

VYUŽITÍ SYSTÉMU BIOLOG PRO IDENTIFIKACI MIKROORGANISMŮ VYSKYTUJÍCÍCH SE V POTRAVINÁCH

Veronika Michná¹

¹*Ostravská univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava, email:
Veronika.Michna@seznam.cz*

Abstrakt

Hlavním cílem této práce bylo zavedení systému Biolog v laboratoři mikrobiologie a ověření detekční kapacity tohoto systému. Při této práci bylo využito zejména mikrobiologické analýzy potravin. Součástí této analýzy bylo izolovat mikroorganismy kontaminující potraviny pomocí kultivačních metod. Izolované mikroorganismy byly poté využity pro mikroskopickou analýzu. Pod mikroskopem byl posuzován tvar a uspořádání buněk mikroorganismů v barveném preparátu. Bylo využito diagnostického barvení podle Grama, na jehož základě se rozhodovalo o příslušnosti ke Gram-pozitivním nebo Gram-negativním bakteriím. Tyto výsledky pak byly porovnány s výsledky získanými pomocí systému Biolog. Pomocí tohoto systému byly mikroorganismy určené v rámci mikroskopické analýzy jako bakterie identifikovány.

Klíčová slova: mikroorganismy; potraviny; kultivační a mikroskopické metody; identifikace mikroorganismů; systém Biolog

Úvod

Vškeré potraviny, s výjimkou několika druhů potravin sterilních, jsou osídleny mnoha různými mikroorganismy. Některé z mikroorganismů se v potravinářském průmyslu využívají cíleně a jsou nedílnou součástí výroby některých potravin, jiné však způsobují kažení potravin a jsou původci mnohdy závažných onemocnění [4, 5].

Mikroorganismy v potravinách můžeme detekovat s využitím tradičních metod, které jsou založeny na kultivačních nebo mikroskopických stanoveních. Tyto metody jsou poměrně levné, ale časově velmi náročné a často nepřesné [5]. Kultivační a mikroskopická stanovení bývají doplněna průkazem enzymatické aktivity mikroorganismů, kterou určujeme pomocí jednoduchých biochemických testů, které jsou jednotlivě prováděny na selektivně-diagnostických kultivačních médiích [1]. V posledních letech je však vyvíjen velký tlak na kvalitu potravin, a tak i na rychlost a přesnost metod, kterých se pro mikrobiologickou kontrolu potravin využívá [5]. V potravinářských a klinických laboratořích se proto začalo k identifikaci mikroorganismů využívat např. identifikačních souprav. V jedné takové soupravě může být k identifikaci mikroorganismu sdruženo 20 a více biochemických testů, které jsou v podobě dehydratovaných substrátů umístěny v jamkách destičky. K interpretaci výsledků se pak využívají diagnostické seznamy nebo specializovaný software [2, 3]. Jednou z takových identifikačních souprav je i systém Biolog. Systém Biolog je souprava pro identifikaci mikroorganismů na základě přesných patentovaných biochemických testů. Součástmi této soupravy jsou: GEN III Micro Plate (destička s dehydratovanými substráty), inokulační roztoky IF A a IF B pro inokulaci mikrobiální kultury a rehydratování substrátů, MicroLog software a GEN III ID (identifikační databáze), tato databáze obsahuje rozsáhlou knihovnu druhů mikroorganismů.

Výsledky zbarvení destičky jsou porovnávány s výsledky z databáze GEN III ID. V případě shody systém určí výsledek – identifikuje mikroorganismus na základě fenotypového fingerprintu, který nám poskytne zbarvení destičky [6, 7].

Metody

K izolaci mikroorganismů z potravin byly využity následující metody:

Podle normy **ČSN EN ISO 4833 (2003)** – Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30°C.

Podle normy **ČSN ISO 7954 (1994)** – Všeobecné pokyny pro stanovení počtu kvasinek a plísní – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 25°C

Podle normy **ČSN ISO 21528-2 (2006)** – Horizontální metody pro průkaz a stanovení počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* – Technika počítání kolonií

K identifikaci mikroorganismů byly využity následující metody:

Mikroskopická analýza

Biochemická identifikace – při této identifikaci byl využit systém Biolog a identifikační souprava ENTERO 24 test.

Výsledky a diskuse

Tabulka 1. Výsledky identifikace referenčních kmenů pomocí systému Biolog

Referenční kmen	Identifikace	PROB
<i>Bacillus cereus</i> CCM 2010	Neidentifikováno	-
<i>Citrobacter koseri</i> 4472	<i>Citrobacter koseri</i>	0,991
<i>Enterobacter sakazakii</i> CCM 3461	Neidentifikováno	-
<i>Escherichia coli</i> CCM 3988	<i>Escherichia coli</i>	0,928
<i>Proteus spp.</i> CCM 1799	<i>Proteus hauseri</i>	0,596
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1960	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,667
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100 CCM 7205	<i>Salmonella enterica</i> ST Typhimurium	0,656
<i>Serratia marcescens</i> CCM 303	neidentifikováno	-
<i>Staphylococcus cohnii</i> CCM 4296	<i>Staphylococcus cohnii</i> ss <i>urealyticum</i>	0,987

Tabulka 2. Výsledky identifikace neznámých mikroorganismů izolovaných z potravin pomocí systému Biolog a srovnání s výsledky mikroskopické analýzy

Potravina	Mikroorganismus	PROB	SIM	G+/G- Biolog	G+/G- Mikroskop
Vejce	<i>Kocuria kristinae</i>	0,996	0,643	G+	G+
Párek	<i>Kocuria kristinae</i>	0,991	0,633	G+	G+
Vejce	<i>Microbacterium</i> <i>spp.</i>	0,569	0,569	G+	G+
Vejce	<i>Micrococcus</i> <i>luteus A</i>	-	0,579	G+	G+
Paštika	<i>Micrococcus</i> <i>luteus A</i>	-	0,508	G+	G+
Mléko	<i>Micrococcus</i> <i>luteus D</i>	0,904	0,590	G+	G+
Jogurt	<i>Pseudomonas</i> <i>fragi</i>	0,726	0,726	G-	G-
Mléko	<i>Pseudomonas</i> <i>mendocina</i>	0,989	0,660	G-	G-
Mléko	<i>Pseudomonas</i> <i>viridilivida</i>	0,516	0,516	G-	G-
Mléko	<i>Staphylococcus</i> <i>hominis</i>	0,953	0,649	G+	G+
Vejce	<i>Staphylococcus</i> <i>pasteuri</i>	0,509	0,509	G+	G+
Paštika	<i>Staphylococcus</i> <i>saprophyticus</i>	0,949	0,647	G+	G+
Párek	<i>Staphylococcus</i> <i>warneri</i>	0,624	0,624	G+	G+
Majonézový salát	<i>Staphylococcus</i> <i>xylosus</i>	0,646	0,646	G+	G+
Paštika	<i>Streptococcus suis</i>	0,719	0,719	G+	G+

Diskuse

Největší výhodou identifikačního systému Biolog je jeho rychlost a spolehlivost, je standardnější než klasické biochemické testy, z toho důvodu, že obsahuje soubor reprezentativních biochemických testů. Tyto jsou umístěny jednotlivě v jamkách destičky, která jich pro jeden mikroorganismus obsahuje 94. I proto šetří čas a zejména pak materiál [6].

Klasické biochemické testy jsou časově náročné, vyžadují přípravu médií pro každý jednotlivý test a také inkubaci, která toto testování prodlouží o další časový úsek. Při přípravě jednotlivých médií je spotřebována spousta materiálu, ať už jde o laboratorní pomůcky nebo kultivační média [1, 2].

Závěr

V rámci zavedení systému Biolog v laboratoři mikrobiologie a ověření jeho detekční kapacity byly využity referenční kmeny, které pocházely z České sbírky mikroorganismů v Brně.

Podle kritérií, stanovených pro posouzení přesnosti výsledků byly mikroorganismy správně a přesně identifikovány. Pravděpodobnost byla vždy větší než 50% a hodnota SIM, tedy index podobnosti byl vždy větší než 0,5.

Při stanovování celkového počtu mikroorganismů bylo zjištěno, že potraviny krůtí maso z pultového prodeje, játrová paštika a majonézový salát nevyhovují mikrobiologickým požadavkům na potraviny. Podle vyhlášky č. 132/2004 Sb. byly u těchto potravin překročeny přípustné hodnoty mikroorganismů, které potraviny ještě mohou obsahovat, aniž by byly označeny za zdravotně závadné.

Pomocí systému Biolog nebyly identifikovány žádné patogenní mikroorganismy. Většina identifikovaných mikroorganismů je nepatogenní, nebo jsou patogenní jen podmíněně. Žádný z těchto mikroorganismů nespadá do kategorie mikroorganismů, které jsou spojovány se vznikem závažných onemocnění. Žádný z těchto mikroorganismů neprodukuje v potravinách obávané bakteriální toxiny, které by způsobily závažné toxikózy.

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala Prof. Doc. RNDr. Kateřině Malachové, CSc. za odborné rady, poskytnutí literatury, za pomoc a vedení při realizaci diplomové práce a také bych ráda poděkovala Mgr. Zuzaně Rybkové, Ph. D. za cenné rady, poskytnutí literatury a pomoc při práci v laboratoři mikrobiologie, stejně tak bych chtěla poděkovat Mgr. Zuzaně Jaskóové za cenné rady a pomoc při práci v laboratoři mikrobiologie.

Literatura

- [1.] BURDYCHOVÁ, R. & SLÁDKOVÁ, P. *Mikrobiologická analýzy potravin*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. První vydání, 2007. ISBN 978-80-7375-116-6
- [2.] DEMNEROVÁ, K. a kol. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Třetí vydání, 2001. ISBN 80-7080-415-7
- [3.] HODEK, P., PÁCA, J. & ŠULC, M. *Laboratorní cvičení z biologie a biochemie mikroorganismů*. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum. První vydání, 2009. ISBN 978-80-246-1667-4
- [4.] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře*. SNTL-Nakladatelství technické literatury, n. p. První vydání, 1983. ISBN 04-824-83
- [5.] TOMÁNKOVÁ, E., RADA, V. & KILLER, J. *Potravinářská mikrobiologie*. Česká zemědělská univerzita v Praze. První vydání, 2006. ISBN 80-213-1583-0
- [6.] BIOLOG, Inc. *Biolog-User's Guide*. Hayward, U. S. A. April, 2010. Dostupné na <http://www.biolog.com>
- [7.] BIOLOG, Inc. *GEN III MicroPlate-Instructions fore Use*. Hayward, U. S. A. March, 2008. Dostupné na <http://www.biolog.com>

Abstract

The main objective of this work was the introduction of Biolog the microbiology laboratory verification and detection capacity of the system. When this work was used mainly microbiological analysis of food. This analysis was to isolate microorganisms contaminating food using cultivation methods. The isolated microorganisms were then used for microscopic analysis . Under the microscope was assessed shape and arrangement of the microorganism cells in the stained specimen. We used a diagnostic Gram stain , on the basis of jurisdiction was decided to Gram -positive or Gram -negative bacteria. These results were then compared with those obtained using the Biolog system . With this system, the micro-organisms specified in the microscopic analysis as bacterias was identified.