

## Rychlá mikrobiologická kontrola sirupů mikrobitesty PRPM

663.814/.815 : 576.8.07  
576.8.093

RNDr. LIBUŠE ŠVORCOVÁ, Výzkumný ústav balneologický v Mariánských Lázních

Do redakce došlo 25. 1. 1971

Jedním ze zdrojů kontaminace nealkoholických nápojů jsou sirupy, na jejichž mikrobiální znečištění již mnozí autoři upozornili [1–5], někteří dokonce pozorovali zvyšování počtu mikroorganismů při skladování. Z kontrolních laboratoří však dostáváme obvykle negativní výsledky, i když v některých sledovaných případech mohl být sirup jedinou příčinou kontaminace nápoje. Negativní nálezy vyšetření sirupu může být, mezi jiným, způsoben použitím nevhodné vyšetřovací techniky, a to např. přímým očkovaním sirupů na plotny s kultivačním médiem, kdy silná vrstva cukru, obklopující zárodky znemožňuje přístup k živným látkám média a jejich využívání. Tím se brzdí dělení nebo pučení buněk a vytvoření makroskopické kolonie. Negativní výsledek je možný při očkování malého množství silně zředěného sirupu, takže pravděpodobnost zachycení zárodku v nepatrném množství sirupu je příliš malá.

Přesto pro vyšetřování sirupů v zařízených bakteriologických laboratořích je jediná možnou a spolehlivou metodou klasická kultivace doplněná event. membránou filtrací ředěných vzorků. Většina závodů však nemá zařízeny bakteriologické laboratoře, ani vhodné odborníky a přesto by se měly provádět vstupní i výstupní kontroly vyrobených i dodávaných sirupů. Pro tyto účely jsem vyzkoušela a aplikovala rychlou orientační kontrolu mikrobitesty PRPM.

### Experimenty a diskuse

#### Klasická kultivace

1 ml 10% roztoku sirupu jsme očkovali rozsevem na sladidinový a živný agar. Sladinový agar jsme připravovali z čerstvé sladiny po úpravě na 9° B $\acute{e}$  a přidali 2 % agaru. Živný agar jsme připravovali ze sušené půdy, dodávané IMÚNOU v Šáříšských Michalanech.

Výrazu živné médium jsem použila proto, abych se vyhnula soustavnému opakování živný agar nebo sladinový agar. Je to obvyklé i v zahraničí.

#### Popis metody mikrobitestů

Princip této metody záleží v přípravě 10 % roztoku vzorku zředěním sirupu sterilním fyziologickým roztokem ve sterilním válci, nebo transfúzní láhvi NTS, do něhož se ponoří 2 mikrobitesty PRPM s nasávací schopností 5 ml. Vyšetření se provede z 10 ml 10 % roztoku, tj. z 1 ml sirupu.

Fyziologický roztok může být připraven ve 100 ml válci se širším hrdlem

s obsahem 90 ml fyziologického roztoku, a v závodech se dolije po rysku 10 ml sirupu  
v láhvi NTS 100 ml rovněž 90 ml fyziologického roztoku se dolije po rysku 10 ml sirupu  
v láhvi NTS 250 ml s obsahem 225 ml fyziologického roztoku se dolije po rysku 25 ml sirupu  
v láhvi NTS 300 ml v obsahem 270 ml fyziologického roztoku se dolije po rysku 30 ml sirupu

v láhvi NTS 500 ml s obsahem 450 ml fyziologického roztoku se dolije po rysku 50 ml sirupu.

Po promíchání se přidá k úpravě pH na 3,5 až 4,5 na každých 100 ml roztoku 1 ml 20 % louhu sodného a ihned se provede mikrobitestová zkouška takto:

Sáček s mikrobitem se rozstříhne nůžkami opálenými nad plamenem třeba i lihového kahanu, opálenou pinzetou se vyjme mikrobitest, který je stočen a obalen polyetylenovou fólií a převázán gumičkou. Gumička se sejme, mikrobitest se opatrně zbaví PE fólie, uchopí se sterilní pinzetou tak, aby se svitek nerozvinul a stočený se ponoří do roztoku sirupu. Po důkladném nasátí (pokud unikají bubliny) za současného promíchávání, se mikrobitest vyjme, odkápne a vloží zpět do sáčku, v němž se rozvine. Sáček se přitiskne k mikrobitemu a mezi dvěma podložními skly se zastaví. Stejně se provede vyšetření s druhým mikrobitem. Oběma mikrobitesty se tedy nasálo 10 ml 10 % roztoku, takže vyšetření se provedlo z 1 ml sirupu.

Mikrobitest se inkubuje v termostatu při 25 °C, pokud je teplota v místnosti 20 až 25 °C, přímo v laboratoři v temnu. Hodnocení je stejné jako při kontrole slazených nealkoholických nápojů nasávacími mikrobitesty PRPM [7]. Po 30 až 48 hodinách se počítají červené tečky vyredukovaného tetrazoliumchloridu, indikující počet bakterií, po 4 až 5 dnech počet kvasinek a plísní.

Upravené mikrobitesty by podle objednávek vyráběla IMUNA v Šáříšských Michalanech.

#### Srovnávací experimenty—optimální pH

Abychom zjistili rozdíl mezi klasickou kultivací a mikrobitesty PRPM očkovali jsme roztoky sirupů na 2 mikrobitesty a 2 misky se sladinovým a živným agarem. Získané výsledky jsme přepočítali a navzájem srovnávali. Celkem jsme takto vyšetřili 63 vzorky. Maximální, minimální a průměrné hodnoty těchto vyšetření jsou uvedeny v tabulce 1.

Již na počátku pokusů jsme zjistili, že při přímém zředění sirupu fyziologickým roztokem, pokud nepůsobí do jisté míry puřovací schopnost minerální vody, posouvá se pH příliš na kyselou stranu, a to dokonce pod 2. Toto pH je pro většinu organismů sirupů, (tj. pro kvasinky a bakterie), i když jsou acidofilní, příliš nízké a inhibuje jejich růst. Inhibiční vliv se sice neprojevil na živném a sladinovém agaru, které mají dostatečnou puřovací schopnost i dostatek živin pro narušené buňky, značný vliv však byl patrný při očkování na mikrobitesty. Na základě tohoto poznání jsme začali roztoky sirupu alkalizovat a vyšetřovat optimální pH pro kultivaci na mikrobitestech. Výsledky všech pokusů spolu se statisticky významnými veličinami pro posouzení zkoušek jsou uvedeny v tabulce 3.



Tabulka 1. Výskyt mikroorganismů na klasických živných půdách a mikrobitestech PRPM

pH	Skupina organismů	Klasická kultivace/ml			Mikrobiteš PRPM/ml		
		max.	min.	průměr	max.	min.	průměr
<3	baktérie	300	30	115	140	1	39,3
	kvasinky	60	0	17	20	0	4
	plísňe	110	0	47	16	1	6
3,5 až 4,5	baktérie	150	20	81	85	0	15
	kvasinky	90	0	17	16	0	4
	plísňe	70	0	24	20	1	7
4,5 až 6,0	baktérie	200	10	79	28	0	4
	kvasinky	50	0	7	60	0	6
	plísňe	100	0	26	16	0	6
>6	baktérie	250	20	123	6	0	2
	kvasinky	260	0	79	4	0	1
	plísňe	50	1	24	4	1	2

Uvedenými pokusy jsme zjistili, že při pH od 2,5 do 3,5 se při stanovení počtu kvasinek a bakterií získají 4krát menší výsledky (tab. 2) na mikrobitestech než při klasické kultivaci. Při stanovení počtu plísní byl rozdíl větší, sedminásobný, zřejmě proto, že růstu plísní vyhovuje pH vyšší. Při úpravě pH na 3,5 až 4,5 byl rozdíl mezi kultivací plísní a kvasinek na mikrobitestech PRPM a sladidlovém agaru téměř čtyřnásobný, avšak vzrostl rozdíl mezi počtem bakterií na agaru a na mikrobitestech na pětinašobek. Průměrně však rostlo při tomto pH čtyřikrát méně zárodků na mikrobitestech než při klasické kultivaci, tedy stejně jako při použití

Tabulka 2. Přepočítávací faktory pro jednotlivé skupiny organismů při různém pH

pH	Baktérie	Kvasinky	Plísňe	Průměr
2,5—3,5	4,0	4,0	7,4	5,1
3,5—4,5	5,2	3,8	3,5	4,2
4,5—6,0	18,0	1,2	5,3	8,3
nad 6,0	69,0	61,0	12,0	47,3

Tabulka 3. Závislost mezi počtem zárodků na klasických půdách a mikrobitestech PRPM

pH	Statistické veličiny	Baktérie		Kvasinky		Plísňe	
		agar	PRPM	agar	PRPM	agar	PRPM
<3	součet	1 390	471	190	48	508	82
	počet <i>n</i>	12	12	11	11	13	13
	průměr $\bar{x}$	115,8	39,3	17,2	4,3	46,7	6,3
	směrodatná odchylka $s_x$	86,1	57,4	21,8	6,6	56,0	4,5
	$s_x$	25,4	16,9	6,6	2,0	16,4	1,3
	<i>B, C</i>	75 692	25 991	4 218	380	21 000	217
	<i>A</i>	38 288		18 800		1 951	
	korelační koeficient <i>k</i>	0,88		1,5		0,93	
	determinační koeficient <i>d</i>	77,5%		—		86,5%	
3,5—4,5	součet <i>S</i>	1 780	341	370	97	540	154
	počet <i>n</i>	22	22	22	22	22	22
	průměr $\bar{x}$	81,0	15,5	16,8	4,4	24,5	7
	$s_x$	39	8	26,0	3,9	19,6	6
	$s_x$	8,8	2,7	3,7	0,8	4,1	1,3
	<i>B, C</i>	31 782	13 000	14 077	372	7 446	697
	<i>A</i>	17 940		1 489		2 260	
	korelační koeficient <i>k</i>	0,9		0,66		0,95	
	determinační koeficient <i>d</i>	81 %		43,5 %		94,5 %	
4,5—6	součet <i>S</i>	1 585	88	150	125	530	112
	počet <i>n</i>	20	20	20	20	20	20
	průměr $\bar{x}$	79,2	4,4	7,5	6,2	26,5	5,6
	$s_x$	61,0	8,6	16,7	5,4	23,6	5,1
	$s_x$	13,8	1,9	3,8	1,2	5,4	1,2
	<i>B, C</i>	54 523	1223	4 375	22	9 455	500
	<i>A</i>	5 378		3 640		2 342	
	korelační koeficient <i>k</i>	0,66		14,5		1,07	
	determinační koeficient <i>d</i>	43,5		—		—	
>6	součet <i>S</i>	1 105	16	713	12	216	18
	počet <i>n</i>	9	9	9	9	9	9
	průměr $\bar{x}$	123,0	1,8	79	1,4	24	2
	$s_x$	84,7	1,9	108	1,6	35	0,8
	$s_x$	27,3	0,6	36	0,5	11,6	0,2
	<i>B, C</i>	52 389	28	89 315	17	3 748	6
	<i>A</i>	1067		1 291		98	
	korelační koeficient <i>k</i>	0,88		1,05		0,88	
	determinační koeficient <i>d</i>	78%		—		78%	



Tabulka 4. Regresní přímky pro vztah počtu zárodků na mikrobítestech a půdách

pH	Skupina organ.	Závislost agar/PRPM	Závislost PRPM/agar
2,5–3,5	baktérie	$y_1 = 58,8 + 1,5 x$	$y'_1 = -18,7 + 0,5 x$
3,5–4,5	baktérie	$y_2 = 61 + 1,3 x_2$	$y'_2 = -33 + 0,6 x'_2$
4,5–6	baktérie	$y_3 = 59,8 + 4,4 x_3$	$y'_3 = -2,7 + 0,1 x'_3$
3,5–4,5	kvasinky	$y_4 = -0,4 + 3,9 x_4$	$y'_4 = 2,7 + 0,1 x'_4$
3,5–4,5	plísňe	$y_5 = 2,1 + 3,2 x_5$	$y'_5 = 0,2 + 0,3 x'_5$

mikrobítestů pro jiné účely, tj. pro slazené nealkoholické nápoje s pH 3,5 až 4 a přírodní i minerální vody s pH 6,0 až 7,5, pokud počet zárodků na mikrobítestu nepřesáhne 80 v 1 ml.

Ještě více se vliv alkalizace projevil při zvýšení pH na 4,5 až 6, kdy při srovnávání počtu bakterií na agaru a mikrobítestech vznikl rozdíl osmnáctinásobný. Kvasinky a plísňe toto pH snášely ještě poměrně dobře, tedy zhruba stejně jako při pH 2,5 až 4,5. Při zvýšení pH nad 6 byl již rozdíl mezi oběma metodami při kultivaci kvasinek a bakterií 60–70násobný. Menší vliv alkalizace při tomto pH byl pozorován u spor plísní (rozdíl 12násobný), které jsou chráněny před nepříznivými vlivy silnostěnným pouzdrem.

Z pozorování tedy vyplývá, že nelze měnit radikálně a libovolně pH prostředí, (např. alkalizací nebo okyselením) na které jsou zvyklé mikroorganismy, jejichž počet chceme kultivací zjišťovat. Při takovém zásahu se poškozuji buňky, které částečně se mohou v prostředí bohatém na živiny zregenerovat (sladina, živný agar), avšak nevyrostou v prostředí na živiny chudším, jako je mikrobítest. Na mikrobítestu je tedy třeba zachovat pH, které je pro stanovenou skupinu organismů optimální.

Tuto teorii potvrzuje i skutečnost, že výsledky získané při vyšetřování sirupů a slazených minerálních vod s pH 3,5 až 4,5 jsou zhruba stejné jako při vyšetřování vod přírodních s pH 6 až 7,5 a to při počtu zárodků do 50 roste na mikrobítestech zhruba čtyřikrát méně, při počtu do 100 pětkrát méně zárodků na mikrobítestech než na klasických živných médiích.

Všechny získané výsledky byly statisticky zpracovány a jsou uvedeny v tabulce 3, rovnice regresních přímek v tabulce 4. Z tabulky 3 je patrné, že u všech souborů byly zjištěny vysoké směrodatné odchylky, mnohdy vyšší než průměr. Stalo se tak proto, že v souborech jsou zahrnuta vyšetření různých sirupů z různých závodů a tedy různé mikrobiálně znečištěných. Soubory byly sledovány hlavně pro zhodnocení vztahů mezi oběma metodami za

různého pH a jeho vlivu na počet zárodků na mikrobítestech a klasických živných médiích, což se také zřetelně projevilo.

#### Závěr

1. Mikrobítesty PRPM s nasávací schopností 5 ml se pro orientační vstupní a výstupní kontrolu sirupů přímo v závodech osvědčily, neboť lze jimi stanovit počet bakterií, kvasinek a plísní velice jednoduše po zředění vzorku sterilním fyziologickým roztokem a alkalizaci na pH 3,5 až 4,5. Kultivuje se při pokojové teplotě 20 až 25 °C. Po 30 až 48 hodinách se počítá počet bakterií, po 4 až 5 dnech kolonie kvasinek a plísní.

2. Při výskytu celkového počtu všech zárodků do 80 v 1 ml roste na mikrobítestech zhruba čtyřikrát méně kolonií než při klasické kultivaci. Aby sirup vyhovoval normě, neměl by celkový počet zárodků na obou mikrobítestech, tj. v 1 ml sirupu, být větší než 13.

3. Při vyšetřování vzorků mikrobítesty je nutno zachovávat pH prostředí, které je optimální pro sledovanou skupinu mikroorganismů, tj. při vyšetřování sirupů a slazených nealkoholických nápojů pH 3,5 až 4,5, při vyšetřování přírodních vod pH 6–7,5. Při náhlých změnách pH se poškozuji hlavně buňky bakterií a kvasinek, které potom nejsou schopny růst v médiu chudším než jsou klasické živné půdy.

#### Literatura

- [1] INGRAM, M.: Food. Manuf. 24, 1949: 77
- [2] INGRAM, M.: J. gen. Microbiol. 4, Proc. X (1950).
- [3] KIESINGEROVÁ, N. - ORSZÁGOVÁ, V. - MUŽIKÁŘ, V.: Osmofilní kvasinky a jejich význam v potravinářském průmyslu. Průmysl potravin 20, 1969: 120–123
- [4] MERGL, M. - NOVÁKOVÁ, L.: Ultrafiltry Synthesia při mikrobiologické kontrole sirupů
- [5] ŠVORCOVÁ, L.: Zkušenosti s provozní mikrobiologickou kontrolou mikrobítesty v plnárnách minerálních vod. Kvasný průmysl 16, 1970, č. 6, s. 137–138
- [6] ŠVORCOVÁ, L.: Použití membránové filtrace k mikrobiologické kontrole sirupů. Průmysl potravin 1, 1971, s. 16–18
- [7] ŠVORCOVÁ, L.: Použití mikrobítestů k hygienické kontrole v nápojářském průmyslu. Průmysl potravin 21, 1970, č. 7, s. 221–223 a č. 8, s. 243–246.