

GB

Národní norma Čínské lidové republiky

GB 4789.26-2023

**Národní norma pro bezpečnost potravin
Mikrobiologické vyšetření potravin
Testování komerční sterility**

Vydáno 06. 09. 2023

Zavedeno dne 6. března 2024

Národní zdravotní komise Čínské lidové republiky
Státní správa pro regulaci trhu

Předmluva

Tato norma nahrazuje normu GB 4789.26—2013 „Národní norma pro bezpečnost potravin: Mikrobiologické vyšetření potravin — Vyšetření komerční sterility“.

Ve srovnání s normou GB 4789.26—2013 jsou hlavní změny v této normě následující:

- byly doplněny definice obchodní sterility a kyselých potravin;
- byly doplněny postupy pro zkoušení obchodní sterility při výrobě potravin;
- byly odstraněny požadavky týkající se opětovného vážení po skladování a metody zkoušky těsnosti uzávěru;
- byl změněn rozsah použití, definice potravin s nízkou kyselostí a kyselých potravin a zkušební postupy.

Národní norma pro bezpečnost potravin

Mikrobiologické vyšetření potravin

Vyšetření komerční sterility

1. Rozsah

Tato norma stanoví postupy, fáze zkoušek, hodnocení výsledků a požadavky na vykazování v oblasti zkoušek komerční sterility potravin.

Tato norma se vztahuje na zkoušky komerční sterility potravin.

2. Termíny a definice

2.1 Komerční sterilita

Stav, kdy potraviny po podrobení odpovídající tepelné sterilizaci neobsahují ani patogenní mikroorganismy, ani nepatogenní mikroorganismy schopné se v nich při normálních teplotách množit.

2.2 Potraviny s nízkou kyselostí

Potraviny s rovnovážným pH vyšším než 4,6 a aktivitou vody vyšší než 0,85 po sterilizaci.

2.3 Kyselé potraviny

Potraviny, které po sterilizaci, ale bez okyselení, mají pH 4,6 nebo nižší v samotném produktu nebo v jeho tekutém prostředí, při aktivitě vody vyšší než 0,85. Rajčatové produkty s pH nižším než 4,7 se klasifikují jako kyselé potraviny.

2.4 Okyselené potraviny

Potraviny okyselené přidáním regulátorů kyselosti nebo jinými metodami okyselení, v důsledku čehož je aktivita vody vyšší než 0,85 a rovnovážné pH je 4,6 nebo nižší.

3. Vybavení a materiály

Kromě standardních materiálů a vybavení pro sterilizaci a kultivaci používaných v mikrobiologických laboratořích jsou nezbytná také následující zařízení:

3.1 Chladnička: 2 °C až 5 °C;

3.2 Inkubátor: 30 °C ± 1 °C, 36 °C ± 1 °C, 55 °C ± 1 °C;

3.3 Inkubační komora: 30 °C ± 2 °C, 36 °C ± 2 °C, 55 °C ± 2 °C;

3.4 Vodní lázeň s konstantní teplotou: 55 °C ± 1 °C;

3.5 Homogenizátor a sterilní homogenizační sáčky, homogenizační kelímky nebo třecí misky;

3.6 Potenciometrický měřič pH: přesnost 0,01 pH;

3.7 Mikroskopické objektivy: 10× až 100×;

3.8 Otevírač na plechovky nebo nádoby;

3.9 Anaerobní inkubátor (komora).

4. Kultivační média a činidla

4.1 Živná média: viz příloha A.

4.2 Barvicí roztok s krystalovou fialkou: viz A.8 v příloze A.

4.3 Gramovo barvicí roztok: viz A.9 v příloze A.

4.4 Sterilní fyziologický roztok: viz A.10 v příloze A.

4.5 Xylen.

4.6 Roztok etanolu obsahující 4 % jódu: Rozpusťte 4 g jódu ve 100 ml 70% roztoku

etanolu.

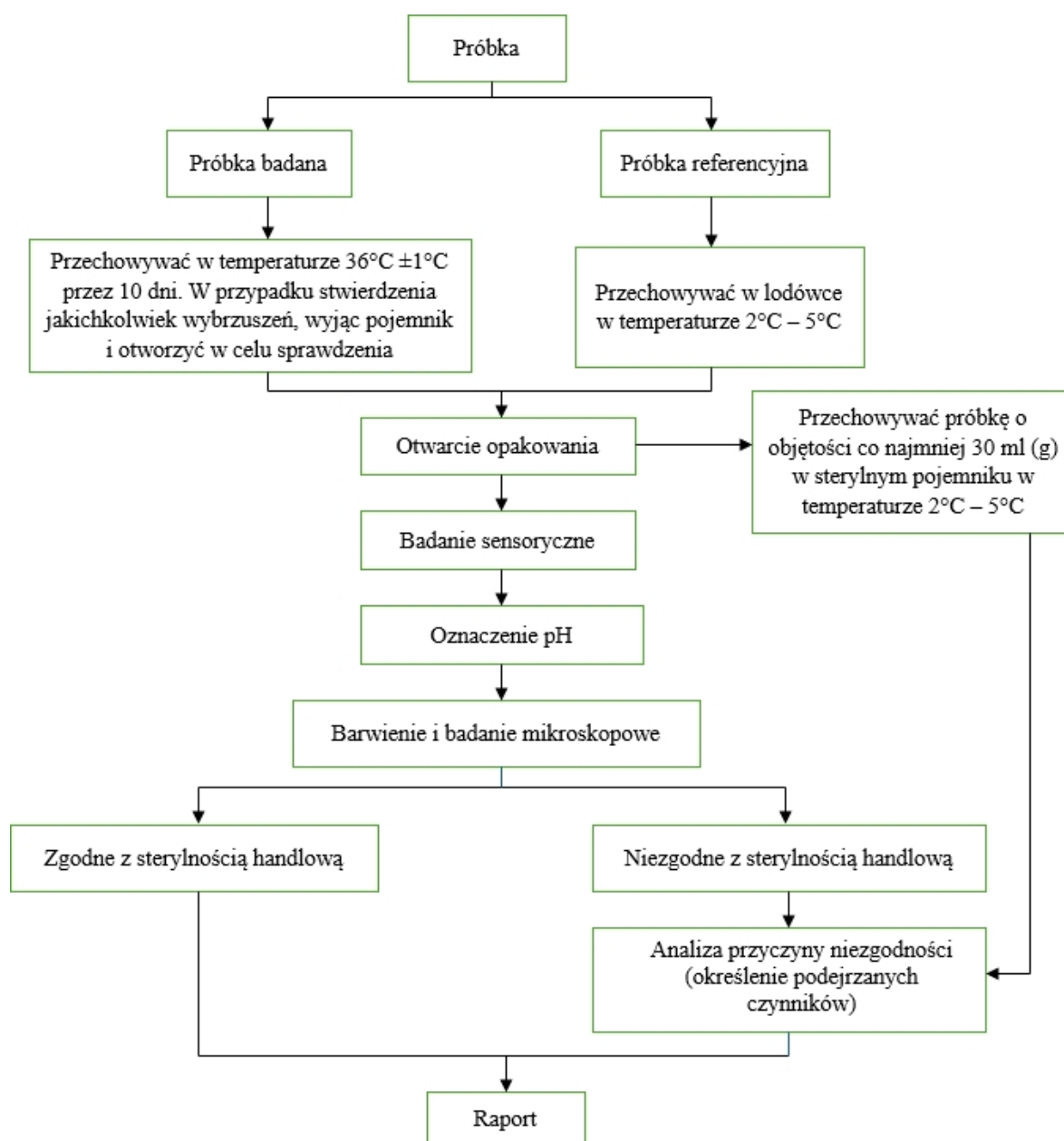
4.7 75% roztok etanolu: Odměřte zvlášť 75 ml bezvodého etanolu a 25 ml vody, důkladně promíchejte a odložte stranou.

4.8 70% roztok etanolu: Odměřte odděleně 70 ml bezvodého etanolu a 30 ml vody, důkladně promíchejte a odložte stranou.

5. Zkouška komerční sterility v oblasti obchodu s potravinami

5.1 Postup zkoušky

Postup zkoušky komerční sterility v oblasti obchodu s potravinami je znázorněn na obrázku 1.



Obrázek 1: Postup zkoušky komerční sterility pro sektor distribuce potravin

5.2 Postup zkoušky

5.2.1 Příprava vzorků

Po odebrání vzorků je třeba zaznamenat název produktu a číslo šarže a označit povrch obalu vzorku. Je třeba se ujistit, že vzorky mají normální vzhled, nejsou poškozené, nevykazují stopy koroze (týká se pouze kovových obalů), úniky nebo nafouklé obaly (v případě plechovek, sáčků, lahví, kelímků atd.), tj. nevykazují žádné viditelné nesrovnalosti.

5.2.2 Udržování teploty

Z každé šarže je třeba uchovat jeden vzorek pro skladování v chladničce při teplotě od 2 °C do 5 °C jako kontrolní vzorek. Ostatní vzorky je třeba skladovat při teplotě 36 °C ± 1 °C po dobu 10 dnů.

Během tohoto období je třeba provádět denní kontroly. V případě jakéhokoli nafouknutí (nádob, sáčků, lahví, kelímků atd.) nebo úniku je třeba daný vzorek okamžitě odstranit. Následně je třeba přistoupit k otevření a kontrole v souladu s bodem 5.2.3 a zdokumentovat výsledky.

5.2.3 Otevírání nádob na potraviny

5.2.3.1 Všechny vzorky uchovávané v teple je třeba před otevřením ochladit na teplotu okolí, aby bylo možné provést kontrolu v aseptických podmínkách.

5.2.3.2 Pokud během ohřívání vykazují jakékoli nádoby (sáčky, láhve, kelímky atd.) bobtnání nebo únik, je třeba je okamžitě vyhodit. Vzorky, které výrazně bobtnaly, je třeba nejprve ochladit na teplotu 2 °C až 5 °C po dobu několika hodin před otevřením nádoby s potravinami za účelem provedení kontroly.

5.2.3.3 Po skončení inkubační doby lze v případě potřeby vnější povrchy vzorků očistit teplou vodou nebo detergentem. Po opláchnutí vodou je třeba je osušit sterilním ručníkem (utěrkou nebo papírem) nebo dezinfikovanou vatou (namočenou v 75% roztoku etanolu). Vnější povrch je třeba dezinfikovat ponořením do 4% roztoku jódu a etanolu (nebo 75% roztoku etanolu) na 30 minut a poté před otevřením otřít do sucha sterilním ručníkem. Alternativně lze před otevřením zapálit v uzavřené komoře, dokud se zcela nespálí všechny zbytky roztoku jódu a etanolu na povrchu. po dobu 30 minut a poté před otevřením osušit sterilním ručníkem. Alternativně je třeba před otevřením zapálit nádobu v uzavřené komoře, dokud nedojde k úplnému spálení všech zbytků roztoku jódu v ethanolu na povrchu (pěnové vzorky a vzorky v hořlavých obalech nelze zapalovat).

5.2.3.4 Vzorky pro testování je třeba otevírat v souladu s požadavky aseptické techniky. Vzorky obsahující tekutiny je třeba před otevřením jemně protřepat. U kovových nádob je třeba použít sterilní otvírák na konzervy nebo propichovač na konzervy, aby se vytvořil dostatečně velký otvor na sterilizovaném hladkém povrchu, nebo je otevřít přímo pomocí úchyty. Při otevírání je třeba zabránit poškození struktury vroubkovaného okraje. Před každým otevřením se ujistěte, že je otvírák na konzervy ve sterilním stavu, aby se zabránilo křížové kontaminaci. U vzorků v pružných obalech lze k otevření bez poškození závěru použít sterilní nůžky.

Upozornění: Silně stlačené nádoby (plechovky, sáčky, láhve, kelímky atd.) mohou prasknout a potenciálně uvolnit toxické látky. Abyste předešli takovým rizikům, zakryjte vzorek sterilním ručníkem nebo nad něj otočte sterilní trychtýř.

5.2.4 Skladování vzorků

Po otevření přeneste pomocí sterilní pipety nebo jiného vhodného nástroje alespoň 30 ml (g) obsahu do sterilní nádoby za aseptických podmínek. Skladujte v chladničce při teplotě od 2 °C do 5 °C. Tento vzorek může být

použita k dalšímu zkoušení v případě potřeby a může být zlikvidována po získání výsledků zkoušek pro danou šarži.

5.2.5 Senzorické zkoušky

V dobře osvětlené, čisté a bez zápachu zkušební místnosti přelijte obsah vzorku do bílé smaltované misky nebo skleněné nádoby (v případě tekutých vzorků). Poté posuďte vzhled produktu – jeho strukturu, tvar, barvu a vůni – pozorováním a čicháním. U vzorků obsahujících pevné látky je třeba na produkt zatlačit, aby se prověřily jeho vlastnosti a zjistily se případné známky znehodnocení. Současně je třeba zkontrolovat vnitřek obalu a zaznamenat výsledky.

5.2.6 Měření pH a analýza výsledků

5.2.6.1 Měření

Konzervované potraviny je třeba stanovit podle metody uvedené v GB5009.237. U ostatních potravin je třeba postupovat podle tohoto postupu.

5.2.6.2 Analýza výsledků

Porovnejte s kontrolními vzorky ze stejné šarže uchovávanými v chladničce, abyste zjistili, zda existují významné rozdíly. Rozdíl pH o 0,5 nebo více se považuje za významný rozdíl.

5.2.7 Barvení nátěrů a mikroskopické vyšetření

5.2.7.1 Příprava nátěrů

Z obsahu vzorku připravte nátěry. U vzorků obsahujících tekutinu použijte kultivační smyčku k přenesení tekutiny na mikroskopické sklíčko. Vzorky potravin v pevném stavu lze natírat přímo nebo před natřením zředit malým množstvím sterilního fyziologického roztoku. Nechte zaschnout a fixujte plamenem. U mastných potravinových vzorků nechte nátěr přirozeně zaschnout a fixujte plamenem. Poté omyjte odmašťovacím prostředkem, jako je xylen, a nechte přirozeně zaschnout.

5.2.7.2 Barvení a mikroskopické vyšetření

Nátěry z bodu 5.2.7.1 obarvit roztokem krystalové fialové, aby se dosáhlo monochromatického zbarvení. Po zaschnutí proveďte mikroskopické vyšetření a pozorujte alespoň pět zorných polí. Zaznamenejte morfologické znaky bakteriálních buněk a počet bakterií v každém zorném poli. Porovnejte s kontrolním vzorkem ze stejné šarže uchovávaným v chladničce, abyste zjistili, zda došlo k významné proliferaci mikroorganismů. Desetinásobný nebo větší nárůst počtu bakterií se považuje za významnou proliferaci.

5.3 Vyhodnocení výsledků a zpráva

5.3.1 Pokud po zkoušce skladování při zvýšené teplotě vzorek nevykazuje žádné bobtnání obalů (sklenic, lahví, kelímků atd.) ani únik, je třeba jej po ochlazení otevřít. Je třeba potvrdit, že nedošlo k množení mikroorganismů, a to sensorickým vyšetřením, měřením pH a mikroskopickým vyšetřením nátěrů. Vzorek lze poté považovat za sterilní z obchodního hlediska.

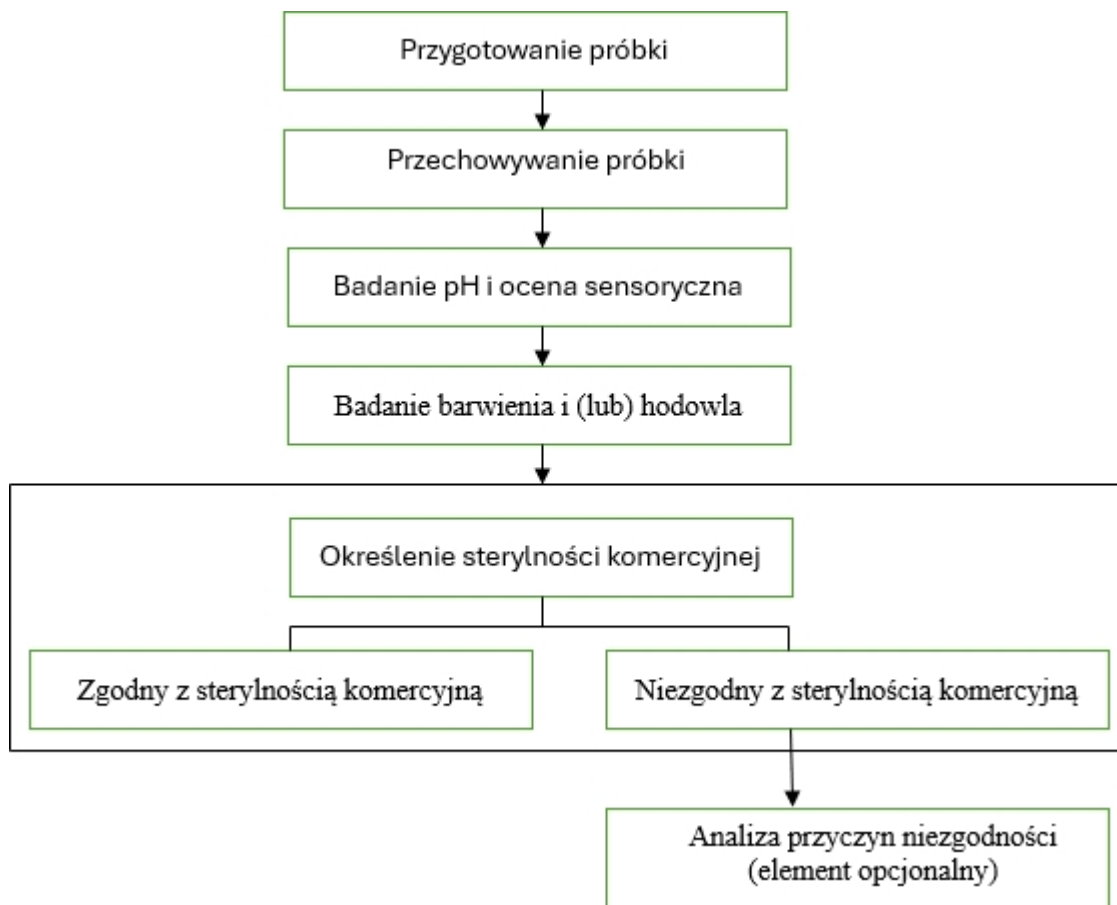
5.3.2 Pokud po zkoušce skladování při zvýšené teplotě vzorek (plechovka, sáček, láhev, kelímek atd.) nevykazuje vyboulení ani únik, ale po otevření – na základě organoleptického vyšetření, měření pH a mikroskopického vyšetření nátěru – byla potvrzena přítomnost známek množení mikroorganismů, vzorek se považuje za komerčně nesterilní (nedostatek komerční sterility).

5.3.3 Pokud vzorky vykazují nafouklé obaly (sáčky, láhve, kelímky atd.) s organoleptickými odchylkami nebo únikem při zkoušce při zvýšené teplotě, je třeba je přímo považovat za nekomerčně sterilní (nedostatek komerční sterility). V případě nutnosti ověření příčiny nafouklých obalů, odchylek v pH nebo sensorických odchylek či množení mikroorganismů lze uchované vzorky obsahu naočkovat a kultivovat v souladu s přílohou B a výsledky je třeba nahlásit.

6. Komerční testy sterility ve výrobě potravin

6.1 Postup komerčních testů sterility ve výrobě potravin

Postup komerčních testů sterility ve výrobě potravin je znázorněn na obrázku 2.



Obrázek 2: Postup komerčního testování sterility v odvětví výroby potravin

6.2 Postup kontroly

6.2.1 Příprava vzorků

Po dokončení výroby a zpracování potravin by výrobní podnik měl stanovit vhodný plán odběru vzorků a přijatelnou mez kvality (AQL) v souladu s charakteristikami produktu, kvalitativními cíli podniku, metodami sterilizace, specifikacemi, velikostí šarže a dalšími faktory, a to na základě příslušných národních norem.

Po odebrání vzorků je třeba je zkontrolovat a zaznamenat v souladu s cíli kontroly. Je třeba se ujistit, že vzorky mají normální vzhled, nejsou poškozené, nevykazují korozi (týká se pouze kovových nádob), úniky ani zjevné nesrovnalosti, jako jsou vyboulení nádob (sáčky, láhve, kelímky atd.).

6.2.2 Udržování teploty

Výrobci potravin mohou vypracovat protokoly pro udržování teploty vhodné pro kontrolu svých produktů s odkazem na tabulku 1.

Vzorky je třeba skladovat při stanovené teplotě v inkubátorech nebo komorách s konstantní teplotou v souladu s protokolem.

Během skladování je třeba provádět denní kontroly. Veškeré vyboulené

nádoby (sáčky, lahve, kelímky atd.) nebo úniky je třeba okamžitě odstranit, otevřít za účelem kontroly v souladu s bodem 6.2.3 a zaznamenat.

Tabulka 1 Doporučený časový a teplotní režim inkubace vzorků

Vlastnosti vzorku	Typ	Teplota (°C)	Doba (d)
Produkty s nízkou kyselostí, okyselené produkty	Tekuté potravinářské, jako jsou mléčné výrobky a nápoje	36±1	7
	Konzervy	36±1	10
	Potraviny s nízkou kyselostí skladované při teplotě nad 40 °C během plánovaného prodeje	55±1	6±1
Kyselé potraviny	Konzervy, nápoje	30±1	10
Poznámka: Přípustná odchylka teploty v inkubátorech s konstantní teplotou může činit ±2 °C.			

6.2.3 Otevírání nádob s potravinami

Nádoby je třeba otvírat v souladu s postupem uvedeným v bodě 5.2.3.

6.2.4 Skladování vzorků

Po otevření je třeba přenést alespoň 30 ml (g) obsahu do sterilní nádoby pomocí sterilní pipety nebo jiného vhodného nástroje za aseptických podmínek. Skladujte v chladničce při teplotě od 2 °C do 5 °C pro případné provedení dalších zkoušek v souladu s požadavky. Vzorek lze zlikvidovat po získání výsledků zkoušek pro danou šarži. Otevřenou nádobu se vzorkem je třeba řádně zabezpečit pro účely budoucí kontroly nádob.

6.2.5 Senzorické zkoušky

Provést zkoušku v souladu s postupy uvedenými v bodě 5.2.5.

6.2.6 Stanovení pH a analýza výsledků

Výrobci stanoví normální rozsah kontroly pH pro tuto kategorii výrobků na základě jejich vlastností. pH se stanoví v souladu s normou GB 5009.237 nebo příslušnými normami. Pokud hodnota pH překračuje normální rozsah kontroly, je třeba provést mikroskopické vyšetření s barvením.

6.2.7 Příprava nátěrů, barvení a mikroskopické vyšetření

6.2.7.1 Příprava nátěrů

Vzorky konzervovaných potravin, které jsou na základě výsledků senzorického vyšetření nebo vyšetření pH považovány za podezřelé, jakož i vzorky, u nichž je reakce pH během kažení nespolehlivá (např. maso, drůbež, ryby), je třeba podrobit barvení nátěrů a mikroskopickému vyšetření.

Z obsahu vzorku připravte nátěry. U vzorků obsahujících tekutinu použijte kultivační smyčku k přenesení tekutiny na mikroskopické sklíčko. Vzorky pevných potravin lze natírat přímo nebo před natíráním zředit malým množstvím sterilního fyziologického roztoku. Nechte zaschnout a fixujte plamenem. U nátěrů z tučných potravin nechte přirozeně zaschnout a

fixujte plamenem před omytím odmašťovacím prostředkem, jako je xylen, a nechte přirozeně zaschnout.

6.2.7.2 Barvení a mikroskopické vyšetření

Nátěry z bodu 6.2.7.1 obarvit roztokem krystalové fialové tak, aby se dosáhlo monochromatického zbarvení. Po zaschnutí vyšetřit pod mikroskopem a pozorovat alespoň pět zorných polí. Zaznamenat morfologické znaky bakteriálních buněk a počet bakterií v každém zorném poli.

Výrobci mohou stanovit kritéria pro určení významného množení mikroorganismů na základě vlastností produktu. Porovnejte s těmito kritérii nebo s normálními vzorky ze stejné šarže (např. ne nafouklé nádoby [sáčky, láhve, kelímky atd.], vzorky bez sensorických odchylek), abyste posoudili, zda dochází k významnému množení mikroorganismů.

6.2.8 Naočkování a kultivace

Během skladování mohou být vzorky vykazující nafouknutí obalů (sáčky, láhve, kelímky atd.), úniky nebo abnormální pH, sensorickou kvalitu nebo zkažení po otevření za účelem kontroly, jakož i další mikroskopické vyšetření prokazující abnormální počet bakterií, mohou být podrobeny mikrobiologickému kultivování a analýze anomálií v souladu s přílohou B.

6.3 Vyhodnocení výsledků a podávání zpráv

6.3.1 Pokud po zkoušce teplotního skladování a sensorické kontrole, zkoušce pH, mikroskopickém vyšetření s barvením nebo mikrobiologickém kultivování zůstávají nádoby se vzorky (plechovky, sáčky, láhve, kelímky atd.) neporušené a nevykazují úniky a zkouška potvrdí, že nedochází k množení mikroorganismů, bude vzorek nahlášen jako komerčně sterilní.

6.3.2 Pokud odebraný vzorek produktu nevykazuje po provedení zkoušky skladování při zvýšené teplotě žádné bobtnání (plechovky, sáčky, láhve, kelímky atd.) ani únik a sensorická zkouška, zkouška pH, mikroskopické vyšetření obarvených vzorků nebo mikrobiologická kultivace

potvrdí množení mikroorganismů, měla by být vzorek nahlášen jako komerčně nesterilní (nedostatek komerční sterility).

6.3.3 Pokud během zkoušky skladování při zvýšené teplotě vykazuje odebraný vzorek produktu vyboulení obalů (sáčků, lahví, kelímků atd.) spolu se sensorickými odchylkami nebo únikem, bude vzorek nahlášen jako komerčně nesterilní (nedostatek komerční sterility).

Příloha A Živná média a činidla

A.1 Glukózový bujón s bromkresolovou fialkou

A.1.1 Složky

Pepton		10,0 g
Hovězí extrakt		3,0 g
Glukóza		10,0 g
Chlorid sodný		5,0 g
Bromkresolová fialová etanolu)	0,04 g (nebo 2,0 ml 1,6% roztoku	
Destilovaná voda		1000,0 ml

A.1.2 Příprava

Zahřejte a míchejte všechny složky s výjimkou bromkresolového fialového, dokud se nerozpustí. Upravte pH na hodnotu $7,0 \pm 0,2$. Přidejte bromkresolový fialový.

Nalijte do zkumavek vybavených malými plnicími trubičkami, po 10 ml do každé zkumavky. Sterilizujte v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 10 minut.

A.2 Masový vývar

A.2.1 Složky

Hovězí extrakt		1000,0 ml
Pepton		30,0 g
Kvasnicový extrakt		5,0 g
Glukóza		3,0 g
Dihydrogenfosforečnan sodný		5,0 g
Rozpustný škrob		2,0 g
Zbytky mletého masa		podle potřeby

A.2.2 Příprava

A.2.2.1 Odvážit 500 g čerstvého mletého hovězího masa zbaveného tuku a pojivové tkáně. Přidat 1000 ml destilované vody a 25,0 ml 1 mol/l roztoku hydroxidu sodného. Míchejte a vařte po dobu 15 minut, nechte důkladně vychladnout, odstraňte tuk z povrchu, vyčerte, přefiltrujte a doplňte vodou na objem 1000 ml, abyste získali hovězí vývar. Přidejte všechny složky z bodu A.2.1 s výjimkou zbytků mletého masa a upravte pH na $7,8 \pm 0,2$.

A.2.2.2 Zbytky mletého masa omyjte vodou a nechte na vzduchu vyschnout do polosuchého stavu. Rozdělte je na porce o rozměrech 15 mm × 150 mm do zkumavek o výšce 2 cm až 3 cm. Do každé zkumavky přidejte 0,1 g až 0,2 g práškového redukovaného železa nebo malé množství železných pilin. Do každé zkumavky nalijte tekuté živné médium připravené v bodě A.2.2.1 tak, aby bylo naplněno asi 1 cm nad povrch zbytků masa. Na povrch živného média naneste vrstvu roztavené vazelíny nebo tekutého parafínu o tloušťce 0,3–0,4 cm. Sterilizujte při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

A.3 Živný agar

A.3.1 Složky

Pepton	10,0 g
Hovězí extrakt	3,0 g
Chlorid sodný	5,0 g
Agar	15,0 g ~ 20,0 g
Destilovaná voda	1000,0 ml

A.3.2 Příprava

Všechny složky kromě agaru rozpustíte v destilované vodě. Přidejte přibližně 2 ml 15% roztoku hydroxidu sodného a upravte pH na 7,2–7,4.

Přidat agar a zahřát k varu, aby se rozpustil. Nalít do kádinek nebo zkumavek o rozměrech 13 mm × 130 mm. Sterilizovat v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

A.4 Kyselý bujón

A.4.1 Složky

Mnohonásobný pepton	5,0 g
Kvasnicový extrakt	5,0 g
Glukóza	5,0 g
Dihydrogenfosforečnan draselný	5,0 g
Destilovaná voda	1000,0 ml

A.4.2 Příprava

Složky uvedené v bodě A.4.1 zahřejte a míchejte, dokud se nerozpustí. Upravte pH na hodnotu $5,0 \pm 0,2$ a sterilizujte v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

A.5 Vývar s extraktem ze sladu

A.5.1 Složky

Sladový extrakt	15,0 g
Destilovaná voda	1000,0 ml

A.5.2 Příprava

Sladový extrakt důkladně rozpustíte v destilované vodě. Filtrujte přes filtrační papír, upravte pH na $4,7 \pm 0,2$, rozdělte na porce a sterilizujte při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

A.6 Sabouraudův agar s dextrózou

A.6.1 Složky

Pepton	10,0 g
Agar	15,0 g

Pracovní překlad

Glukóza	40,0 g
Destilovaná voda	1000,0 ml

A.6.2 Příprava

Všechny složky rozpustit v destilované vodě, zahřát k varu, rozlít do baňek, upravit pH na $5,6 \pm 0,2$ a sterilizovat v autoklávu při teplotě $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut.

A.7 Agar s játry a telecím masem

A.7.1 Složení

Jaterní extrakt	50,0 g
Telecí extrakt	500,0 g
Pepton ze srdečního svalu	20,0 g
Nový pepton	1,3 g
Trypsinový pepton	1,3 g
Glukóza	5,0 g
Rozpustný škrob	10,0 g
Plazmatická kasein (nebo kaseinát sodný)	2,0 g
Chlorid sodný	5,0 g
Dusičnan sodný	2,0 g
Želatina	20,0 g
Agar	15,0 g
Destilovaná voda	1000,0 ml

A.7.2 Příprava

Všechny složky smíchejte v destilované vodě. Upravte pH na hodnotu $7,3 \pm 0,2$ a poté sterilizujte při teplotě $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut.

A.8 Barvicí roztok s krystalovou fialkou

A.8.1 Složky

Krystalová fialová	1,0 g
95% ethanol	20,0 ml
1% vodný roztok amonného šťavelanu	80,0 ml

A.8.2 Příprava

1,0 g krystalické fialové barvy zcela rozpustíte v 95% ethanolu a poté smíchejte s 1% roztokem amonného šťavelanu.

A.8.3 Metoda barvení

Nátěry zpevněte nad plamenem alkoholového hořáku. Kapku po kapce přidávejte barvivo krystalové fialové, barvěte po dobu 1 minuty a poté opláchněte vodou.

A.9 Roztoky pro barvení metodou Grama

A.9.1 Roztok barviva krystalické fialové podle A.8.

A.9.2 Gramův jodový roztok

A.9.2.1 Složky

Jód	1,0 g
Jodid draselný	2,0 g
Destilovaná voda	300,0 ml

A.9.2.2 Příprava

Nejprve smíchejte 1,0 g jódu s 2,0 g jodidu draselného. Přidejte malé množství destilované vody a intenzivně protřepávejte, dokud se látka zcela nerozpustí. Poté přidejte destilovanou vodu tak, aby se dosáhl objem 300 ml.

A.9.3 Kontrastní roztok safraninu

A.9.3.1 Složky

Safranin (沙黄)	0,25 g
95% ethanol	10,0 ml
Destilovaná voda	90,0 ml

A.9.3.2 Způsob přípravy

0,25 g safraninu rozpustíte v ethanolu a poté zředíte destilovanou vodou.

A.9.4 Metoda barvení

A.9.4.1 Nátěr fixujte nad plamenem, po kapkách přidejte krystalovou fialovou barvivo, barvěte 1 minutu a opláchněte vodou.

A.9.4.2 Kapku po kapce přidejte Gramův jodový roztok, nechte působit 1 minutu a poté opláchněte vodou.

A.9.4.3 Přidejte 95% ethanol k odbarvení na 15–30 sekund, dokud nebude barvivo smyto; vyhněte se nadměrnému odbarvení. Opláchněte vodou.

A.9.4.4 Kapku po kapce přidejte kontrastní roztok, kontrastujte po dobu 1 minuty, opláchněte vodou, nechte zaschnout a poté vyšetřete pod mikroskopem.

A.10 Sterilní fyziologický roztok

A.10.1 Složení

Chlorid sodný	8,5 g
Destilovaná voda	1000,0 ml

A.10.2 Příprava

Odvážit 8,5 g chloridu sodného a rozpustit v 1000 ml destilované vody. Autoklávovat při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Příloha B

Odebrání vzorků, inkubace a analýza odchylek

B.1 Očkování a inkubace produktů s nízkou kyselostí

B.1.1 U vzorků potravin s nízkou kyselostí se na každý vzorek naočkují čtyři zkumavky s masovým bujónem, který byl zahřát na teplotu 100 °C a rychle ochlazen na pokojovou teplotu. Současně se naočkují čtyři zkumavky s glukózovým bujónem s bromkresolovou fialkou. Do každé zkumavky se naočí 1 ml (g) až 2 ml (g) vzorku (1 ml až 2 ml u tekutých vzorků, 1 g až 2 g u pevných vzorků; v případě přítomnosti obou forem se použije polovina z každé z nich). Podmínky inkubace jsou podrobně popsány v tabulce B.1.

Tabulka B.1 — Živná média používaná k kultivaci produktů s nízkou kyselostí (pH > 4,6):
masové médium a glukózový bujón s bromkresolovou fialí

Kultivační médium	Počet zkumavek	Teplota inkubace (°C)	Doba inkubace (h)
Masové médium	2	36±1	96–120
Masové médium	2	55±1	24–72
Glukózový bujón s bromkresolovou fialkou	2	55±1	24–48
Glukózový bujón s bromkresolovou fialovou	2	36±1	96–120

B.1.2 Po inkubaci za podmínek uvedených v tabulce B.1 je třeba zaznamenat, zda v každé zkumavce došlo k růstu mikroorganismů. Pokud nebyl pozorován růst mikroorganismů, je třeba tento výsledek zaznamenat a zkumavky zlikvidovat.

B.1.3 Pokud se vyskytuje růst mikroorganismů, připravte tekutý nátěr pomocí kultivační smyčky a vyšetřete jej pod mikroskopem po obarvení Gramovou metodou. V případě, že jsou v zkumavkách s glukózovým bujónem s bromkresolovou fialkou pozorovány různé morfotypy mikroorganismů nebo výlučně koky či houby, je třeba to zaznamenat a vzorky vyřadit. Pokud v živném médiu s masem nejsou přítomny tyčinky a kultury obsahují koky, kvasinky, plísně nebo jejich směsi, je třeba to zaznamenat a zkumavky vyhodit.

U zbývajících pozitivních zkumavek s glukózovým bujónem s bromkresolovou fialkou a živným médiem s masem je třeba samostatně provést povrchový výsev klikatou metodou na dvě agarové destičky: jednu s agarem s játry a telecím masem nebo s nutričním agarem pro aerobní kultivaci a druhou pro anaerobní kultivaci. Postup kultivace je znázorněn na obrázku B.1.

B.1.4 Je třeba odebrat jednu kolonii z aerobní kultury a naočkovat ji na šikmý živný agar za účelem pozdějšího barvení Gramovou metodou a mikroskopického pozorování. Z anaerobní kultury je třeba odebrat jednu kolonii, připravit nátěr a provést barvení Gramovou metodou pro mikroskopické pozorování. Jednotlivé

kolonie z aerobní a anaerobní kultury je poté nutné naočkovat do masového média (masové médium s kousky masa) za účelem získání čistých kultur.

B.1.5 Připravte nátěry z kultivací na živném agaru a anaerobním agaru s hovězím bujónem pro mikroskopické vyšetření.

B.1.6 Naočkejte aerobní kultury z čistých kultur na agarové destičky s hovězí játrou nebo na živné agarové destičky za účelem anaerobního kultivování. Naočkejte anaerobní kultury z čistých kultur na agarové destičky s hovězí játrou nebo na živné agarové destičky za účelem aerobního kultivování. To umožňuje odlišit fakultativní anaeroby.

B.1.7 V případě nutnosti provést test na přítomnost neurotoxinu *Clostridium botulinum* naočkejte typické kolonie na masový bujón za účelem získání čisté kultury. Inkubujte při teplotě 36 °C po dobu 5 dnů a poté proveďte test na přítomnost neurotoxinu v souladu s GB 4789.12.

B.2 Očkování a inkubace kyselých a okyselených produktů

B.2.1 Na každou vzorku naočkejte čtyři zkumavky s kyselým bujónem a dvě zkumavky s bujónem ze sladového extraktu. Do každé zkumavky naočkejte 1 ml (g) až 2 ml (g) vzorku (1 ml až 2 ml u tekutých vzorků, 1 g až 2 g u pevných vzorků; v případě výskytu obou forem použijte polovinu z každé z nich). Podmínky kultivace jsou uvedeny v tabulce B.2.

Tabulka B.2 – Živná média používaná k naočkování kyselých a okyselených produktů: kyselý bujón a bujón s extraktem ze sladu

Kultivační médium	Počet zkumavek	Teplota inkubace (°C)	Doba inkubace (h)
Kyselý bujón	2	55±1	48
Kyselý vývar	2	30±1	96
Vývar z sladovým sladovým	2	30±1	96

B.2.2 Po inkubaci za podmínek uvedených v tabulce B.2 je třeba zaznamenat, zda v každé zkumavce došlo k růstu mikroorganismů. Pokud nebyl pozorován růst mikroorganismů, je třeba tento výsledek zaznamenat a zkumavky zlikvidovat.

B.2.3 U zkumavek, v nichž byl zaznamenán růst mikroorganismů, je třeba připravit přímý nátěr z inkubovaného obsahu, provést barvení podle Grama a vyšetřit pod mikroskopem. Je třeba zaznamenat pozorované mikroorganismy.

B.2.4 V případě výskytu růstu mikroorganismů v okyseleném masovém bujónu nebo bujónu z sladového extraktu při teplotě 30 °C je třeba každou zkumavku s pozitivním výsledkem naočkovat na dvě agarové destičky s živnou směsí nebo agarové destičky s živnou směsí Sabouraud s dextrózou: jednu pro aerobní kultivaci a druhou pro anaerobní kultivaci.

B.2.5 V případě výskytu růstu mikroorganismů v okyseleném masovém bujónu při teplotě 55 °C naočkejte každou zkumavku s pozitivním výsledkem na dvě agarové destičky s živnou půdou: jednu pro aerobní kultivaci a druhou pro anaerobní kultivaci.

Na destičkách vykazujících růst proveďte barvení, přípravu nátěrů a mikroskopické vyšetření a zaznamenejte pozorovanou morfologii mikroorganismů.

Postup kultivace je znázorněn na obrázku B.2.

B.2.6. Vyberte jednu kolonii z agarové destičky s živným médiem nebo z Sabouraudovy agarové destičky s dextrózou, inkubované aerobně při teplotě 30 °C. Naočkejte na agarové médium pro následné barvení podle Grama a mikroskopické vyšetření. Současně naočkejte do okyseleného bujónu nebo bujónu s extraktem sladu za účelem získání čisté kultury.

Vyberte jednu kolonii z agarových destiček s živnou směsí nebo Sabouraudových agarových destiček s dextrózou, kultivovaných anaerobně při teplotě 30 °C. Naočkejte do okyseleného bujónu nebo bujónu s extraktem ze sladu za účelem získání čisté kultury.

Vyberte jednu kolonii z agarových destiček s živným médiem kultivovaných aerobně při teplotě 55 °C. Naočkejte na agarové médium za účelem následného barvení metodou Grama a mikroskopického vyšetření. Současně naočkejte okyselený masový vývar za účelem získání čisté kultury.

Vyberte jednu kolonii z agarových destiček s živným médiem kultivovaných anaerobně při teplotě 55 °C a naočkejte ji do okyseleného masového bujónu za účelem získání čisté kultury.

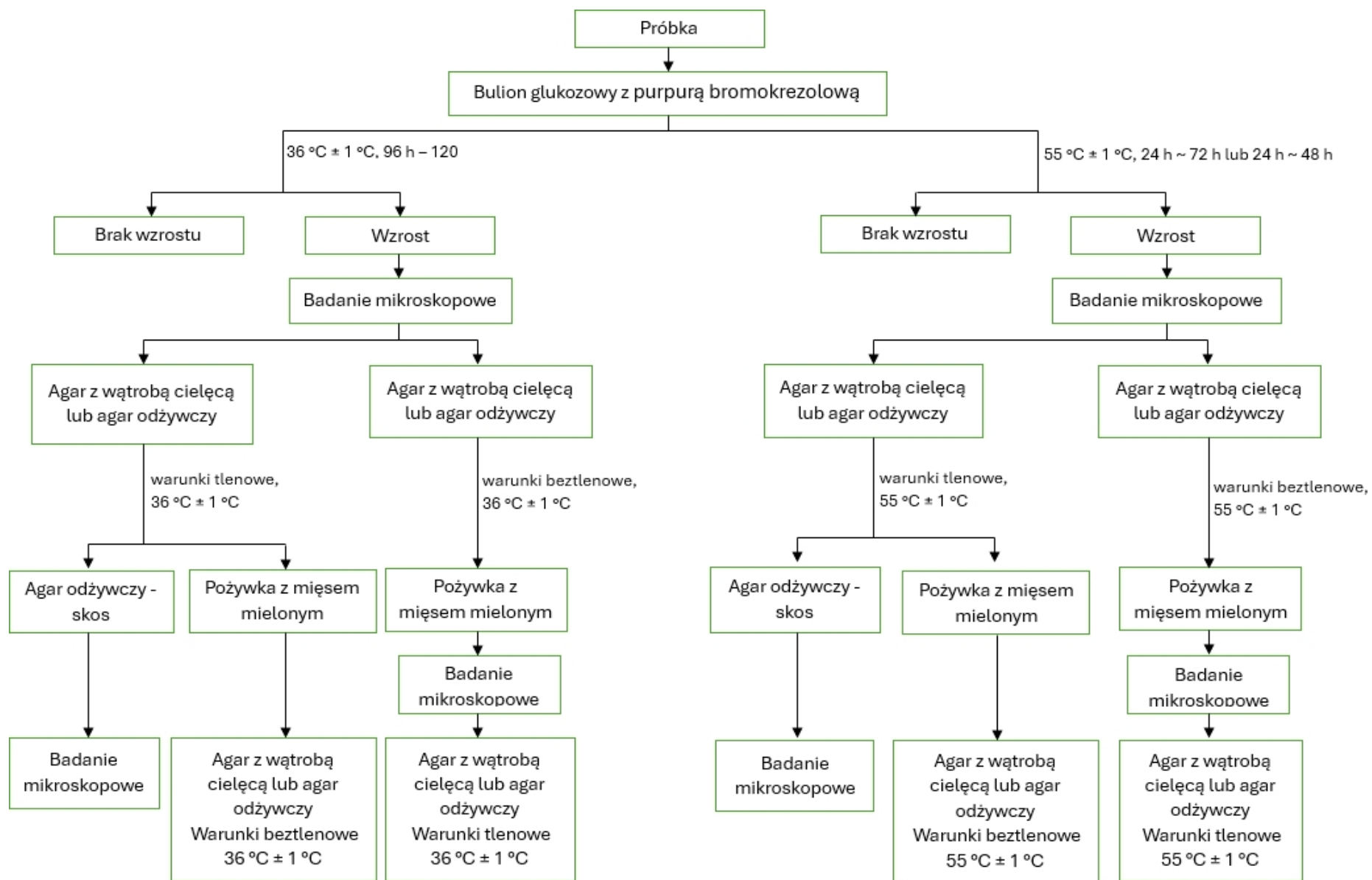
B.2.7 Připravte nátěry z kultivací na živném agaru pro mikroskopické vyšetření. Připravte nátěry z okyselených kultur masového bujónu nebo bujónu ze sladového extraktu kultivovaných anaerobně při teplotě 30 °C a z okyselených kultur masového bujónu inkubovaných anaerobně při teplotě 55 °C pro mikroskopické vyšetření nátěrů.

B.2.8 Čistou kulturu získanou z aerobní kultivace při 30 °C je třeba naočkovat na destičky s živným agarem nebo Sabourova agaru s glukózou a inkubovat v anaerobních podmínkách.

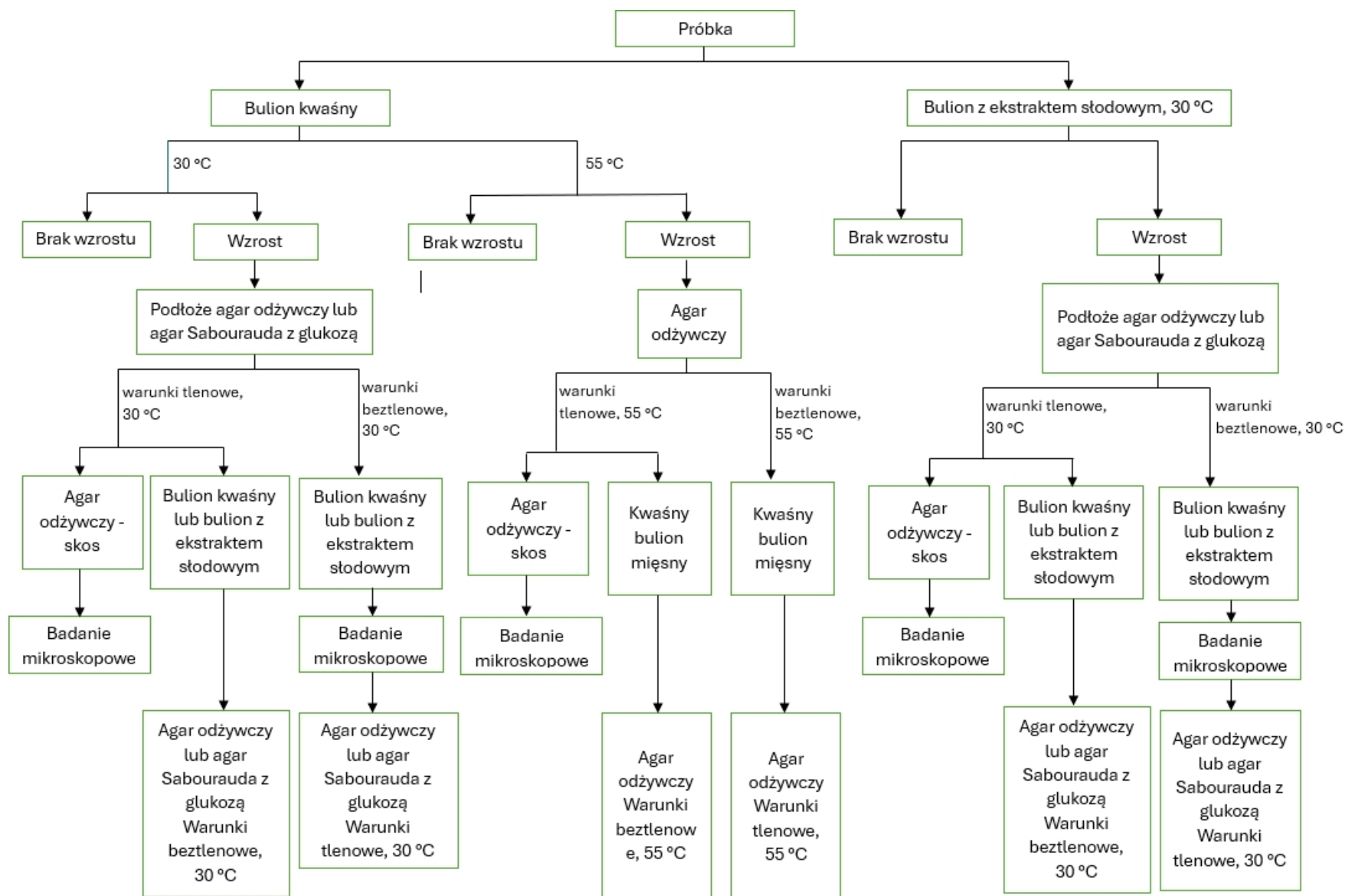
Čistou kulturu získanou z anaerobní kultivace při 30 °C je třeba naočkovat na destičky s živným agarem nebo Sabouraudovým agarem s glukózou a inkubovat za aerobních podmínek. Čistou kulturu získanou z aerobní kultivace při 55 °C je třeba naočkovat na destičky s živným agarem a inkubovat v anaerobních podmínkách.

Čistou kulturu získanou z anaerobní kultivace při 55 °C je třeba naočkovat na destičky s živným agarem a inkubovat za aerobních podmínek.

Na základě výsledků těchto kultivací se určí, zda je zkoumaný kmen fakultativně anaerobní bakterií.



Obrázek B.1 – Postup odběru vzorků a kultivace potravin s nízkým obsahem kyselin



Obrázek B.2 — Postup při odběru vzorků a kultivaci kyselých a okyselených potravin

B.3 Analýza výsledků

B.3.1 Pokud ve vzorku odebraném z nabobtnalé nádoby nebyl zjištěn růst mikroorganismů, mohlo být bobtnání způsobeno vodíkem vzniklým v důsledku reakce mezi obsahem a kovovou nádobou. Množství vzniklého vodíku závisí na době skladování a podmínkách. Nadměrné naplnění může také způsobit mírné nafouknutí, což lze zjistit vážením, aby se ověřilo, zda bylo příčinou nadměrné naplnění.

Pozorování smíšené bakteriální flóry v přímých nátěrech, ale absence růstu po kultivaci, naznačuje zkažení produktu před sterilizací. Je to způsobeno růstem bakterií před uzavřením nádoby, což vede k abnormálnímu pH produktu, zápachu a morfologii tkáně.

B.3.2 Jsou-li nádoby na potraviny správně uzavřeny a za podmínek kultivace při teplotě 36 °C se vyvíjejí pouze bakterie rodu *Bacillus*, jejichž odolnost vůči teplu nepřesahuje odolnost *Clostridium botulinum*, naznačuje to nedostatečnou sterilizaci během výroby.

B.3.3 Smíšené kolonie složené z tyčinek, koků a hub naznačují únik z nádoby na potraviny. Může to také vyplývat z nedostatečné sterilizace, ale v takových případech bude tempo růstu celé šarže výrazně zvýšené.

B.3.4 Pozorování tvorby kyseliny a plynu v glukózovém bujónu s bromkresolovou fialkou při teplotě 36 °C nebo 55 °C. Tvorba kyseliny naznačuje rozvoj mezofilních mikroorganismů, jako jsou kyselinu snášející druhy *Bacillus*, nebo termofilních mikroorganismů, jako je *Bacillus tearothermophilus*.

Růst bakterií a tvorba plynů při teplotě 55 °C v masovém bujónu, doprovázená zápachem, naznačuje kažení způsobené termofilními anaerobními bakteriemi rodu *Clostridium*.

Růst a tvorba páchnoucích plynů při teplotě 36 °C v masovém vývaru, s pod mikroskopem viditelnými spórami, naznačuje, že kažení může být způsobeno *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes* nebo *Clostridium perfringens*. V případě potřeby lze provést další testy na přítomnost botulotoxinu.

B.3.5 Kažení kyselých potravin je obvykle způsobeno bakteriemi rodu *Lactobacillus* a kvasinkami, které netvoří spory. Kažení bakteriemi rodu *Bacillus* se obvykle nevyskytuje při pH nižším než 4,6. Zkažený rajčatový kečup nebo výrobky z rajčatové šťávy však nevykazují nadýmání, ale vydávají zápach, s poklesem pH nebo bez něj, což lze obvykle připsat aerobním bakteriím rodu *Bacillus*.

B.3.6 Některé konzervované produkty mohou obsahovat spory termofilních bakterií v důsledku nedostatečné intenzity sterilizace nebo nestandardních postupů chlazení. Tyto spóry zůstávají za normálních skladovacích podmínek v dormantním stavu, ale množí se, jsou-li produkty skladovány při zvýšené teplotě (50–55 °C), což vede ke zkažení. Termofilní kyselotolerantní druhy *Bacillus* a termofilní *Bacillus cereus* způsobují kažení kyselých a nízko kyselých potravin, aniž by docházelo k nafukování obalů. Kultivace při teplotě 55 °C nemění vzhled obalu, ale způsobuje vznik nepříjemného zápachu, s poklesem pH nebo bez něj.

C. pasteurianum je termofilní anaerob, který může způsobit nafouknutí a nepříjemný zápach produktu.

Termofilní anaerobní bakterie mohou také produkovat plyn. Rychlé množení bakterií po počátečním růstu může ztížit určení, zda je nafouknutí způsobeno působením vodíku nebo plynu produkovaného termofilními anaerobními bakteriemi.

Chemický rozklad způsobuje vznik oxidu uhličitého, zejména v koncentrovaných potravinách obsahujících cukry a některé kyseliny, jako je rajčatový koncentrát, melasa, sladké náplně a konzervované ovoce s vysokým obsahem cukru. Tento rozklad se zrychluje s rostoucí teplotou.

B.3.7 U asepticky plněných a běžných produktů je třeba přímé nátěry izolující jakékoli mikroorganismy považovat za laboratorní kontaminaci. Pro potvrzení kontaminace je třeba izolované živé mikroorganismy za aseptických podmínek naočkovat do jiného normálního kontrolního vzorku, uzavřít jej a inkubovat při teplotě 36 °C po dobu 14 dnů. V případě, že dojde k nafouknutí nebo zhoršení kvality produktu, je nepravděpodobné, že by tyto mikroorganismy pocházely z původního vzorku. Pokud vzorek zůstane plochý, je třeba balení otevřít za aseptických podmínek a opakovat výše popsany postup kultivace. Pokud se znovu zjistí stejný mikroorganismus a produkt zůstane normální, považuje se za komerčně sterilní, protože tento mikroorganismus se během běžné přepravy a skladování nerozmnožuje.

B.3.8 Pokud se samotná potravina zakalí, nemusí kultivace v bujónu poskytnout jednoznačné výsledky. V takových případech je nutná další kultivace, aby se zjistilo, zda dochází k růstu mikroorganismů.