



Certifikovaná metodika TA03010546 CM 1

Metodika testování mikrobiologických a antimikrobiálních vlastností aktivních obalů s antimikrobiální vrstvou

Cíl certifikované metodiky:

Cílem certifikované metodiky TA03010546 CM1 je otestovat mikrobiologické vlastnosti (kontaminace bakteriemi, kvasinkami a plísněmi) a antimikrobiální vlastnosti aktivních obalů s antimikrobiální vrstvou obsahující antimikrobiální látky, jako jsou např. bakteriociny, nebo živé kultury produkující antimikrobiální metabolity. Tato metodika slouží k objektivnímu posouzení mikrobiologické kvality a účinnosti aktivních obalů pro balení potravin a dalších produktů, u kterých je žádoucí eliminovat mikrobiologickou kontaminaci.

Náplň certifikované uplatněné metodiky:

Náplní certifikované metodiky TA03010546 CM1 je implementace výsledků získaných v rámci řešení projektu TA ČR TA03010546 do prostředí vývoje, výroby a průmyslového využití aktivních obalů a do zkušebních laboratoří.

Certifikovaná metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu TA03010546 v programu ALFA s finanční podporou TA ČR.

Zpracovali: Irena Němečková (60 %), Alexandra Šalaková (10 %), Jitka Peroutková (10 %), Jana Smolová (10 %) Petr Roubal (10 %), Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Říjen 2016

Struktura certifikované metodiky:

- I. Cíl metodiky
- II. Srovnání novosti postupů
- III. Vlastní popis metodiky
- IV. Popis uplatnění metodiky
- V. Ekonomické aspekty
- VI. Seznam použité související metodiky
- VII. Seznam publikací, které metodice předcházely
- VIII. Přílohy, dokumenty a doklady

Nejčastěji používané zkratky:

A.	<i>Aspergillus</i>
ATCC	American Type Culture Collection
C.	<i>Clostridium</i>
CCM	Czech Collection of Microorganisms, Česká sbírka mikroorganismů
DG18	Dichloran (18 % hm.) glycerolový agar
Ent.	<i>Enterococcus</i>
GKCH	Agar s glukózou, kvasničným extraktem a chloramfenikolem
GTK	Agar s glukózou, tryptonem a kvasničným extraktem
KTJ	Kolonie tvořící jednotka
Lbc.	<i>Lactobacillus</i>
Lcc.	<i>Lactococcus</i>
M.	<i>Micrococcus</i>
M17	M17 agar podle Terzaghiho
MRS	DeMan-Rogosa-Sharpe agar
MSFR	Mannitol salt phenol-red agar
P.	<i>Penicillium</i>
PCA	Plate count agar
RCMč	Reinforced clostridial medium s neutrální červení
S.	<i>Staphylococcus</i>
SB	Agar podle Slanetze a Bartleyové

I. Cíl metodiky

Cílem certifikované metodiky TA03010546 CM1 je otestovat mikrobiologické vlastnosti (protektivní mikroorganismy, kontaminace bakteriemi, kvasinkami a plísněmi) a antimikrobiální vlastnosti aktivních obalů s antimikrobiální vrstvou obsahující antimikrobiální látky, jako jsou např. bakteriociny, nebo živé kultury produkující antimikrobiální metabolity. Tato metodika slouží k objektivnímu posouzení mikrobiologické kvality a účinnosti aktivních obalů pro balení potravin a dalších produktů, u kterých je žádoucí eliminovat mikrobiologickou kontaminaci.

II. Srovnání novosti postupů

Jedním z trendů posledních let je v souvislosti s rostoucím důrazem na mikrobiologickou bezpečnost potravin, prevenci kažení a minimalizaci používání přídatných látek do potravin výzkum, vývoj, průmyslová výroba a aplikace antimikrobiálně aktivních obalů. Namísto směšování antimikrobiálních látek s potravinou jsou tyto látky zakomponovány do obalů, což jim umožňuje působit na povrchu zabalené potraviny, kde se mnohdy nežádoucí růst mikroorganismů odehrává. Systémy antimikrobiálního balení zahrnují např. vložení sáčku s aktivním obsahem do balení, dispergování bioaktivních látek ve filmu naneseném na obalové fólii, využití antimikrobiálních makromolekul s filmotvornými vlastnostmi a další (Coma, 2008).

Antimikrobiální systémy zahrnují např. nisin, chitosan, sorban draselný, zeolity funkcionalizované stříbrem (Soysal a kol., 2015), stříbrné nanočástice (Azlin-Hasim a kol., 2015), esenciální oleje (Severino a kol., 2015), bakteriofágy (Gouvea a kol., 2015, Lone a kol., 2016), imobilizované enzymy, jako např. glukosa-oxidasa nebo lysozym (Hanušová a kol., 2013), popř. živé bakteriocin-produkující kultury dle užitého vzoru č. 28904 (2015) (Němečková a kol., 2015). Pro balení sýrů se mohou uplatnit např. obaly s natamycinem a nisinem (Hanušová a kol., 2010).

Pro hodnocení chemických parametrů potravinářských obalů existují detailní předpisy, např. Vyhláška 38/2001 nebo Nařízení komise (EU) 10/2011 ve znění pozdějších předpisů. Tyto předpisy se zabývají jak organickými, tak anorganickými látkami použitými pro výrobu obalů a rizikem migrace těchto látek do potravin, které v analytických postupech bývají modelovány vodnými výluhy a zkušebními kapalinami, tzv. simulanty. Obecné požadavky na aktivní a inteligentní materiály jsou pak definovány Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1935/2004, nicméně konkrétní požadavky na mikrobiologické a antimikrobiální vlastnosti aktivních obalů v legislativě dosud chybějí.

Antimikrobiální vlastnosti obalů s antimikrobiálními látkami v aktivní vrstvě byly dosud hodnoceny difuzní agarovou metodou v různém uspořádání pro stanovení migračních koeficientů (např. Hanušová a kol., 2010, Hanušová a kol., 2013) s využitím různých kmenů z pracovních sbírek jakožto indikátorových mikroorganismů. Nicméně dosud nebyla věnována pozornost výběru indikátorových mikroorganismů, které by byly široce dostupné prostřednictvím oficiálních sbírek a zároveň byly dostatečně citlivé a vykazovaly za podmínek metody dobré růstové vlastnosti. Vzhledem k tomu, že se antimikrobiální obaly obsahující živou antimikrobiální kulturu objevily poprvé v užitém vzoru č. 28904 (2015) (Němečková a kol., 2015), metoda pro hodnocení účinnosti těchto obalů dosud nebyla publikována.

Tato metodika reaguje na současný prudký vývoj v oblasti aktivních obalů a poskytuje nástroj pro jejich objektivní hodnocení, který dosud chyběl.

III. Vlastní popis metodiky

Živné půdy

Živné půdy se připravují a uchovávají v souladu s ČSN EN ISO 11133 (2014). Pro stanovení celkového počtu mikroorganismů se používá Plate count agar (PCA) nebo agar s glukózou, tryptonem a kvasničným extraktem (GTK), pro stanovení kvasinek a plísní dichloran (18 % hm.) glycerolový agar (DG18), pro stanovení mezofilních mléčných koků M17 agar podle Terzaghiho, pro stanovení enterokoků agar podle Slanetze a Bartleyové (SB) a pro stanovení laktobacilů DeMan-Rogosa-Sharpe agar (MRS) pH 5,7.

Pro posouzení antimikrobiálního účinku vůči *Clostridium sporogenes* se používá agar Reinforced clostridial medium s neutrální červení (RCMč), vůči *Micrococcus luteus* PCA nebo GTK, vůči *Staphylococcus aureus* Mannitol salt phenol-red agar (MSFR) a vůči plísním agar s glukózou, kvasničným extraktem a chloramfenikolem (GKCH).

Plate count agar (PCA):

pepton z kaseinu	5,0 g
kvasničný extrakt	2,5 g
D-glukóza	1,0 g
agar	9,0 – 18,0 g
destilovaná voda	1 000 ml

Sterilace v autoklávu při 121 °C/15 min, pH po sterilaci $7,0 \pm 0,2$ při 25 °C.

Agar s glukózou, tryptonem a kvasničným extraktem (GTK):

trypton	5,0 g
kvasničný extrakt	2,5 g
D-glukóza	1,0 g
agar	10,0 až 18,0 g
destilovaná voda	1 000 ml

Sterilace v autoklávu při 121 °C/15 min, pH po sterilaci $7,0 \pm 0,2$ při 25 °C.

Dichloran (18 % hm.) glycerolový agar (DG18):

pepton z kaseinu	5,0 g
D-glukóza	10,0 g
dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4	1,0 g
síran hořečnatý $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5 g
dichloran (2,6-dichloro-4-nitroanilin)	0,002 g
agar	12,0 – 15,0 g
glycerol bezvodý	220 g
chloramfenikol	0,1 g
destilovaná voda	1 000 ml

Sterilace v autoklávu při 121 °C/15 min, pH po sterilaci $5,6 \pm 0,2$ při 25 °C.

M17 agar podle Terzaghiho (M17):

trypton	2,5 g
pepton z masa	2,5 g
sójový pepton	5,0 g
masový extrakt	5,0 g
kvasničný extrakt	2,5 g
laktóza monohdrát	5,0 g
kyselina askorbová	0,5 g
síran hořčnatý MgSO ₄	0,25 g
glycerofosfát sodný	19,0 g
agar	10,0 – 15,0 g
destilovaná voda	1 000 ml

Sterilace v autoklávu při 121 °C/15 min, pH po sterilaci 7,2 ± 0,2 při 25 °C.

Agar podle Slanetze a Bartleyové (SB):

kvasničný extrakt	5,0 g
tryptosa	20 g
glukóza	2,0 g
hydrogenfosforečnan draselný K ₂ HPO ₄	4,0 g
azid sodný	0,4 g
tetrazolium chlorid	0,1 g
agar	8,0 – 12,0 g
destilovaná voda	1 000 ml

Sterilace v autoklávu při 121 °C/15 min, pH po sterilaci 7,2 ± 0,2 při 25 °C.

DeMan-Rogosa-Sharpe agar (MRS):

pepton	10,0 g
kvasničný extrakt	4,0 g
glukóza	20,0 g
hydrogenfosforečnan draselný K ₂ HPO ₄	2,0 g
masový extrakt	8,0 g
acetát sodný CH ₃ COONa	5,0 g
citrát amonný	2,0 g
síran hořčnatý MgSO ₄	0,2 g
síran manganatý MnSO ₄	0,04 g
Twen 80	1,0 g
agar	12,0 – 16,0 g
destilovaná voda	1 000 ml

Sterilace v autoklávu při 121 °C/15 min, pH po sterilaci 5,7 ± 0,2 při 25 °C.

Reinforced clostridial medium s neutrální červení (RCMč):

kvasničný extrakt	3,0 g
masový extrakt	10,0 g
pepton	10,0 g
D-glukóza	5,0 g
rozpustný škrob	1,0 g
chlorid sodný NaCl	5,0 g
octan sodný CH ₃ COONa	3,0 g
L-cystein hydrochlorid	0,5 g
agar	12,0 – 18,0 g
roztok neutrální červení	10 ml
destilovaná voda	1000 ml

Roztok neutrální červení se připraví z 0,5 g neutrální červení rozpuštěného v 95 ml 60% etanolu.

Sterilace v autoklávu při 121 °C/15 min, pH po sterilaci $6,8 \pm 0,2$ při 25 °C.

Mannitol salt phenol-red agar (MSFR):

masový extrakt	1,0 g
pepton z kaseinu	5,0 g
masový pepton	5,0 g
chlorid sodný NaCl	75,0 g
D-mannitol	10,0 g
fenolová červeň	0,025 g
agar	12,0 – 18,0 g
destilovaná voda	1 000 ml

Sterilace v autoklávu při 121 °C/15 min, pH po sterilaci $7,4 \pm 0,2$ při 25 °C.

Agar s glukózou, kvasničným extraktem a chloramfenikolem (GKCH):

kvasničný extrakt	5,0 g
D-glukóza	20,0 g
chloramfenikol	0,1 g
agar	12,0 – 15,0 g
destilovaná voda	1 000 ml

Sterilace v autoklávu při 121 °C/15 min, pH po sterilaci $6,6 \pm 0,2$ při 25 °C.

Kontrolní kmeny

Pro testování antibakteriálních vlastností aktivních obalů se jako nejvhodnější jeví kmen *C. sporogenes* CCM 4409 (ATCC 19404), případně lze do testování zahrnout i kmeny *M. luteus* CCM 732 (ATCC 10240) a *S. aureus* ssp. *aureus* CCM CCM 4516 (ATCC 6538). Jako kontrolní kmeny plísní pro testování antifungálních vlastností lze doporučit kmeny *P. roqueforti* CCM F-431 a *A. niger* CCM 8189 (ATCC 9642). Kontrolní kmeny byly vybrány jednak na základě jejich relativně vyšší citlivosti vůči antimikrobiálním látkám a jednak na základě vhodných kombinací živná půda/mikroorganismus, které poskytují vizuálně snadné vyhodnocení.

Kontrolní kmeny se ožíví dle postupu doporučeného příslušnou sbírkou mikroorganismů. Před vlastním testováním se kmeny pomnoží takto:

- *C. sporogenes* na půdě RCMč, kultivace při 37 °C/1-3 dny anaerobně,
- *M. luteus* na půdě GTK nebo PCA, kultivace při 30 °C/1-2 dny aerobně,
- *S. aureus* na půdě GTK nebo PCA, kultivace při 37 °C/1-2 dny aerobně,
- *P. roqueforti*, *A. niger* na půdě GKCH, kultivace při 25 °C/2-4 dny aerobně.

Příprava vzorků

Vzorky aktivních obalů se v místě odběru vloží do průhledných plastových kapes sterilovaných zářením tak, aby každý vzorek byl samostatně v jedné kapse. Na kapsu se vyznačí popis vzorku a strana, ke které je přivrácena aktivní vrstva obalu.

Před vlastní analýzou se na povrch kapsy lihovým fixem vyznačí požadovaná plocha pro analýzu, která se poté vystříhne sterilními nůžkami, a to včetně kapsy. Poté se sterilní pinzetou vyjme testovaná část obalu z výstřížku kapsy a použije pro analýzu.

Metoda je vhodná jak pro průhledné, tak pro neprůhledné nebo barevné obaly.

Hodnocení mikrobiologických parametrů

Metoda přelivu

Čtverec hodnoceného obalu 5 x 5 cm se položí na dno Petriho misky aktivní stranou nahoru a přelije se 2 ml fyziologického roztoku podle ČSN EN ISO 6887-1 (1999). Po 15 minutách rozpouštění aktivní vrstvy se miska s obalem přelije vrstvou příslušné živné půdy a kultivuje se za podmínek metody pro stanovení daného parametru. Zachycený počet kolonií se vyjádří přímo jako počet kolonií tvořících jednotek na 25 cm² (KTJ/25 cm²). Vhodné je provést minimálně dvě paralelní stanovení ze čtverců vystřížených v různých místech vzorku obalu.

Metoda přelivu je vhodná pro stanovení mikroorganismů vyskytujících se na aktivním obalu v nízké denzitě, a tedy pro kontrolu mikrobiologické čistoty. Stanovit tak lze například kvasinky a plísně na půdě DG18 po kultivaci při 25 °C/5-7 dní podle ČSN ISO 21527-2 (2009). U vzorků obalů, které v aktivní vrstvě neobsahují záměrně přidanou kulturu, lze stanovit rovněž celkový počet mikroorganismů na půdě PCA nebo GTK po kultivaci při 30 °C/3 dny s využitím normy ČSN EN ISO 4833-1 (2014).

Metoda ředění aktivní vrstvy

Obdélník hodnoceného obalu 2 x 12,5 cm se vloží do 9 ml fyziologického roztoku, kde se ponechá 15 minut, aby se rozpustila aktivní vrstva a vzniklo 1. desetinasobné ředění vzorku. Následuje klasické desetinasobné ředění podle ČSN EN ISO 6887-1 (1999) a kulturační analýza na příslušných živných půdách. Zachycený počet kolonií se s uvažováním příslušného ředění přepočítá na počet kolonie tvořících jednotek na 25 cm² (KTJ/25 cm²). Vhodné je provést minimálně dvě paralelní stanovení z obdélníků vystřížených v různých místech vzorku obalu.

Metoda ředění aktivní vrstvy je vhodná pro posouzení přežívání záměrně přidané kultury v aktivní vrstvě obalu. Jedná se především o stanovení mezofilních mléčných koků rodů *Lactococcus* a *Leuconostoc* na půdě M17 po kultivaci při 30 °C/3 dny, stanovení enterokoků, jako např. *Ent. faecium*, na půdě SB po kultivaci při 37 °C/2 dny nebo stanovení laktobacilů na půdě MRS po kultivaci při 37 °C/3 dny anaerobně.

Hodnocení antibakteriálních vlastností

Metoda s obalem na povrchu živné půdy

Jedna očkovací klička kontrolního kmene *C. sporogenes* se suspenduje v 9 ml fyziologického roztoku, odkud se očkuje 0,5 ml na Petriho misku přelivem do půdy RCMč. Po utuhnutí se na povrch půdy položí čtverec hodnoceného obalu 5 x 5 cm, a to aktivní stranou dolů. Pro každý vzorek se připraví samostatná Petriho miska. Následuje anaerobní kultivace při 37 °C/3 dny. Vhodné je provést minimálně dvě paralelní stanovení ze dvou připravených suspenzí kontrolního kmene a ze dvou čtverců vystřižených v různých místech vzorku obalu.

Při vyhodnocení se měří šířka inhibiční zóny (v milimetrech) okolo čtverce obalu a hodnotí se, zda je inhibice úplná nebo jen částečná a zda neprorůstají rezistentní kolonie. Pokud je antibakteriální účinek aktivního obalu slabý, inhibiční zóna okolo obalu sice nevzniká, ale růst mikroorganismů je inhibován ve vrstvě půdy pod obalem. Pak je vyhodnocení pouze kvalitativní (pod obalem neinhibuje/inhibuje částečně/inhibuje zcela).

Právě kvůli možnosti detekovat i slabý antibakteriální účinek je metoda s obalem na povrchu živné půdy zvláště vhodná pro anaerobní bakterie, jejichž růst není inhibován omezením přístupu kyslíku v místě položení obalu. *C. sporogenes* a půda RCMč navíc umožňují snadnou vizuální detekci antibakteriálního účinku, a to i v případě, že je testovaný obal neprůhledný. Půda RCMč je totiž jednak čirá a kolonie jsou v ní dobře patrné a jednak na ní růst *C. sporogenes* doprovází změna acidobazického indikátoru. *C. sporogenes* a některé další druhy klostridií (které však nejsou v ČR komerčně dostupné) tvoří kyselinu máselnou, která difunduje do okolí kolonií a mění barvu půdy z červené na žlutou. V závislosti na podmínkách konkrétní analýzy může půda pod středem dostatečně účinného obalu zůstat červená, a tak být dosažení antibakteriálního účinku nepřehlédnutelné. Pro vyjádření výsledku však barevná změna nehraje roli, rozhodující je nepřítomnost kolonií v oblasti pod obalem či okolo obalu.

Metoda s obalem na dně Petriho misky (alternativní metoda)

Jedna očkovací klička kontrolního kmene *M. luteus* nebo *S. aureus* se suspenduje v 9 ml fyziologického roztoku, odkud se očkuje 3 % obj. do lahvičky obsahující rozehřátou živnou půdu – GTK nebo PCA pro mikrokoky, MSFR pro stafylokoky. Takto naočkovaná půda se před nalitím na Petriho misky uchovává na vodní lázni o teplotě 43-44 °C po dobu maximálně 20 minut.

Naočkovaná půda se nalije na Petriho misku, která má na dně položený čtverec hodnoceného obalu 5 x 5 cm aktivní stranou nahoru. Poté se plotny s naočkovanými stafylokoky kultivují při 37 °C/2 dny a plotny s naočkovanými mikrokoky při 30 °C/3 dny. Vhodné je provést minimálně dvě paralelní stanovení ze dvou připravených suspenzí daného kontrolního kmene a ze dvou čtverců vystřižených v různých místech vzorku obalu.

Při vyhodnocení se měří šířka inhibiční zóny (v milimetrech) okolo čtverce obalu a hodnotí se, zda je inhibice úplná nebo jen částečná a zda neprorůstají rezistentní kolonie. Pokud je antibakteriální účinek aktivního obalu slabý, inhibiční zóna okolo obalu sice nevzniká, ale růst mikroorganismů je inhibován ve vrstvě půdy nad obalem. Pak je vyhodnocení pouze kvalitativní (nad obalem neinhibuje/inhibuje částečně/inhibuje zcela).

Metoda s obalem na dně Petriho misky umožňuje detekovat i slabý antibakteriální účinek vůči aerobním bakteriím ve vrstvě půdy nad obalem, což by metodou s obalem na povrchu živné půdy možné nebylo. Nevýhodou této metody však je, že při nalévání živné

půdy na Petriho misku může půda částečně zatékat pod čtverec obalu na dně, kde pak rostoucí kolonie mohou ztěžovat vyhodnocení.

Podobně jako RCMč pro *C. sporogenes*, i MSFR pro *S. aureus* je čirá půda poskytující barevnou změnu z červené na žlutou v okolí vyrostlých kolonií (fermentace mannitolu za vzniku kyselin). Proto lze mezi aerobními bakteriemi doporučit použití kontrolního kmene *S. aureus* na půdě MSFR. Konvenční půda dle Baird-Parkera se pro testování antibakteriálního účinku vůči *S. aureus* nedoporučuje kvůli vyššímu zákalu půdy a tvorbě precipitátu kolem kolonií, které ztěžují detekci inhibičních zón.

V případě požadavku na otestování antibakteriálního účinku aktivních obalů vůči více druhům kontrolních mikroorganismů lze do testování zařadit také *M. luteus*, jehož žlutě pigmentované kolonie jsou na půdě GTK nebo PCA dostatečně výrazné.

Hodnocení antifungální vlastností

Jedna očkovací klíčka kontrolního kmene plísni se suspenduje v 9 ml fyziologického roztoku, odkud se očkuje po 0,5 ml na dvě Petriho misky přelivem do půdy GKCH. Po utuhnutí se na povrch naočkované půdy položí hodnocený obal aktivní stranou dolů – na jednu Petriho misku ve formě čtverce 5 x 5 cm, na druhou ve formě kruhu o průměru Petriho misky, který má v sobě 20-30 otvorů. Otvory se vytvoří ještě před vyjmutím obalu z kapsy, a to na sterilním teflonovém prkénku prudkými údery pomocí sterilní rýsovací jehly nebo s využitím srovnatelných nástrojů. Následuje aerobní kultivace při 25 °C/3-5 dní. Vhodné je provést minimálně dvě paralelní stanovení ze dvou připravených suspenzí kontrolního kmene, přičemž pro každou suspenzi se otestuje jeden čtverec a jeden kruh vstřížené v různých místech vzorku obalu.

Při vyhodnocení se měří šířka inhibiční zóny (v milimetrech) okolo čtverce obalu a hodnotí se, zda je inhibice úplná nebo jen částečná a zda neprorůstají rezistentní kolonie. Protože pod čtvercem obalu plísně nerostou buď vůbec anebo jen velmi omezeně v důsledku nedostatku kyslíku, antifungální aktivitu v oblasti pod obalem takto hodnotit nelze. K tomuto účelu však slouží plotny zakryté proděravělým obalem ve tvaru kruhu. Pokud má obal alespoň slabý antifungální účinek, plísně otvory v obalu neprorůstají. Naopak v otvorech obalu bez antifungálního účinku jsou prorůstající zeleně nebo černě zbarvené kolonie kontrolních kmenů plísni dobře patrné.

IV. Popis uplatnění metodiky

Certifikovaná metodika TA03010546 CM1 je primárně určena pro zkušební laboratoře poskytující analýzy a poradenství výrobcům obalového materiálu, výrobcům potravin a dalším výrobcům, kteří balí své produkty do aktivních obalů. Využitelná je jak v provozních laboratořích pro rutinní kontrolu vyráběných resp. dodávaných obalů, tak ve zkušebních laboratořích pro účely obchodního styku a státní kontroly. Uplatnění nalezne též v laboratořích zabývajících se výzkumem a vývojem aktivních obalů.

Certifikovaná metodika TA03010546 CM1 byla uplatněna u uživatele MILCOM a.s., který je připraven provádět analýzy dle potřeb zájemců.

V. Ekonomické aspekty

Certifikovanou metodiku TA03010546 CM1 mohou provádět všechny laboratoře vybavené pro klasickou kultivační mikrobiologii. Náklady na zavedení metodiky se pohybují v řádu jednotek tis. Kč, jakožto nákladů na případné dokoupení složek pro přípravu kultivačních půd, kontrolních kmenů a nástrojů pro přípravu vzorků.

Náklady na analýzu jednoho vzorku obalu na mikrobiologické a antimikrobiální vlastnosti jsou odhadovány na 1,5 – 4 tis. Kč dle rozsahu provedených analýz. V závislosti na vývoji trhu s aktivními obaly lze očekávat postupný nárůst objemu analýz. V letech 2016-2017 je cena zakázek pro laboratoře odhadována na 10 tis. ročně, což přinese zisk přibližně 2 tis. Kč. V dalších deseti letech je předpokládán postupný nárůst objemu zakázek na průměrnou cenu cca 40 tis. Kč ročně, což přinese zisk přibližně 8 tis. Kč ročně.

Aplikace této metodiky umožní objektivně zhodnotit mikrobiologické a antimikrobiální vlastnosti aktivních obalů, což podpoří funkčnost trhu s těmito obaly. Hlavní ekonomický přínos je očekáván právě u výrobců aktivních obalů, resp. u jejich odběratelů. Odhad ekonomických přínosů těchto subjektů je nad rámec tohoto materiálu.

VI. Seznam použité související literatury

- ČSN EN ISO 4833-1 (2014): Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů – Část 1: Technika přelivem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, Česká republika.
- ČSN EN ISO 6887-1 (1999): Mikrobiologie potravin a krmiv – Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinásobných ředění – Část 1: Všeobecné pokyny pro přípravu výchozí suspenze a desetinásobných ředění. Český normalizační institut, Praha, Česká republika.
- ČSN EN ISO 11133 (2014): Mikrobiologie potravin, krmiv a vody - Příprava, výroba, uchovávání a zkoušení výkonnosti kultivačních půd. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, Česká republika.
- ČSN ISO 21527-2 (2009): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní – Část 2: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody nižší než nebo rovnou 0,95. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, Česká republika.
- Nařízení komise (EU) č. 10/2011 ze dne 14. 1. 2011 o materiálech a předmětech z plastů určených pro styk s potravinami.
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1935/2004 ze dne 27. 10. 2004 o materiálech a předmětech určených pro styk s potravinami a o zrušení směrnice 80/590 EHS a 89/109/EHS.
- Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 38/2001 Sb. ze dne 19. 1. 2001 o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmy.
- Azlin-Hasim, S., Cruz-Romero, M.C., Ghoshal, T., Morris, M.A., Cummins, E., Kerry, J.P. (2015): Application of silver nanodots for potential use in antimicrobial packaging applications. *Innovative Food Sci. & Emerging Technol.* 27: 136-143.
- COMA, V. (2008): Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Sci.* 78(1-2): 90-103.

- Gouvea, D.M., Mandonca, R.C.S., Soto, M.L., Cruz, R.S. (2015): Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. *LWT Food Sci & Technol.* 63 (1): 85-91.
- Hanušová K., Šťastná M., Votavová L., Klaudivová K., Dobiáš J., Voldřich M., Marek M. (2010): Polymer films releasing nisin and/or natamycin from polyvinylidene chloride lacquer coating: Nisin and natamycin migration, efficiency in cheese packaging. *J. Food Eng.* 99: 491-496.
- Hanušová K., Vápenka L., Dobiáš J., Mišková (2013): Development of antimicrobial packaging materials with immobilized glucose oxidase and lysozyme. *Central Eur. J. of Chem.* 11(7): 1066-1078.
- Lone, A., Anany, H., Hakeem, M., Aguis, L., Avdjian, A.C., Bouget, M., Atashi, A., Brovko, L., Rochefort, D., Griffiths, M.W. (2016): Development of prototypes of bioactive packaging materials based on immobilized bacteriophages for control of growth of bacterial pathogens in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 217: 49-58.
- Němečková, I., Šalaková, A., Klimešová, M., Roubal, P., Pšeničková, Z. (2015): Lak s antimikrobiální kulturou. Úřad průmyslového vlastnictví. Číslo přihlášky: 2015-31544, číslo dokumentu 28904. MPT C09D 5/14, C12R 1/225, C12R 1/01, C09D 183/04. Datum zápisu: 30. 11. 2015.
- Severino, R., Ferrari, G., Vu, K.D., Donsi, F., Salmieri, S., Lacroix, M. (2015): Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on green beans. *Food Control* 50: 215-222.
- Soysal, C., Bozkurt, H., Dirican, E., Güclü, M., Bozhüyük, E.D. (2015): Effect of antimicrobial packaging on physicochemical and microbial quality of chicken drumsticks. *Food Control* 54: 294-299.

VII. Seznam publikací, které metodice předcházejí

- Němečková, I., Mihalová, D., Peroutková, J., Smolová, J., Chramostová, J., Roubal, P., Pšeničková, Z. (2015): In vitro testování účinnosti obalů s antimikrobiální vrstvou. *Mlékařské listy - Zpravodaj* 153: V - IX.
- Němečková, I., Šalaková, A., Klimešová, M., Roubal, P., Pšeničková, Z. (2015): Lak s antimikrobiální kulturou. Úřad průmyslového vlastnictví. Číslo přihlášky: 2015-31544, číslo dokumentu 28904. MPT C09D 5/14, C12R 1/225, C12R 1/01, C09D 183/04. Datum zápisu: 30. 11. 2015.
- Němečková, I., Chramostová, J., Havlíková, Š., Kvasničková, E., Mihalová, D., Pešek, E., Klimešová, M., Roubal, P. (2015): Antimikrobiální látky přírodního původu a jejich potenciál pro mlékařské aplikace. XVIII. DEN VÚM, 23. 4. 2015, Praha, Česká republika.
- Němečková, I., Rohacká, H., Kučerová, K., Tůma, Š., Roubal, P., Pechačová, M., Cicvárek, J., Plocková, M. (2010): Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese-slurry. *Acta Aliment. Hung.* 39: 368 – 377.
- Němečková, I., Mihalová, D., Kejmarová, M., Roubal, P. (2015): Metody testování účinnosti sanitčních roztoků proti plísním. *Mlékařské listy - Zpravodaj* 152: III - VII.
- Němečková, I., Kejmarová, M., Roubal, P. (2015): Metodika testování účinnosti sanitčních roztoků proti plísním kontaminujícím potravinářské provozy, především mlékárny. Uplatněno v MILCOM a.s., 21. 10. 2015. Osvědčení SVS č. SVS/2015/129869-G ze dne 30. 11. 2015.

- Němečková, I., Hanušová, J., Havlíková, Š., Kvasničková, E., Kejmarová, M., Kunová, G., Roubal, P., Purkrťová, S., Jebavá, I., Kalhotka, L., Šustová, K. (2012): Mikrobiální původci vad mlékařenských výrobků. Kroměřížské mlékařské dny 2012, 19. - 20. 9. 2012, Kroměříž, Česká republika.
- Šalaková, A., Kunová, G., Dragounová, H., Drbohlav, J., Roubal, P. (2015): Vliv podmínek skladování na přežití vybraných lyofilizovaných kmenů laktobacilů. Mlékařské listy - Zpravodaj 148: X - XIV.
- Šalaková, A., Pechačová, M., Dráb, V., Drbohlav, J., Pešek, E. (2015): Antimikrobiální účinky vybraných bakterií mléčného kvašení. Mlékařské listy - Zpravodaj 148: I - VII.
- Havlíková, Š., Kvasničková, E., Němečková, I. (2016): Ověření bakterií s antiklostridiálním účinkem v poloprovozních výrobcích sýrů eidamského typu. Mléko a sýry, 20. 1. 2016, Praha, Česká republika.
- Chramostová, J., Havlíková, Š., Purkrťová, S., Němečková, I., Roubal, P. (2014): Potenciál mikroorganismů při kažení mléka a mlékařenských produktů. Mlékařské listy - Zpravodaj 147: XVII - XX.
- Jebavá, I., Purkrťová, S., Hanušová, J., Savická, D., Šviráková, E., Němečková, I., Demnerová, K. (2013): Identifikace mikrobiálních původců vad mlékařenských výrobků moderními molekulárně-biologickými metodami. Mlékařské listy - Zpravodaj 138: X - XIV.

VIII. Přílohy, dokumenty a doklady

- Smlouva s uživatelem MILCOM a.s.
- Posudek odborníka v daném oboru – Doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D., Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
- Posudek ze státní správy - MVDr. Jiří Hlaváček, Státní veterinární správa ČR
- Osvědčení odborného orgánu státní správy - Státní veterinární správa ČR

V Praze dne

Za zhotovitele:

Ing. Irena Němečková, Ph.D.

.....

Certifikovaná metodika TA03010546 CM 1 vznikla s finanční podporou TA ČR, č. projektu TA03010546 v programu ALFA.