

Overenie vhodnosti použitia novovyvinutých sušených živných pôd na stanovenie mikroorganizmov

BERNADETTA HOZOVÁ – IVAN ŠIMEK

Súhrn. Cieľom práce bolo overiť vhodnosť použitia novovyvinutých sušených živných pôd (výrobca IMUNA, n. p., Šarišské Michaľany) na kvantitatívne stanovenie mikroorganizmov podľa nových Čs. štátnych noriem s definitívnou platnosťou od 1. 1. 1990. Porovnávali sa: agar GTK (glukóza-tryptón-kvasničný extrakt) oproti doteraz používanému Živnému agaru č. 2 (Ža) (celkový počet mikroorganizmov, aeróbne spórotvorné mikroorganizmy) a agar GKCH (glukóza-kvasničný extrakt-chloramfenikol) oproti dosiaľ platnému Sladinovému agaru (SA) alebo Agar so sladinovým extraktom (SAe) (kvasinky a plesne) prostredníctvom 5 druhov potravinového materiálu (surové hovädzie mäso, vlašský šalát, hydinová paštéta, mrkva a čierne korenie). Výsledky sa štatisticky vyhodnotili (F - a t -testy) na počítači ATARI 800 XL.

S účinnosťou od 1. 7. 1984 postupne až do roku 1990 nadobúdajú platnosť nové československé normy (ČSN 56 0080 až 56 0099) na kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie mikroorganizmov, zahŕňajúce okrem metodiky, spôsobu vzorkovania, kultivácie mikroorganizmov a spracovania výsledkov aj nové hygienické smernice na mikrobiologické hodnotenie požívatín. Vypracovala ich stála komisia RVHP pre potravinársky priemysel s cieľom zjednotiť ich s medzinárodnými štandardizovanými metódami (ISO metódy). Sú náhradou za doteraz používané ČSN 56 0100 [1] z roku 1968. V súvislosti so zavedením zmien a doplnkov až do zabezpečenia nových arbitrážnych pôd vyrábaných IMUNOU, n. p., Šarišské Michaľany platia ešte do konca roka 1989 prechodné ustanovenia, dovoľujúce používať doteraz vyrábané živné pôdy. Výroba nových živných pôd je už naplno zavedená a do začiatku roka 1990 úplne pokryje objednávky mikrobiologických pracovísk. Pre naše výskumné laboratórium sa nám podarilo prednostne získať dve šarže nového živného média

RNDr. Bernadetta Hozová, Katedra chémie a technológie sacharidov a potravín, Chemic-kotechnologická fakulta SVŠT, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Doc. Ing. Ivan Šimek, CSC. Katedra chemickej technológie plastických látok a vlákien, Chemic-kotechnologická fakulta SVŠT, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

na stanovenie celkového počtu mezofilných mikroorganizmov a aeróbných spórotvorných mikroorganizmov – tzv. agar GTK s glukózou, tryptónom a kvasničným extraktom, na porovnanie s doteraz používaným Živným agarom č. 2 a jednu šaržu živnej pôdy s prídavkom antibiotika chloramfenikolu – tzv. agar GKCH na kvantitatívne stanovenie kvasiniek a plesní namiesto doteraz používaného Sladinového agaru alebo Agar so sladínovým extraktom. V sérii modelových pokusov sme sledovali a porovnávali rozdiely v reprodukovateľnosti a záchytnosti jednotlivých pôd, založených na rozdielnom selektívnom princípe pri kvantitatívnom stanovení celkového počtu mikroorganizmov, aeróbných spórotvorných mikroorganizmov, kvasiniek a plesní v 5 druhoch potravinového materiálu: hovädzie surové mäso, vlašský šalát, hydínová paštéta, surová mrkva a čierne korenie. Výsledky stanovenia aktuálneho počtu uvedených skupín mikroorganizmov, vyrastených z príslušných decimálnych riedení, sme štatisticky spracovali metódou Studentovho *t*-testu [2] podľa programu v jazyku Basic na osobnom počítači ATARI 800 XL (v spolupráci s Katedrou chemickej technológie plastických látok a vlákien).

Materiál a metodika

Stanovenie celkového počtu mikroorganizmov (ďalej CPM) a aeróbných spórotvorných mikroorganizmov. Na overenie vhodnosti použitia novovyvinutých sušených pôd na stanovenie CPM a aeróbných spórotvorných mikroorganizmov sme použili agar GTK v zložení:

tryptón alebo enzýmový kazeínový hydrolyzát	5,0 g
kvasničný extrakt	2,5 g
glukóza	1,0 g
agar	15,00 g

na 1000 cm³ destilovanej vody

a Živný agar č. 2 (ŽA) používaný ako 4 % vodný roztok. Zloženie:

mäsový výťažok	10,0 g
peptón pre bakteriológiu	10,0 g
chlorid sodný	5,0 g
agar	15,0 g

na 1000 cm³ destilovanej vody

Obidve porovnávacie pôdy po 2-3 h napučaní sme nechali rozvariť v prúdiacej pare, pH sme upravili na $7,1 \pm 0,1$ a sterilizovali sme 15 min pri 121 ± 1 °C. Použili sme metódu inokulácie zalieváním podľa ČSN 56 0083 [3] a ČSN

56 0082 [4], pričom sme očkovali 1 cm³ príslušného riedenia návažku vzorky [5].

Podstata metódy. Stanovené množstvo vzorky alebo jej riedenia sa zalieva agarovou živnou pôdou do vrstvy 4-5 mm v Petriho miskách. Inokulované pôdy sa inkubujú v prevrátenej polohe pri teplote 30 ± 1 °C počas 72 ± 3 h. Spočítajú sa všetky vyrastené kolónie (30-300) a vypočíta sa množstvo mikroorganizmov v 1 g alebo 1 cm³ vzorky.

Poznámka. Stanoveniu spórotvorných mikroorganizmov predchádza inaktivácia vegetatívnych foriem pôsobením 15 min pri 70 ± 5 °C (1) z najnižšieho predpokladaného riedenia.

Príprava riedení (podľa ČSN 56 0081) [5]. Pri príprave východiskových – prvých riedení sem sa riadili pomerom 1 + 9 (1 diel vzorky – 10 g + 9 dielov – 90 ml fyziologického roztoku).

Stanovenie kvasiniek a plesní. Použili sme hotový Sladinový agar (SA) v bankách, ktoré sme sterilizovali 5 min pri 115 ± 1 °C, alebo Agar so sladimým extraktom (SAe) v zložení:

pivovarská sladina sušená	35,0 g
peptón pre bakteriológiu	5,0 g
agar	13,0 g

na 1000 cm³ destilovanej vody

Sterilizuje sa 15 min pri 115 ± 1 °C. pH po sterilizácii je $3,5 \pm 0,1$ pri 25 °C.

Pôdy sme porovnávali s novovyvinutým agarom GKCH v zložení:

kvasničný extrakt	5,0 g
agar	20,0 g
glukóza	20,0 g
chloramfenikol	25,0 g

na 1000 cm³ destilovanej vody

Sterilizuje sa 15 min pri 121 ± 1 °C. pH po sterilizácii je $6,5 \pm 0,1$ pri 25 °C [6].

Podstata metódy. Stanovené množstvo vzorky alebo jej riedenia sa zalieva selektívnou agarovou pôdou v Petriho miskách. Inokulované pôdy sa inkubujú pri teplote 24 ± 1 °C počas 5 dní. Spočítajú sa všetky kolónie kvasiniek a plesní a prepočítajú sa na 1 g alebo 1 cm³ vzorky (na výpočet sa použijú tie riedenia, kde vyrástlo 15 až 150 kolónií kvasiniek a 5 až 50 kolónií plesní).

Na kvantitatívne stanovenie vymenovaných skupín mikroorganizmov sme si zvolili 5 druhov potravinového materiálu používaného ako základné suroviny v potravinárskom priemysle, alebo hotové výrobky získané z obchodnej siete. Boli to: 1. surové hovädzie mäso, 2. vlašský šalát, 3. hydinová paštéta, 4. surová mrkva, 5. čierne korenie.

Vhodné decimálne riedenie sme očkovali v 9 paralelných stanoveniach (CPM vo vlašskom šaláte iba v 6 paralelných analýzach) pre každý druh po-

traviny a každý testovaný typ živnej pôdy. Výsledky sa štatisticky spracovali, ako už bolo uvedené, podľa programu v jazyku Basic na osobnom počítači ATARI 800 XL.

Výsledky a diskusia

Výsledky výskytu jednotlivých sledovaných skupín mikroorganizmov v 5 zvolených druhoch potravinového materiálu sú v tabuľkách 1-5 spolu s príslušnými výpočtami štatistických meraní (s , F , t) [2]. Ako základné porovnávanie hľadisko sme uvažovali rozdielnosť živných pôd:

1. v reprodukovateľnosti metód,
 2. v záchytnosti mikroorganizmov
- (ŽA: GTK pre CPM a spóry aeróbných mikroorganizmov; SA (SAe): GKCH pre kvasinky a plesne).

Reprodukovateľnosť

Z výpočtov F -testov v tabuľkách 1-5 vyplýva:

CPM. Presnosť metódy na agare GTK závisí od druhu materiálu, resp. počtu mikroorganizmov. Napr. pre vlašský šalát, hydinovú paštétu a surovú mrkvu je presnosť metódy rovnaká ako pri použití ŽA; v surovom hovädzom mäse, ako vidieť z výpočtov v tabuľke 1, je stanovenie na agare GTK významne nepresnejšie, ale pri čiernom korení, naopak, presnejšie.

Aeróbne spórotvorné mikroorganizmy. Významnosť rozdielu v presnosti sa prejavila len v hovädzom mäse (tab. 1) a v hydinovej paštéte (tab. 3). V tejto vzorke bola presnosť stanovenia na agare GTK lepšia – rozptyl hodnôt bol menší (por. 10^1), naproti tomu v hovädzom mäse bol rozptyl hodnôt väčší (por. 10^3). V ostatných sledovaných vzorkách (tab. 2, 4, 5) bola presnosť stanovenia na pôde GTK rovnaká ako na ŽA.

Kvasinky. Presnosť stanovenia na agare GKCH bola významne lepšia v hovädzom mäse (por. $10^1 - 10^2$ – tabl. 1), vo vlašskom šaláte (tab. 2) bola rovnaká ako na SA. V hydinovej paštéte (tab. 3) sa kvasinky ani plesne nevyskytli na obidvoch porovnávacích pôdach, takže reprodukovateľnosť metód bola v zhode. V surovej mrkve (tab. 4) bola reprodukovateľnosť vyššia na SAe a v čiernom korení (tab. 5) bola na obidvoch sledovaných pôdach rovnaká.

Plesne. Presnosť stanovenia na agare GKCH v hovädzom mäse (tab. 1), ako aj vo vlašskom šaláte (tab. 2), bola rovnaká ako na SA; významne horšia, ako ukazujú výpočty v tabuľke 5, bola v čiernom korení, ale na SA bol počet mikroorganizmov nepreukazný (ojedinelý). Reprodukovateľnosť bola v zhode na obidvoch pôdach vo vzorke mrkvy (tab. 4) a v hydinovej paštéte (tab. 3).

Tabuľka 1. Štatistické vyhodnotenie (reprodukovateľnosť) rozdielnych živných pôd (surové hovädzie mäso)

Table 1. Statistical evaluation (reproducibility) of various culture mediums^a (raw beef meat)

Mikro- organizmus ¹							t_{exp}	sign. 5 %	
	E	\bar{x}_1	s_1	\bar{x}_2	s_2	F_{exp}		F	t
A CPM ²	10 ³	4,69	0,36	15,61	0,87	5,728	34,885	+	+
B Aer. sp. ³	10 ¹	1,56	0,88	1,44	1,67	3,571	0,176	+	-
C Kvasinky ⁴	10 ²	2,21	0,26	0,68	0,13	3,901	15,961	+	+
D Plesne ⁵	10 ¹	8,78	0,97	4,67	1,66	2,911	6,416	-	+

^aŽA: GTK = A, B; SAe: GKCH = C, D.

ŽA – živný agar č. 2; Culture agar No. 2. GTK – agar s glukózou, tryptónom a kvasničným extraktom; Agar with glucose, thryptone and yeast extract. SA – sladinový agar; Malt agar: SAe – agar so sladinovým extraktom; Agar with Malt extract. GKCH – agar s glukózou, kvasničným extraktom a s prídavkom chloramfenikolu; Agar with glucose, yeast extract and with chloramphenicol addition.

E – koeficient decimálneho riedenia vzorky; Coefficient of decimal sample dilution. \bar{x}_1 – aritmetický priemer počtu mikroorganizmov ($n = 9$) (ŽA, SA); Arithmetic average of microorganisms number ($n = 9$) (ŽA, SA). s_1, s_2 – smerodajná odchýlka; Standard deviation. \bar{x}_2 – aritmetický priemer počtu mikroorganizmov ($n = 9$) (GTK, GKCH); Arithmetic average of microorganisms number ($n = 9$) (GTK, GKCH). F_{exp} – F -test (reprodukovateľnosť) [2]; F -Test (reproducibility) [2]. t_{exp} – t -test (testovanie rozdielu medzi výberovými priermi) [2]; t -Test (testing the difference between selection means) [2].

¹Microorganism; ²Total number of microorganisms; ³Aerobic spore-forming microorganisms;

⁴Yeasts; ⁵Fungi.

Tabuľka 2. Štatistické vyhodnotenie (reprodukovateľnosť) rozdielnych živných pôd^a (vlašský šalát)

Table 2. Statistical evaluation (reproducibility) of various culture mediums) a meat-vegetable salad)

Mikro- organizmus ¹							t_{exp}	sign. 5 %	
	E	\bar{x}_1	s_1	\bar{x}_2	s_2	F_{exp}		F	t
A CPM ²	10 ⁶	3,75	0,52	4,35	0,71	1,885	1,661	-	-
B Aer. sp. ³	10 ³	1,09	0,12	2,67	0,14	1,278	25,970	-	+
C Kvasinky ⁴	10 ³	5,92	0,19	3,00	0,16	1,393	35,774	-	+
D Plesne ⁵	10 ¹	1,56	0,73	0,89	0,78	1,157	1,875	-	-

For explanations see Table 1.

Tabuľka 3. Štatistické vyhodnotenie (reprodukovateľnosť) rozdielnych živných pôd^a (hydínová paštéta)

Table 3. Statistical evaluation (reproducibility) of various culture mediums^a (poultry paste)

Mikro-organismus ¹	<i>E</i>	\bar{x}_1	<i>s</i> ₁	\bar{x}_2	<i>s</i> ₂	<i>F</i> _{exp}	<i>t</i> _{exp}	sign. 5 % <i>F</i> <i>t</i>	
A CPM ²	10 ¹	2,33	2,40	1,44	1,94	1,522	0,863	–	–
B Aer. sp. ³	10 ¹	3,22	2,49	0,89	1,05	5,575	2,589	+	+
C Kvasinky ⁴	negatívny nález na obidvoch pôdach ⁶								
D Plesne ⁵	negatívny nález na obidvoch pôdach ⁶								

For explanations 1-5 see Table 1; ⁶Negative finding on both mediums.

Tabuľka 4. Štatistické vyhodnotenie (reprodukovateľnosť) rozdielnych živných pôd^a (surová mrkva)

Table 4. Statistical evaluation (reproducibility) of various culture mediums^a (raw carrot)

Mikro-organismus ¹	<i>E</i>	\bar{x}_1	<i>s</i> ₁	\bar{x}_2	<i>s</i> ₂	<i>F</i> _{exp}	<i>t</i> _{exp}	sign. 5 % <i>F</i> <i>t</i>	
A CPM ²	10 ⁴	6,27	0,28	10,40	0,25	1,204	32,720	–	+
B Aer. sp. ²	10 ²	2,86	0,22	3,07	0,29	1,779	1,738	–	–
C Kvasinky ³	10 ³	2,10	0,17	43,00	2,00	133,333	61,121	+	+
D Plesne ⁴	10 ⁴	2,36	0,28	5,28	0,24	1,350	23,453	–	+

For explanations see Table 1.

Tabuľka 5. Štatistické vyhodnotenie (reprodukovateľnosť) rozdielnych živných pôd^a (čierne korenie)

Table 5. Statistical evaluation (reproducibility) of various culture mediums^a (black pepper)

Mikro-organismus ¹	<i>E</i>	\bar{x}_1	<i>s</i> ₁	\bar{x}_2	<i>s</i> ₂	<i>F</i> _{exp}	<i>t</i> _{exp}	sign. 5 % <i>F</i> <i>t</i>	
A CPM ²	10 ⁶	2,78	0,41	3,63	0,18	5,059	5,783	+	+
B Aer. sp. ⁶	10 ¹	1,50	0,03	1,89	0,04	2,075	21,337	–	+
C Kvasinky ⁴	negatívny nález na obidvoch pôdach ⁶								
Plesne ⁵	10 ¹	0,22	0,44	11,11	2,15	23,714	14,901	+	+

For explanations see Table 3.

Tabuľka 6. Záchytnosť jednotlivých skupín mikroorganizmov na rozdielnych živných pôdach
Table 6. Plating efficiency of individual groups of microorganisms in various culture mediums

Mikroorganizmus ¹	Záchytnosť ² [%]				
	hovädzie mäso ³	vlašský šalát ⁴	hydínová paštéta ⁵	surová mrkva ⁶	čierne korenie ⁷
CPM ^{a8}	+232,8	+16,0	-38,2	+65,8	+31,0
Aer. spor. ^{a9}	-7,1	+144,0	-72,4	+7,6	+26,0
Kvasinky ^{b10}	-69,4	-49,3	nulová ¹²	20-násobná ¹³	nulová ¹²
Plesne ^{b11}	-46,8	-43,2	nulová ¹²	+125,0	50-násobná ¹⁴

a – ŽA (100 %). b – SA (SAe) (100 %).

¹Microorganism; ²Plating efficiency; ³Beef meat; ⁴Meat-vegetable salad; ⁵Poultry paste; ⁶Raw carrot; ⁷Black pepper; ⁸Total number of microorganisms; ⁹Aerobic spore-forming microorganisms; ¹⁰Yeasts; ¹¹Fungi; ¹²Zero plating efficiency; ¹³Plating efficiency 20 times higher; ¹⁴Plating efficiency 50 times higher.

Záchytnosť živných pôd

ŽA: GTK

CPM. Z výsledkov *t*-testov, ako aj z percentuálneho vyhodnotenia záchytnosti v tabuľke 6 vyplýva, že záchytnosť bola významne lepšia na pôde GTK v materiáloch: hovädzie mäso (o 232,8 %), surová mrkva (65,8 %), čierne korenie (31 %); v ostatných surovinách sa od ŽA významne nelíšila.

Aeróbne spórotvorné mikroorganizmy. Záchytnosť na agare GTK bola lepšia vo vzorkách vlašského šalátu (o 144 %), čierneho korenia (26 %), vo vzorkách hydínovej paštéty bola horšia o 72 % (tab. 6); takmer rovnaká záchytnosť na obidvoch porovnávacích pôdach bola vo vzorke hovädzieho mäsa a v surovej mrkve (tab. 1, 4, 6).

SA (SAe): a GKCH

Kvasinky. Z tabuľky 6, ako aj z výpočtov príslušných tabuliek vyplynulo, že záchytnosť kvasiniek na agare GKCH bola v neprospech tejto pôdy oproti SA pôde v dvoch potravinových materiáloch: hovädzie surové mäso (o 69,4 %), vlašský šalát (o 49,3 %), ale bola lepšia ako na SAe; vo vzorke čierneho korenia a v hydínovej paštéte bola zhodná (0). Vo vzorke surovej mrkvy bola záchytnosť 20-násobne vyššia na agare GKCH.

Plesne. Zistili sme záchytnosť v neprospech agaru GKCH oproti SA vo vzorke hovädzieho mäsa (o 46,8 %) a vlašského šalátu (o 43,2 %); v hydínovej paštéte, ako dokumentuje tabuľka 6 a výpočty v tabuľke 3, bol zhodný negatívny nález, vo vzorke čierneho korenia bola záchytnosť plesní jednoznačne

lepšia na novovyvinutej živnej pôde. V surovej mrkve (tab. 4, 6) bola záchytnosť na agare GKCH asi dvojnásobne vyššia.

Z výsledkov štatistického vyhodnotenia reprodukovateľnosti a záchytnosti navzájom porovnávaných sušených živných pôd pomocou *F*- a *t*-testov na počítači ATARI 800 XL vyplynula dobrá reprodukovateľnosť, jednoznačne vyššia záchytnosť a selektívnosť pre sledované skupiny mikroorganizmov vo zvolenom materiáli.

Literatúra

- [1] ČSN 56 0100: Mikrobiologické zkoušení poživatin, předmětů běžného užívání a prostředí potravinářských provozů. Praha, ÚNM 1968, 239 s.
- [2] ECKSCHLAGER, F. – HORSÁK, I. – KODEJŠ, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. Praha 1980, 220 s.
- [3] ČSN 56 0083: Stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů plotnovou metodou. Praha, ÚNM 1986, 8 s.
- [4] ČSN 56 0082: Zásady kultivace mikroorganismů a způsob zpracování výsledků při mikrobiologickém zkoušení Praha, ÚNM 1986, 6 s.
- [5] ČSN 56 0081: Příprava vzorků k mikrobiologickému zkoušení. Praha, ÚNM 1986, 13 s.
- [6] ČSN 56 0087: Stanovení počtu kvasinek a plísní. Praha, ÚNM 1986, 8 s.

Заверка годности к употреблению новоразвитых сушеных питательных сред для определения микроорганизмов

Резюме

Целью работы было заверить годность к употреблению новоразвитых сушеных питательных сред (производитель IMUNA, н. п., Ш. Михалыны) для количественного определения микроорганизмов по новым чехословацким государственным нормам с окончательным действием с 1-ого января 1990 года. Мы сравнивали ГТК агар (глюкозо-триптон-дрожжевой экстракт) с до сих пор употребляемым питательным агаром Но. 2 (ЖА) (общее число микроорганизмов, аэробные споры создающие микроорганизмы) и ГКХ агар (глюкоза-дрожжевой экстракт-хлорамфеникол) по сравнению с до сих пор действующим солодовым агаром (СА) или агаром со солодовым экстрактом (САэ) (дрожжи и плесени) средством пяти сортов пищевых продуктов (сырая говядина, овощно-мясной салат с майонезом, наштет из птиц, морков и перец).

Результаты были статистически оценены (*F*- и *t*-тесты) на вычислительной машине ATARI 800 XL.

Verification of the suitability of new developed dried culture mediums for determination of microorganisms

Summary

A propose of the paper was to verify the suitability of new developed dried culture mediums (produced by IMUNA, n. p., Šarišské Michalany) for quantitative determination of microorganisms according to new Czechoslovak state standards which are to be definitely enforced from January 1, 1990. The new developed agar (glucose-tryptone-yeast extract) was compared with nowadays used culture agar No. 2 (total number of microorganisms, aerobic sporeforming microorganisms) and agar (glucose-yeast extract-chloramphenicol) was compared with malt agar or agar with malt extract (yeasts and fungi) using 5 types of food material (raw beef meat, meat-vegetable salad, poultry paste, carrot and black pepper).

The results were statistical evaluated (*F*- and *t*-tests) by computer ATARI 800 XL.