivní pomnožení: již připraveno
- selektivní pomnožení: pipetujeme 0,1 ml suspenze z PPV do zkumavky s 10 ml RVS, promícháme na vortexu, inkubace při 42 °C, 24 h, aerobně
- selektivní pomnožení: pipetujeme 1 ml suspenze z PPV do zkumavky s 10 ml MKTTn, promícháme na vortexu, inkubace při 37 °C, 24 h, aerobně

2. Průkaz *Listeria monocytogenes*

- čeleď *Listeriaceae*, grampozitivní, fakultativně anaerobní, krátké rovné nesporotvorné tyčinky, pohyblivé do 25 °C, rostou v bujonu s 10 % NaCl, jsou katalasa pozitivní, vytváří striktní úplnou hemolýzu, jsou psychrotrofní
- *primární pomnožení:* **poloviční bujon podle Frasera (½ FB)**; 30 °C, 24 h, aerobně
- *sekundární pomnožení:* **bujon podle Frasera (FB)**; 37 °C, 24 – 48 h, aerobně
- *izolace:* **agar pro listerie podle Ottavianiho a Agostiho (ALOA)** a volitelná půda např. **PALCAM agar (PAL)**; obojí 37 °C, 24 – 48 h, aerobně
- *konfirmace:* biochemická konfirmace, hemolýza, CAMP test
- ***ALOA*** – kolonie pravidelné, malé až středně velké (1,5 – 3 mm), okrouhlé, modrozelené barvy (*aktivita galaktosidasy*) obklopené širokou kruhovou neprůhlednou zónou precipitace *(aktivita fosfolipasy C)*
- ***PALCAM*** – kolonie pravidelné, drobné (1,2 – 2 mm), okrouhlé, šedozelené nebo olivové barvy často typicky s propadlým středem *(starší kolonie)*, kolonie jsou obklopeny hnědočernou až černou kruhovou zónou (*hydrolýza eskulinu*)

Praktický úkol:

- vzorek: tvarůžky (potravina podporující růst *L. monocytogenes*)
- primární pomnožení: již připraveno
- sekundární pomnožení: pipetujeme 0,1 ml suspenze z ½ FB do zkumavky s 10 ml FB, promícháme na vortexu, inkubace při 37 °C, 24 – 48 h, aerobně
- izolace z primárního pomnožení: sterilní skleněnou tyčinkou vyočkujeme suspenzi z ½ FB na ALOA a PALCAM agar (viz cvičení 1), inkubace při 37 °C, 24 – 48 h, aerobně

3. Stanovení počtu *Listeria monocytogenes*

- resuscitace v PPV nebo ½ FB, inkubace 20 °C, 1 h
- **agar pro listerie podle Ottavianiho a Agostiho (ALOA)**
- metoda: roztěr 1 ml (požadavek Nařízení 2073/2005)
- inkubace: 37 °C, 24 – 48 h, aerobně
- počítáme pravidelné, malé až středně velké okrouhlé kolonie modrozelené barvy obklopené širokou kruhovou neprůhlednou zónou precipitace

Praktický úkol:

- vzorek: trvanlivý salám (potravina nepodporující růst *L. monocytogenes*)
- použité ředění: 10^{-1}
- metoda: roztěr 1 ml rozdělením na 3 Petriho misky o průměru 90 mm (cca 0,33 ml na jednu Petriho misku)
- inkubace: 37 °C, 24 – 48 h, aerobně

4. Stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus*)

- čeleď *Staphylococcaceae*, grampozitivní, fakultativně anaerobní koky vyskytující se v hroznovitých shlucích, nepohyblivé, katalasa pozitivní, produkují zlatožlutý pigment, způsobují úplnou hemolýzu, koagulují králičí plazmu (volná a vázaná koagulasa), rostou v bujónu s 10 % NaCl a přežívají při nízké aktivitě vody v prostředí (a_w 0,86)
- **Baird-Parker agar (B-P)**
- metoda: roztěr 0,2 ml
- inkubace: 37 °C, 24 – 48 h, aerobně
- ***typické kolonie*** – kolonie černé nebo černošedé barvy *(redukce teluričitanu)*, lesklé a vypouklé, o průměru 1 – 1,5 mm, obklopené zónou projasnění *(aktivita lecitinasy)*, v zóně projasnění se může objevit opalescentní prstenec
- ***atypické kolonie*** – kolonie černé, lesklé, s úzkým bílým okrajem nebo bez něj, zóna projasnění a opalescentní prstenec chybí nebo jsou sotva viditelné, příp. šedé kolonie bez zóny projasnění
- konfirmace: plazmakoagulázový test (pozitivní)

Praktický úkol:

- vzorek: čerstvý sýr
- použitá ředění: 10^{-2} a 10^{-3}, pro každé ředění připravíme 1 Petriho misku
- metoda: roztěr 0,2 ml
- inkubace: 37 °C, 24 – 48 h, aerobně

5. Stanovení počtu presumptivních *Bacillus cereus*

- čeleď *Bacillaceae*, grampozitivní, pohyblivá, aerobní a fakultativně anaerobní, sporotvorná tyčinka, vyskytuje se jednotlivě, ve dvojicích nebo řetízcích, nefermentuje mannitol, způsobuje úplnou hemolýzu, vysoce odolné spory jsou eliptické a umístěné obvykle centrálně
- **Mannitol Yolk Polymyxine B agar (MYP)**
- metoda: obvykle roztěr 0,2 ml; v případě počátečního kojeneckého mléka roztěr 1 ml (požadavek Nařízení 2073/2005)
- inkubace: 30 °C, 24 – 48 h, aerobně
- počítáme kolonie velké (3 – 5 mm), ploché, suché, drsné s nepravidelnými okraji, růžové barvy *(negativní mannitol)*, obklopené širokou růžovou zónou precipitace *(aktivita lecitinasy),* změna barva média – růžová *(alkalizace)*

Praktický úkol:

- vzorek: sušené počáteční kojenecké mléko
- použitá ředění: 10^{-1}
- metoda: roztěr 1 ml rozdělením na 3 Petriho misky o průměru 90 mm (cca 0,33 ml na jednu Petriho misku)
- inkubace: 30 °C, 24 – 48 h, aerobně

Praktické cvičení 7

1. Průkaz bakterií rodu *Salmonella*

Praktický úkol:

- vzorek: mleté maso určené pro tepelnou úpravu
- izolace ze selektivního pomnožení: sterilní skleněnou tyčinkou vyočkujeme suspenzi z RVS na XLD a BR agar, inkubace při 37 °C, 24 – 48 h, aerobně
- izolace ze selektivního pomnožení: sterilní skleněnou tyčinkou vyočkujeme suspenzi z MKTTn na XLD a BR agar, inkubace při 37 °C, 24 – 48 h, aerobně

2. Průkaz *Listeria monocytogenes*

Praktický úkol:

- vzorek: tvarůžky (potravina podporující růst *L. monocytogenes*)
- izolace ze sekundárního pomnožení: sterilní skleněnou tyčinkou vyočkujeme suspenzi z FB na ALOA a PALCAM agar, inkubace při 37 °C, 24 – 48 h, aerobně

3. Průkaz bakterií rodu *Cronobacter*

- čeleď *Enterobacteriaceae*, gramnegativní, fakultativně anaerobní, nesporotvorné tyčinky, patří mezi koliformní bakterie, zkvašují glukosu a laktosu, typickým znakem je produkce žlutého pigmentu
- *neselektivní pomnožení:* **pufrovaná peptonová voda (PPV)**; 37 °C, 16 – 20 h, aerobně
- *selektivní pomnožení:* **modifikovaná laurylsulfát tryptózová půda s vankomycinem (mLST)**; 44 °C, 24 h, aerobně
- *izolace:* ***Enterobacter sakazakii*** **izolační agar (ESIA)**; 44 °C, 24 h, aerobně
- *konfirmace:* biochemická konfirmace, tvorba žlutého pigmentu
- ***ESIA*** – pravidelné malé až středně velké (1 – 3 mm) kolonie modrozelené barvy *(hydrolýza chromogenu, kterým je 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-α-D-glukopyranosid)*

Praktický úkol:

- vzorek: sušené počáteční kojenecké mléko
- neselektivní pomnožení: již připraveno
- selektivní pomnožení: již připraveno
- izolace ze selektivního pomnožení: sterilní bakteriologickou kličkou vyočkujeme suspenzi z mLST na ESIA agar, inkubace při 44 °C, 24 h, aerobně

4. Průkaz termotolerantních druhů rodu *Campylobacter*

- čeleď *Campylobacteraceae*, gramnegativní, mikroaerofilní (optimální složení atmosféry: 5 % O_2 + 10 % CO_2 + 85 % N), nesporotvorné, malé spirálkovitě zahnuté tyčinky (spirily) s charakteristickým vývrtkovitým pohybem, oxidasa pozitivní, indol negativní, redukují nitráty, ale nefermentují sacharidy; k termotolerantním druhům s optimální teplotou růstu 42 °C patří *C. jejuni, C. coli, C. upsaliensis* a *C. lari*
- *selektivní pomnožení:* **bujon podle Boltona s koňskou hemolyzovanou krví**; 37 °C, 4 – 6 h a poté 42 °C, 48 h, mikroaerofilně
- *izolace:* **modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem (mCCDA)** a volitelná půda např. **Karmali agar**; obojí 42 °C, 48 h, mikroaerofilně
- *konfirmace:* morfologie, pohyblivost, biochemická konfirmace, rezistence ke kyselině nalidixové a cephalotinu
- ***mCCDA*** – kolonie šedavě zbarvené, vlhké, ploché, středně velké (2 – 4 mm) často s kovovým leskem, příp. nazelenalým odstínem a s tendencí se rozrůstat
- ***Karmali*** – kolonie středně velké, šedé barvy, lesklé, ploché, s tendencí se rozrůstat

Praktický úkol:

- vzorek: drůbeží játra
- selektivní pomnožení: již připraveno
- izolace ze selektivního pomnožení: sterilní skleněnou tyčinkou vyočkujeme suspenzi z Bolton bujonu na mCCDA agar, inkubace při 42 °C, 48 h, mikroaerofilně (v anaerostatu s vyvíječem mikroaerofilní atmosféry)

5. Průkaz *Escherichia coli* O157

- kmeny serotypu O157 mají odlišné růstové a biochemické vlastnosti, špatně rostou při teplotách 44 – 45,5 °C, nemají enzym *ß*-D-glukuronidasu a nejsou schopny fermentovat D-sorbitol
- *selektivní pomnožení:* **modifikovaný bujon s enzymaticky natráveným kaseinem a sójou s přídavkem novobiocinu (mTSB)**; 41,5 °C, 18 – 24 h, aerobně
- *imunomagnetická separace:* koncentrace *Escherichia coli* O157 na imunomagnetických částicích
- *izolace:* **MacConkey agar s cefiximem, teluričitanem draselným a sorbitolem (CT-SMAC)** a volitelná půda např. **Sorbitol MacConkey agar s BCIG**; obojí 37 °C, 24 h, aerobně
- *konfirmace:* biochemická konfirmace, serotypizace
- ***CT-SMAC*** – kolonie pravidelné, malé (1 – 1,5 mm), okrouhlé, bezbarvé až světle žlutohnědé *(negativní sorbitol)*, někdy mohou být obklopeny oranžovou zónou
- ***BCIG*** – kolonie pravidelné, malé, okrouhlé, bezbarvé *(negativní sorbitol, negativní ß-D-glukuronidasa)*, okolo kolonií může docházet k odbarvení média

Praktický úkol:

- vzorek: syrové kravské mléko
- selektivní pomnožení: již připraveno
- imunomagnetická separace: pracovní postup je uveden v přiloženém návodu
- izolace po imunomagnetické separaci: sterilní bakteriologickou kličkou vyočkujeme suspenzi na BCIG agar, inkubace při 37 °C, 24 h, aerobně

6. Stanovení celkového počtu mikroorganismů ve svalovině čerstvé ryby

Praktický úkol:

- vzorek: čerstvá ryba
- použitá ředění: 10^{-3} a 10^{-4}, pro každé ředění připravíme 2 Petriho misky
- agar s glukosou, tryptonem a kvasničným extraktem (GTK)
- metoda: zalití 1 ml
- inkubace: 30 °C, 72 h, aerobně

Odběr vzorku svaloviny ryby

- nažhaveným opalovacím železem krátce opálíme povrch ryby v místě odběru vzorku svaloviny (ideálně blízko páteře kde je silnější vrstva svaloviny)
- sterilní skalpelem a pinzetou odstraníme opálenou kůži, **řez vedeme uvnitř opálené plochy nikoli vně**
- nástroje použité k odstranění kůže odložíme do desinfekčního roztoku
- novými sterilními nástroji provedeme odběr vzorku svaloviny (u nekuchaných ryb pozor na případnou kontaminaci z trávicího traktu)

Praktické cvičení 8

1. Stanovení účinnosti pasterace – pasterační efekt

- účinnost pasterace se stanoví na základě poměru počtu přežívajících mikroorganismů k jejich počtu před pasterací, optimální **pasterační efekt** je 99,99 %
- **D hodnota** označuje dobu potřebnou k tomu, aby aplikovaná konstantní teplota snížila četnost živých mikroorganismů obsažených v zahřívané potravině právě o 1 řád (tedy o 90 % nebo na 1/10), stanovuje se obvykle v minutách a vztahuje se vždy ke konkrétní teplotě, např. $D_{85} = 4\ min$ znamená, že ke snížení původního počtu mikroorganismů na 10 % dojde při teplotě 85 °C za 4 minuty

Výpočet pasteračního efektu

$$PE\ [\%] = 100 - \frac{\text{CPM syrové} - \text{CPM pasterované}}{\text{CPM syrové}}$$

Výpočet D hodnoty

$$D_{72}\ [\text{min}] = \frac{\text{t [min]}}{\log \text{CPM syrové} - \log \text{CPM pasterované}}$$

Praktický úkol:

CPM syrového mléka

- vzorek: syrové kravské mléko
- použitá ředění: 10^{-3} a 10^{-4}, pro každé ředění připravíme 1 Petriho misku
- GTK agar, zalití 1 ml, inkubace: 30 °C, 72 h, aerobně

Laboratorní pasterace vzorku

- do sterilní zkumavky napipetujeme 10 ml syrového mléka
- uzavřenou zkumavku vložíme do vytemperované vodní lázně a její obsah zahřejeme na teplotu **72 °C po dobu 30 sekund**
- současně zahříváme **kontrolní zkumavku s teploměrem** (kontrola průběhu záhřevu)
- po ukončení záhřevu zkumavku se vzorkem ihned prudce ochladíme

CPM pasterovaného mléka

- vzorek: laboratorně pasterované kravské mléko
- použitá ředění: 10^{0} a 10^{-1}, pro každé ředění připravíme 1 Petriho misku
- GTK agar, zalití 1 ml, inkubace: 30 °C, 72 h, aerobně

2. Stanovení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*

Praktický úkol:

- vzorek: laboratorně pasterované kravské mléko
- použitá ředění: 10^{0}, 2 Petriho misky
- agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi a glukosou (VČŽG)
- metoda: zalití 1 ml, opakované přelití
- inkubace: 37 °C, 24 h, aerobně

3. Stanovení koliformních bakterií

Praktický úkol:

- vzorek: ovocný jogurt
- použitá ředění: 10^{-1} a 10^{-2}, pro každé ředění připravíme 1 Petriho misku
- agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi a laktosou (VČŽL)
- metoda: zalití 1 ml, opakované přelití
- inkubace: 30 °C, 24 h, aerobně

4. Kvantitativní mikroskopické vyšetření čistých mlékařských kultur

- **mezofilní smetanová kultura** je tvořená koky *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lact. lactis* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* a *Leuc. mesenteroides* ssp. *dextranicum*; optimální teplota růstu je 22 – 25 °C po dobu 18 – 20 h, v mikroskopickém preparátu pozorujeme koky, diplokoky nebo krátké řetízky (optimální poměr laktokoků a leukonostoků je 9:1)
- **termofilní jogurtovou kulturu** tvoří *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*; optimální teplota pro činnost jogurtové kultury je 43 °C, k zakysání dochází za 3,5 – 4 h, v mikroskopickém preparátu pozorujeme koky, často v řetízcích, a dlouhé štíhlé tyčinky (optimální poměr koků a tyčinek je 2:1)

Praktický úkol:

<u>Příprava mikroskopického preparátu</u>

- vzorek: smetanový a jogurtový zákys
- kulturu důkladně protřepeme a obvyklým způsobem připravíme ředění 10^{-1}
- na spodní stranu podložního sklíčka namaluje podle šablony 2 čtverce o hraně 1 cm
- do každého čtverce pipetujeme 10 µl naředěného vzorku a bakteriologickou kličkou rovnoměrně rozetřeme po celé ploše čtverce
- necháme volně zaschnout a poté fixujeme 3x protažením v plameni
- fixovaný preparát barvíme Löflerovou methylenovou modří po dobu 3 – 5 minut
- preparát opláchneme destilovanou vodou, osušíme filtračním papírem přes hranu sklíčka a necháme volně zaschnout
- mikroorganismy pozorujeme ve světelném mikroskopu za použití imerzního oleje a imerzního objektivu (zvětšení 100×)

<u>Stanovení počtu buněk</u>

- v zorném poli počítáme počet buněk, v případě jogurtové kultury zvlášť koky a tyčinky
- mikrobiální shluky, dvojice nebo řetízky se pokládají za mikrobiální jedince
- celkem vyšetříme 5 zorných polí, posunujeme se meandrovitým pohybem
- spočítáme průměrný počet buněk v zorném poli, hodnotu dosadíme do vzorce

průměrný počet buněk × konstanta mikroskopu × stupeň ředění vzorku (10^{-1}, tj. 0,1)

- výsledek upravím obvyklým způsobem a vyjádříme jako počet buněk v 1 ml kultury
- u jogurtové kultury vyjádříme mimo celkového počtu buněk v 1 ml (pro výpočet sečteme počet koků a tyček v jednotlivých zorných polích) také poměr tyček a koků

Praktické cvičení 9

1. Mikrobiologické vyšetření pitné vody

Ukazatel	Limit	Metoda	Půda	Inkubace
enterokoky	0 KTJ/100 ml NMH	membránová filtrace 100 ml	S-B agar	37 °C, 48 h, aerobně
Escherichia coli	0 KTJ/100 ml NMH	membránová filtrace 100 ml	CCA agar	37 °C, 24 h, aerobně
koliformní bakterie	0 KTJ/100 ml MH	membránová filtrace 100 ml	CCA agar	37 °C, 24 h, aerobně
počet kolonií při 22 °C	200 KTJ/1 ml MH	zalití 1 ml	GK agar	22 °C, 72 h, aerobně
počet kolonií při 36 °C	40 KTJ/ml MH	zalití 1 ml	GK agar	36 °C, 48 h, aerobně

NMH – nejvyšší mezná hodnota, MH – mezná hodnota; Slanetz-Bartley agar (S-B), Chromogenic Coliform Agar (CCA), agar s kvasničným extraktem (GK)

- na rozdíl od **úplného rozboru** pitné vody používané v potravinářském zařízení, pitné vody dodávané z rozvodné sítě a pitné vody dodávané ze studní, se při **kráceném rozboru** nestanovují enterokoky
- v případě pitných vod upravovaných přímo z **vod povrchových** nebo u podzemních vod ovlivněných povrchovými vodami se stanovuje *Clostridium perfringens*
- vyhláška stanovuje další mikrobiologické ukazatele (např. *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus,* atypická mykobakteria, legionely) s hygienickými limity pro balenou pitnou vodu, vodu dodávanou pro náhradní zásobování a teplou vodu

- používáme sterilní membránové filtry o velikosti pórů 0,45 µm, při filtraci se mikroorganismy zachycují a koncentrují na horní straně membránového filtru (mřížka)
- na Petriho misku s živnou půdou pokládáme filtr stejně, jako byl umístěn v aparatuře, tj. stranou se zachycenými mikroorganismy vzhůru

- stanovení koliformních bakterií a *Escherichia coli* probíhá současně v rámci jedné Petriho misky, typické kolonie koliformních bakterií jsou růžovočervené, *Escherichia coli* roste v modrofialových koloniích, konfirmace je založena na průkazu oxidasy (negativní)
- **počet *E. coli*** = počet pozitivně konfirmovaných modrofialových kolonií
- **počet koliformních bakterií** = počet pozitivně konfirmovaných růžovočervených i modrofialových kolonií

Praktický úkol:

- úplný rozbor vzorku pitné vody

2. Mikrobiologické vyšetření obalů a obalových materiálů

- nejčastěji používanou metodou je **stěr**, který lze použít u různých druhů obalových materiálů, pro lepší smáčitelnost obalu se k ředícímu médiu přidává detergentní přípravek např. Tween 80; výsledek je vyjádřen v KTJ/*x* cm^2
- další možností je **otisková metoda**; výsledek je vyjádřen v KTJ/*x* cm^2
- u skleněných obalů či plastových lahví a sáčků, dále přepravních obalů a nádob se provádí metoda **výplachu**; výsledek je vyjádřen v KTJ/*x* ml výplachového média
- u fólií či jedlých střev lze použít metodu **oplachu**, kdy je vzorek intenzivně protřepáván v ředícím médiu s přídavkem detergentu (poměr 1:10); výsledek je vyjádřen v KTJ/g
- k mikrobiologickému vyšetření silných papírů, zejména kartonů a lepenek je vhodné použít **dezintegrační metodu**, kdy po navážení přidáme k vzorku ředící médium a vzorek homogenizujeme; výsledek je vyjádřen v KTJ/g
- při vyšetření papírových obalů, různých fólií či jedlých střev lze využít **metodu přelivu**, kdy obal odvážíme, nastříháme na malé kousky (cca 1×1 cm), položíme na dno sterilní Petriho misky a přelijeme živným médiem, příp. kousky obalu klademe na živné médium v Petriho misce a následně zalijeme tenkou vrstvou téže půdy; po ukončení kultivace počítáme kolonie vyrostlé na vnější i vnitřní ploše obalu; výsledek je vyjádřen v KTJ/g

Praktický úkol:

Metoda stěru – kelímek, CPM

- do sterilní zkumavky pipetujeme 10 ml sterilního fyziologického roztoku, přidáme kapku Tweenu 80
- sterilní tampon namočíme do roztoku a přitisknutím ke stěně zkumavky odstraníme přebytečnou tekutinu, navlhčeným tamponem stíráme celou vnitřní plochu kelímku, tamponem postupně otáčíme
- tampon vložíme zpět do zkumavky, horní část špejle odlomíme o hrdlo zkumavky
- uzavřenou zkumavku intenzivně protřepeme na vortexu až dojde k uvolnění vláken (10^{-1})
- použité ředění: 10^{-1}, 2 Petriho misky
- GTK agar, zalití 1 ml, inkubace: 30 °C, 72 h, aerobně

Metoda výplachu – láhev, CPM

- do vyšetřované lahve pipetujeme 10 ml sterilního fyziologického roztoku, přidáme kapku Tweenu 80
- láhev uzavřeme a krouživým pohybem postupně smočíme celou vnitřní plochu, necháme asi minutu odstát a poté celý postup několikrát zopakujeme (celková doba cca 10 minut)
- po ukončení výplachu roztok slijeme do sterilní nádoby či zkumavky (10^{-1})
- použité ředění: 10^{-1}, 2 Petriho misky
- GTK agar, zalití 1 ml, inkubace: 30 °C, 72 h, aerobně

Metoda dezintegrační – proložka na vejce, CPM

- do homogenizačního sáčku nastříháme 10 g obalu, přidáme 90 ml sterilního fyziologického roztoku a homogenizujeme 1,5 minuty na stomacheru (10^{-1})
- použité ředění: 10^{-1}, 2 Petriho misky
- GTK agar, zalití 1 ml, inkubace: 30 °C, 72 h, aerobně

3. Hodnocení mikrobiální čistoty prostředí laboratoře

- **kvantitativní stěr** provádíme z přesně definované plochy ohraničené sterilní šablonou (obvykle 10×10 cm, tj. 100 cm^2), dalšími pomůckami jsou zkumavka s 10 ml ředícího roztoku a sterilní tampon
- princip **otiskové metody** spočívá v přenesení mikroorganismů z vyšetřovaného povrchu lehkým přitlačením přímo na povrch živného média, optimální doba kontaktu živného média s vyšetřovaným povrchem je 10 sekund; využíváme speciální nosiče z živným médiem, např. kontaktní Petriho misky, Petrifilm™ či otiskové nosiče typu Hygicult®
- při provozní kontrole čistoty ovzduší se běžně používá metoda **spadu** (pasivní přenesení mikroorganismů v ovzduší spadem na povrch živného média v Petriho misce); vyhovující mikrobiální čistota ovzduší = ***maximálně 10 KTJ/10 minut expozice***, tj. 1 KTJ za 1 minutu
- pro hodnocení úrovně kontaminace rukou pracovníků (např. v gastronomii) lze využít metodu **oplachu**, stanovení může být provedeno kvalitativně i kvantitativně; stanovený počet KTJ v 1 ml výplachové tekutiny, přepočítáme na celkový objem média použitého k oplachu, tj. na 25 ml, a získáme počet KTJ na plochu testované ruky

Praktický úkol:

Metoda stěru – hodnocení účinnosti dezinfekce, CPM

- zvolenou část pracovní plochy vydezinfikujeme 70% ethanolem a necháme uschnout
- do sterilní zkumavky pipetujeme 10 ml sterilního fyziologického roztoku
- sterilní tampon namočíme do roztoku a přitisknutím ke stěně zkumavky odstraníme přebytečnou tekutinu
- na vydezinfikovanou plochu umístíme sterilní šablonu, vlhkým tamponem stíráme v několika směrech celou vytčenou plochu, tamponem postupně otáčíme
- tampon vložíme zpět do zkumavky, horní část špejle odlomíme o hrdlo zkumavky
- uzavřenou zkumavku intenzivně protřepeme na vortexu až dojde k uvolnění jednotlivých vláken tamponu (10^{-1})
- použité ředění: 10^{-1}, 2 Petriho misky
- GTK agar, zalití 1 ml, inkubace: 30 °C, 72 h, aerobně

Metoda otisku – Petrifilm™, CPM

- po odklopení krycí folie pipetujeme do středu Petrifilmu 1 ml sterilního fyziologického roztoku, krycí folii vrátíme zpět a roztlačovátkem rozprostřeme fyziologický roztok do plochy 20 cm^2 (plocha roztlačovátka)
- Petrifilm necháme rehydratovat 30 minut při laboratorní teplotě
- poté odklopíme krycí folii a vnitřní stranou ji lehce přitlačíme po dobu 10 sekund na vyšetřované místo
- Petrifilm opět zavřeme a umístíme do termostatu, inkubace: 30 °C, 48 h, aerobně

Metoda otisku – Hygicult®, CPM

- Hygicult vyjmeme ze zkumavky, živnou půdu lehce přitlačíme po dobu 10 sekund na vyšetřovanou plochu, poté Hygicult otočíme o 180° a druhou vrstvu živné půdy otiskneme na dalším místě
- Hygicult zasuneme zpět do zkumavky a inkubujeme při 30 °C, 48 h, aerobně

Metoda spadu – CPM

- otevřenou Petriho misku s GTK agarem umístíme na klidném bezprašném místě a necháme exponovat po dobu 10 minut
- po ukončení expozice misku uzavřeme a inkubujeme při 30 °C po dobu 72 h, aerobně
- následně spočítáme všechny kolonie narostlé na ploše Petriho misky

Oplach ruky – počet koagulázopozitivních stafylokoků

- sterilní jednorázovou rukavici bez pudru odpovídající velikosti navlečeme na ruku a dovnitř rukavice asepticky přidáme 25 ml sterilního tekutého média, např. pufrované peptonové vody
- po dobu 1 minuty důkladně ruku oplachujeme, a to včetně nehtů a prostoru pod nehty, poté rukavici opatrně sejmeme, vyšetřujeme oplachovou tekutinu
- použité ředění: 10^0, 1 Petriho miska
- Baird-Parker agar (B-P), roztěr 0,2 ml, inkubace: 37 °C, 24 – 48 h, aerobně

Praktické cvičení 10

Praktický úkol:

Metoda stěru vlhkým a suchým tamponem – jatečně upravená drůbež, CPM

- do sterilní zkumavky pipetujeme 10 ml sterilního fyziologického roztoku
- sterilní tampon namočíme do roztoku a přitisknutím ke stěně zkumavky odstraníme přebytečnou tekutinu
- na vyšetřovanou plochu umístíme sterilní šablonu (5×5 cm, tj. 25 cm^2), vlhkým tamponem stíráme v několika směrech celou vytčenou plochu, tamponem postupně otáčíme, tampon vložíme zpět do zkumavky a horní část špejle odlomíme o hrdlo zkumavky
- vezmeme suchý sterilní tampon a opět stíráme celou vyšetřovanou plochu, tampon vložíme do zkumavky a horní část špejle odlomíme o hrdlo zkumavky
- uzavřenou zkumavku intenzivně protřepeme na vortexu až dojde k uvolnění jednotlivých vláken tamponu (10^{-1})
- použitá ředění: 10^{-2} a 10^{-3}, pro každé ředění připravíme 2 Petriho misky
- GTK agar, zalití 1 ml, inkubace: 30 °C, 72 h, aerobně

Metoda stěru abrazivní houbičkou – jatečně upravená drůbež, CPM

- nasadíme si sterilní jednorázové rukavice, sterilní abrazivní houbičku vyjmeme z obalu
- na vyšetřovanou plochu umístíme sterilní šablonu (5×5 cm, tj. 25 cm^2), vlhkou houbičkou stíráme celou vytčenou plochu (10 tahů)
- houbičku vložíme zpět do sáčku a odlomíme držátko
- do sáčku přidáme 90 ml sterilního fyziologického roztoku a homogenizujeme 1,5 minuty na stomacheru (10^{-1})
- použitá ředění: 10^{-2} a 10^{-3}, pro každé ředění připravíme 2 Petriho misky
- GTK agar, zalití 1 ml, inkubace: 30 °C, 72 h, aerobně

Destruktivní metoda – jatečně upravená drůbež, CPM

- na váhy umístíme sterilní homogenizační sáček a vytárujeme
- sterilním skalpelem seřízneme plátek kůže o ploše cca 5 cm^2 a tloušťce 5 mm, plátek vložíme do homogenizačního sáčku a zvážíme
- do sáčku přidáme devítinásobné množství sterilního fyziologického roztoku a homogenizujeme 1,5 minuty na stomacheru (10^{-1})
- použitá ředění: 10^{-2} a 10^{-3}, pro každé ředění připravíme 2 Petriho misky
- GTK agar, zalití 1 ml, inkubace: 30 °C, 72 h, aerobně

Stanovení počtu *Escherichia coli*

- vzorek: strojně oddělené drůbeží maso
- použitá ředění: 10^{-1} a 10^{-2}, pro každé ředění připravíme 1 Petriho misku
- metoda: roztěr 0,2 ml
- inkubace: 44 °C, 18 – 24 h, aerobně

Stanovení počtu *Bacillus cereus*

- vzorek: sušené těstoviny
- zpracování vzorku: metoda oplachu
- použitá ředění: 10^{-1} a 10^{-2}, pro každé ředění připravíme 1 Petriho misku
- metoda: roztěr 0,2 ml
- inkubace: 30 °C, 24 – 48 h, aerobně

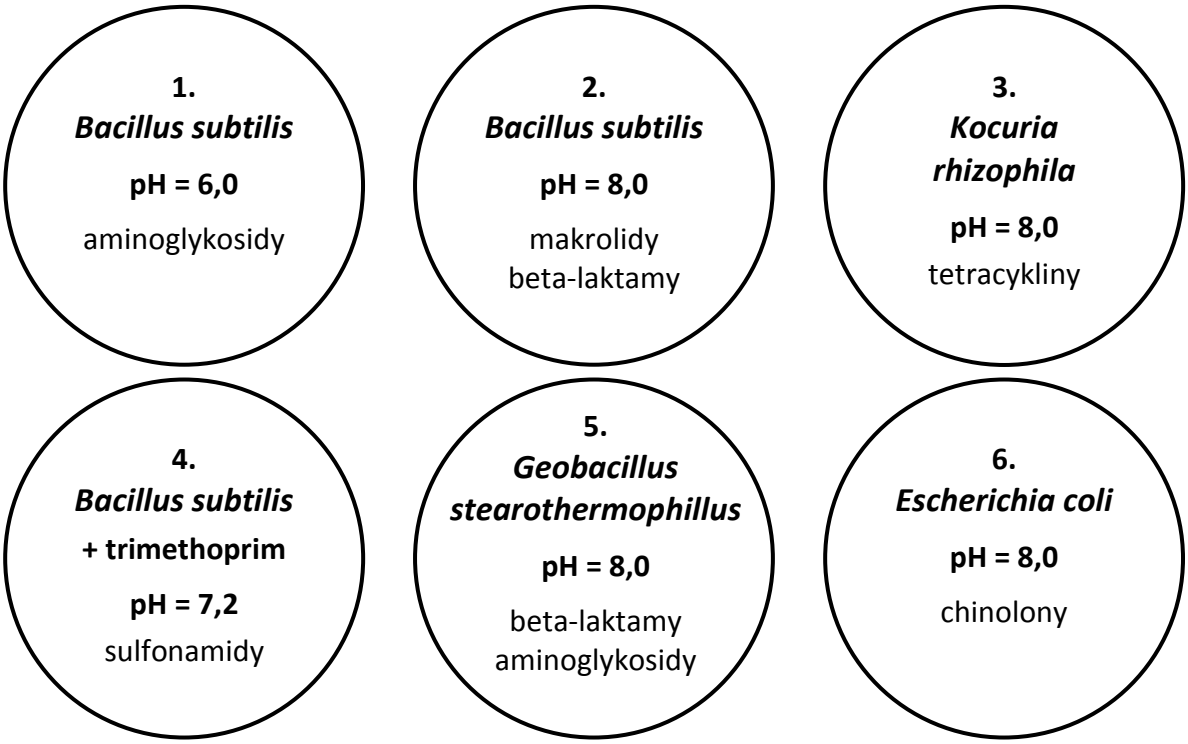
Metoda oplachu

- vzorek navážíme do sterilní Erlenmayerovy baňky a zalijeme **desetinásobným** množstvím sterilního ředícího roztoku (**10 g vzorku + 100 ml fyziologického roztoku**)
- třepeme na třepačce při cca 300 rpm po dobu 20 minut (dle povahy vzorku)
- připravenou výchozí suspenzi (10^{-1}) můžeme dále obvyklým způsobem ředit

Praktické cvičení 11

1. Stanovení reziduí inhibičních látek – plotnové metody

- stanovení RIL je dáno ***Metodickým pokynem na stanovení reziduí inhibičních látek ve tkáních, mléce, vejcích a potravinách ze dne 1. 6. 2008***
- plotnové metody pracují na principu **agarového difúzního testu**, kdy se vzorky umístí na Petriho misku obsahující agarovou půdu inokulovanou testovacím kmenem
- difúze antimikrobiální látky se projeví tvorbou **zóny inhibice růstu** testovacího kmene okolo vyšetřovaného vzorku



Plotna	Mikroorganismus	Inkubace	Pozitivní kontrola
1.	*Bacillus subtilis* (pH 8)	30 °C, 24 h	penicilin
2.	*Bacillus subtilis* (pH 6)	30 °C, 24 h	streptomycin
3.	*Kocuria rhizophila*	37 °C, 24 h	streptomycin
4.	*Bacillus subtilis* (pH 7,2)	30 °C, 24 h	sulfonamid
5.	*Geobacillus stearothermophilus*	64 °C, 5 h	penicilin
6.	*Escherichia coli*	37 °C, 24 h	ciprofloxacin

Vyhodnocení:		plotna 1	plotna 2	plotna 3	plotna 4	plotna 5	plotna 6
syrové mléko	pozitivní	≥ 2 mm	≥ 2 mm	≥ 2 mm	≥ 2 mm	≥ 1 mm	≥ 2 mm
	negativní	< 2 mm	< 2 mm	< 2 mm	< 2 mm	< 1 mm	< 2 mm
tkáně, orgány	pozitivní	≥ 2 mm	≥ 2 mm	≥ 2 mm	≥ 2 mm	≥ 4 mm	≥ 2 mm
	negativní	< 2 mm	< 2 mm	< 2 mm	< 2 mm	< 4 mm	< 2 mm

Praktický úkol:

- vzorky: syrové kravské mléko, *vzorek A* (klinika VFU Brno), *vzorek B* (ŠZP Nové Dvory)
- stanovení RIL na plotnách 1 a 4 – 6
- *vzorek mléka:* sterilní disk o průměru 12,7 mm uchopíme do sterilní pinzety → zčásti ponoříme do vzorku mléka → necháme zcela nasáknout → otřeme o hranu vzorkovnice a umístíme na Petriho misku; každý vzorek testujeme dvojmo a umístíme úhlopříčně
- *pozitivní kontrola:* sterilní disk o průměru 6 mm (9 mm pro plotnu 6) uchopíme do sterilní pinzety a umístíme do středu Petriho misky → na disk pipetujeme 10 µl (30 µl u plotny 6) roztoku antibiotika
- inkubace: podle typu plotny (viz tabulka), plotnu 5 uzavřeme s filtračním papírem a uložíme do plastového sáčku