



Certifikovaná metodika QJ1210300 CM 1

Metodika testování účinnosti sanitačních roztoků proti plísním kontaminujícím potravinářské provozy, především mlékárny

Cíl certifikované metodiky:

Cílem certifikované metodiky QJ1210300 CM 1 je vybrat vhodné sanitační roztoky pro eliminaci nežádoucích plísní z technologických zařízení a prostorů mlékáren aj. potravinářských provozů.

Náplň certifikované uplatněné metodiky:

Náplň certifikované metodiky QJ1210300 CM1 je implementace výsledků získaných v rámci řešení projektu NAZV QJ1210300 do prostředí poradenství a pomoci praxi, které jsou poskytovány mlékárnám, faremním zpracovatelům mléka a popř. i dalším potravinářským provozům.

Certifikovaná metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu QJ1210300 v programu KUS s finanční podporou NAZV MZe ČR.

Zpracovali: Irena Němečková (65 %), Marie Kejmarová (20 %), Petr Roubal (15 %), Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Říjen 2015

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. - *Aspergillus*

g - gram

GK - půda s glukosou a kvasničným extraktem

MEA - půda se sladovým extraktem

min - minuta

ml - mililitr

P. - *Penicillium*

soft GK - půda s glukosou, kvasničným extraktem a poloviční dávkou agarů

soft MEA - půda se sladovým extraktem a poloviční dávkou agarů

μl - mikrolitr

I. Cíl metodiky

Cílem certifikované metodiky QJ1210300 CM 1 je vybrat vhodné sanitační roztoky (typ aktivní látky, složení sanitačního roztoku, koncentrace aktivní látky, podmínky působení) pro eliminaci nežádoucích plísní z technologických zařízení a prostředí mlékáren aj. potravinářských provozů.

II. Srovnání novosti postupů

Plísně jsou přítomny ve vzduchu, vodě i půdě a jsou často nalézány i na výrobním zařízení a na/v mléčných výrobcích. Plísně mohou způsobovat kažení různých druhů sýrů, fermentovaných mléčných výrobků, másla, zahuštěného slazeného mléka a příležitostně i dalších typů mléčných výrobků. Typickými vadami způsobenými plísněmi jsou viditelný nárůst, barevné změny, narušení textury či vady chuti nebo vůně. Protože některé druhy plísní rostou i při 1 - 5 °C, tolerují nízkou aktivitu vody (až 0,80) a snášejí nízký parciální tlak kyslíku, mohou se uplatnit i během skladování mléčných výrobků. V mléčných výrobcích se nejčastěji vyskytují plísně rodu *Penicillium*, dále pak *Aspergillus*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Cephalosporium*, *Geotrichum*, *Rhizobium*, *Alternaria*, a další (Sørhung, 2011).

Vzhledem k výše uvedenému je důležité věnovat pozornost eliminaci plísní z mlékárenských provozů. Pokud jde o technologické zařízení jako takové, Williams (2006) doporučuje důkladné vyčištění následované vyhřátím nad 70 °C pomocí horké vody nebo páry. Důvodem je nedostatečná úroveň poznání mechanismů inaktivace/rezistence plísní, ze které by bylo možné čerpat obecná doporučení pro použití sanitačních roztoků s fungicidním účinkem. Významná antifungální aktivita byla zatím zaznamenána u halogenovaných fenolů, parabenů a glutaraldehydu, nicméně tyto látky jako sanitační prostředky nenašly uplatnění kvůli jejich toxikologickým vlastnostem a/nebo interakcím s technologickými zařízeními. Situace je navíc komplikována rozdíly v antifungálním účinku sanitačních roztoků na vegetativní buňky a na spory plísní, a dále rezistencí některých plísní (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*) vůči krátkodobému působení teplot blízkých bodu varu, což se týká zejména starších spor (Williams, 2006). Otázka zdánlivé rezistence spor plísní vůči záhřevu je zodpovězena ve vlastní metodice.

Z hlediska postupů hodnocení antifungálního účinku, existují metodiky, např. CLSI M38-A2 (2008) nebo ČSN EN 1650 + A1 (2013), které však nemají přímou souvislost s potřebami mlékárenské praxe. CLSI M38-A2 (2008) je určena především pro potřeby klinické praxe a zabývá se stanovením minimálních inhibičních koncentrací (MIC) a minimálních efektivních koncentrací (MEC) antibiotik a dalších látek vůči testovaným patogenním plísním pomocí diluční metody za definovaných podmínek, které neodpovídají provozním podmínkám mlékáren. Kromě toho jsou koncentrace sanitačních roztoků pro provozní aplikace - vzhledem k možnému korozivnímu účinku, ekonomické stránce provozu, a dalším faktorům - v určitém rozmezí koncentrací pevně dané, a tedy nemá smysl hledat koncentrace vyšší.

ČSN EN 1650 + A1 (2013) se týká testování dezinfekčních prostředků jako takových a je to vhodná referenční metoda pro vytváření aplikačních listů, porovnávání účinnosti jednotlivých preparátů u jejich výrobců, apod. výstupy využitelné v obchodním styku. Metoda využívá standardizované suspenze konkrétních sbírkových kmenů *Candida albicans* a *Aspergillus niger* (pouze jeho spory), které jsou za definovaných podmínek inkubovány s testovaným dezinfekčním prostředkem naředěným ve standardním způsobem připravené tvrdé vodě. Po inkubaci následuje neutralizace aktivní látky nebo separace indikátorových

mikroorganismů od aktivní látky pomocí membránové filtrace a klasické stanovení přeživších kvasinek nebo spor plísni na Petriho miskách. S využitím této metody a referenčních sbírkových kmenů se mohou sanitační roztoky jevit jako účinnější než při reálné aplikaci, protože sbírkové kmeny bývají většinou citlivější vůči nepříznivým faktorům než divoké kmeny z prostředí (Němečková a kol. 2014).

Metodu podle ČSN EN 1650 + A1 (2013) by sice bylo možné adaptovat na provozní podmínky (teplota a čas inkubace se sanitačním roztokem, ředění sanitačního roztoku ve vodě, která je k dispozici na provoz, testování účinnosti vůči kmenům plísni izolovaným v provozu, atd.), ale nelze takto získat poznatky o tom, jak sanitační roztoky působí na vegetativní buňky plísni, ani jak na sanitační roztok reagují přeživší buňky.

Aby sanitační roztok mohl na plíseň působit, je nutné plíseň roztokem smočit. To může být někdy obtížné vzhledem k nízké smáčivosti buněk plísni, která vyplývá ze složení jejich buněčné stěny. Složení buněčné stěny se liší mezi jednotlivými druhy plísni i mezi jednotlivými buněčnými útvary téhož druhu plísně (hyfy, fruktifikační orgány, spory). Obecně však lze říci, že buněčná stěna plísni je složena hlavně z polysacharidů - chitinu (polysacharid z N-acetylglukosaminu), chitosanu (deacetylovaný chitin), a dále z gluknanů, mannanů, polysacharidů z galaktosaminu, fukosy nebo rhamnosy, a dalších. Kromě polysacharidů jsou vždy přítomny také bílkoviny a značné množství lipidů, a to jak neutrálních lipidů, tak vosků (esterů mastných kyselin a vyšších alkoholů), které nejvíce přispívají k hydrofobicitě plísni (Šilhánková, 2008).

Pro testování hydrofobicity buněk existuje metoda podle Kotzmanidise a kol. (2010), která je primárně určená pro testování probiotických bakterií. Bakterie jsou při ní pomnoženy v bujónu, buňky separovány odstředěním, promyty pufrům a suspendovány v roztoku KNO₃. K suspenzi buněk se přidává xylen a po protřepání se směs nechá rozsádit. Následuje stanovení podílu buněk, které zůstaly ve vodné fázi. Tato metoda je vhodná pro porovnání hydrofobicit různých kmenů bakterií a mohla by být aplikována i na spory plísni. Avšak k otestování sanitačních roztoků použít nelze, protože sanitační roztoky jsou dobře mísitelné s vodou, a tedy k oddělení fází nedochází.

Vhodná metodika, která by umožnila vybrat účinné sanitační roztoky k eliminaci konkrétních plísni přítomných v daném mlékárenském/potravinářském provozu dosud chyběla a proto byla vypracována tato certifikovaná metodika QJ1210300 CM 1.

III. Vlastní popis metodiky

Materiál a metody

Živné půdy

Živné půdy se připravují a uchovávají v souladu s ČSN EN ISO 11133 (2014). Při práci se používají půdy vhodné pro kultivaci kvasinek a plísni, přičemž jsou používány varianty bez selekčních činidel s antimikrobiálním účinkem, tj. např. bez chloramfenikolu. Pro uchování plísni a pro hodnocení smáčivosti jsou určeny půdy se standardním obsahem agarů, pro difuzní agarovou metodu soft půdy s polovičním obsahem agarů.

GK půda:

kvasničný extrakt	5,0 g
glukosa	20,0 g
agar	12,0 - 15,0 g dle ztužovací schopnosti agarů
destilovaná nebo deionizovaná voda	1000 ml

Sterilace v autoklávu při 121 °C/15 min
Po sterilaci pH 6,6 ± 0,2 (měřeno při 25 °C)

Soft GK půda:

kvasničný extrakt	5,0 g
glukosa	20,0 g
agar	6,0 - 7,5 g dle ztužovací schopnosti agaru
destilovaná nebo deionizovaná voda	1000 ml

Sterilace v autoklávu při 121 °C/15 min
Po sterilaci pH 6,6 ± 0,2 (měřeno při 25 °C)

MEA půda:

sladový extrakt	30,0 g
agar	12,0 - 15,0 g dle ztužovací schopnosti agaru
destilovaná nebo deionizovaná voda	1000 ml

Sterilace v autoklávu při 121 °C/15 min
Po sterilaci pH 5,6 ± 0,2 (měřeno při 25 °C)

Soft MEA půda:

sladový extrakt	30,0 g
agar	6,0 - 7,5 g dle ztužovací schopnosti agaru
destilovaná nebo deionizovaná voda	1000 ml

Sterilace v autoklávu při 121 °C/15 min
Po sterilaci pH 5,6 ± 0,2 (měřeno při 25 °C)

Izolace a uchování plísní

Při práci se postupuje podle příslušných norem, především podle ČSN EN ISO 7218 (2008) pro práci v mikrobiologické laboratoři, podle ČSN EN ISO 707 (2009) pro odběr vzorků výrobků, podle ČSN EN ISO 6887-1 (1999) a ČSN EN ISO 6887-5 (2010) pro přípravu vzorků, ředících roztoků a dalších desetinasobných ředění, podle ČSN EN ISO 14698-1 (2004) pro mikrobiologickou kontrolu prostředí a podle ČSN ISO 21527-2 (2009) nebo ČSN ISO 21527-1 (2009) pro stanovení kvasinek a plísní.

Plísně se získávají z reálných vzorků odebraných na příslušném provozu, a to jak z finálních výrobků, tak z fázových vzorků, spadů, stěrů z povrchů technologického zařízení, místností nebo pracovníků - v závislosti na konkrétní situaci a předpokládaném zdroji kontaminace. Pokud plíseň na daném výrobku, zařízení nebo prostředí tvoří okem viditelné kolonie, izoluje se plíseň přímo z těchto kolonií očkovací kličkou na povrch Petriho misky s GK nebo MEA půdou a kultivuje se v termostatu při 25 °C/5 dnů. Pokud nejsou kolonie plísní v daném odběrovém místě okem patrné, provede se klasické stanovení kvasinek a plísní technikou počítání kolonií a vykultivované plísně se očkovací kličkou odizolují na povrch Petriho misky s GK nebo MEA půdou a kultivují se v termostatu při 25 °C/5 dnů.

Následuje ještě minimálně jedno přeočkování plísně očkovací kličkou na povrch Petriho misky s GK nebo MEA půdou a kultivace v termostatu při 25 °C/5 dnů - tento postup se opakuje, dokud na Petriho misce neroste pouze monokultura izolované plísně. Poté je plíseň přeočkována do zkumavky na povrch šikmého agaru vytvořeného z GK nebo MEA půdy a kultivována v termostatu při 25 °C/5 dnů. Po kultivaci je celý obsah zkumavky převrstven sterilním parafinovým olejem (sterilován v autoklávu při 121 °C/15 min), zkumavka s plísní je uzavřena buničitou zátkou, utěsněna parafilmem a uchována

v chladničce při 4 - 6 °C. Za těchto podmínek je minimální trvanlivost zkumavek s plísní 6 měsíců.

Před vlastním testováním účinnosti sanitačních roztoků je plíseň oživena tak, že se přes vrstvu parafinového oleje očkovací kličkou odebere inokulum plísně, která je přeočkována na povrch Petriho misky s GK nebo MEA půdou a kultivována v termostatu při 25 °C/5 dnů.

Difuzní agarová metoda

Jedna očkovací klička testované plísně vykultivované na GK nebo MEA půdě se přenesou do 9 ml fyziologického roztoku, čímž vznikne 0. desetinásobné ředění plísňové suspenze. Odtud se po 1 ml 1. a 2. desetinásobného ředění plísňové suspenze očkuje přelivem na Petriho misky o průměru 90 mm do 15 ml soft GK nebo soft MEA půdy. Půda se ponechá utuhnout v chladničce při 4 - 6 °C/2 h.

Po utužení se v půdě pomocí sterilního korkovrtu nebo širší strany sterilních jednorázových špiček vhodné velikosti vytvoří jamky o průměru 7 - 8 mm, přičemž na jednu Petriho misku se udělají maximálně 4 jamky. Do jamek se dávkuje po 100 µl příslušného sanitačního roztoku naředěného ve sterilní vodě na testovanou koncentraci. Každý vzorek sanitačního roztoku o dané koncentraci je dávkován na obě připravené misky s 1. i 2. desetinásobným ředěním plísňové suspenze. Jestliže mají být otestovány více než 4 sanitační roztoky, odpovídajícím způsobem se zvýší počet Petriho misek s oběma ředěními plísňové suspenze a jamkami. Následuje kultivace v termostatu při 25 °C/5 dní.

Po 3 dnech kultivace se provede předběžné vyhodnocení, přičemž se sleduje, zda okolo jamek vznikají zóny se zcela inhibovaným, zpomaleným nebo naopak zrychleným růstem plísně. Kultivace pokračuje další 2 dny, a pak se provede konečné zhodnocení vlivu sanitačního roztoku na růst plísně, a pokud vznikly inhibiční zóny, pomocí pravítka nebo posuvného měřítka se změří jejich průměr v milimetrech. Výsledek se vyjádří jako aritmetický průměr z výsledků získaných na obou desetinásobných ředěních plísňové suspenze pro daný sanitační roztok a danou koncentraci.

Hodnocení smáčivosti plísní

Plíseň vykultivovaná na GK nebo MEA půdě pokrývající 1/2 až 9/10 plochy Petriho misky o průměru 90 mm se pozvolna přelije 30 ml testovaného sanitačního roztoku naředěného ve sterilní vodě na danou koncentraci a vytemperovaného na teplotu simulující podmínky sanitace. Sanitační roztok se nechá působit po dobu simulující podmínky sanitace, přičemž Petriho misky s plísní a roztoky působícími za zvýšené teploty se po tuto dobu inkubují v termostatu.

Během dávkování sanitačního roztoku a po inkubaci se vizuálně sleduje schopnost testovaného roztoku danou plíseň smočit. K vyhodnocení se použije tříbodová stupnice s tímto významem:

- „-“ - plíseň se sanitačním roztokem smáčí velmi obtížně až vůbec (roztok po povrchu plísně rychle stéká a ani po nadávkování celého objemu 30 ml a inkubaci sanitační roztok nepřekrývá celý nárůst plísně),
- „0“ - plíseň se sanitačním roztokem smáčí s mírnými obtížemi (během dávkování sanitační roztok z plísně stéká, avšak po nadávkování celého objemu 30 ml, popř. po inkubaci sanitační roztok překrývá celý nárůst plísně),
- „+“ - plíseň se sanitačním roztokem smáčí bez obtíží (během dávkování sanitační roztok z plísně nestéká, po nadávkování celého objemu 30 ml je celý nárůst překrytý sanitačním roztokem).

Vzhledem k tomu, že je hodnocení smáčivosti plísní v podstatě senzoricou metodou, mělo by být hodnocení prováděno v panelu o 2 až 5 členech, přičemž každý člen panelu má vlastní sadu Petriho misek s plísněmi, vlastnoručně provádí dávkování sanitačních roztoků a smáčivost plísní hodnotí samostatně a nezávisle na ostatních členech panelu.

Interpretace výsledků

Metodika QJ1210300 CM 1 je určena k výběru vhodných sanitačních roztoků pro eliminaci nežádoucích plísní z technologických zařízení a prostorů mlékáren aj. potravinářských provozů, a z tohoto úhlu pohledu je potřeba výsledky získané podle této metodiky interpretovat.

Metodika zahrnuje dva kroky (difuzní agarová metoda, test smáčivosti plísní), přičemž každý krok poskytuje specifické informace. Difuzní agarová metoda poskytuje obraz o antifungální aktivitě sanitačního roztoku jako takové. Cílem je nalezení takového sanitačního roztoku o takové koncentraci, aby v ideálním případě vznikla inhibiční zóna zcela bez nárůstu plísně, která by byla minimálně 15 mm široká (měřeno včetně jamky o průměru 7 - 8 mm) a okolo které by nevznikla další zóna se zrychleným růstem nebo zrychlenou sporulací plísně.

Jestliže v inhibiční zóně okolo komůrky dochází k oslabenému růstu plísně, znamená to, že některé z buněk byly vůči působení sanitačního roztoku rezistentní. Pokud to aplikační rozmezí daného sanitačního roztoku umožňuje, otestuje se koncentrace vyšší, případně se volí jiný sanitační roztok na podobné bázi. Obdobným způsobem se postupuje i v případě, že je inhibiční zóna příliš úzká, tj. užší než 15 mm (měřeno včetně jamky o průměru 7 - 8 mm).

Vzniká-li okolo inhibiční zóny zóna zrychleného růstu nebo zrychlené sporulace plísně, jedná se o upozornění na nutnost důsledného dodržování účinné koncentrace sanitačního roztoku a jeho aktivních látek, neboť nižší koncentrace mohou plíseň naopak stimulovat. Vzniká-li zóna zrychleného růstu nebo zrychlené sporulace plísně hned okolo jamky, je daný sanitační roztok zcela nevhodný a neměl by být vůbec používán až do té doby, než bude plíseň z daného zařízení nebo prostoru eliminována.

Pokud okolo jamky nevzniká žádná zóna, testovaný roztok o dané koncentraci nemá na testovanou plíseň žádný vliv, a proto je nutné hledat roztoky jiné.

Hodnocení smáčivosti plísní poskytuje informaci o tom, jak snadno nebo obtížně se sanitační roztok dostane do kontaktu s koloniemi plísní a jaké je riziko, že budou spory plísní sanitačním roztokem přenášeny dále do provozu.

Při hodnocení „-“ (plíseň se sanitačním roztokem smáčí velmi obtížně až vůbec) je použití daného sanitačního roztoku neefektivní, a to i v případě, že by byla difuzní agarovou metodou prokázána jeho antifungální aktivita. Tvoří-li plíseň v technologickém zařízení (např. ve spárách, škvírách, těsnění, apod.) nebo v prostředí mlékárny kolonie, sanitační roztok k plísní prakticky nepronikne. Jsou-li přítomny samotné spory plísně, budou ulpívat spíše na fázovém rozhraní sanitační roztok/vzduch nebo sanitační roztok/sanitovaný povrch, a tak mohou být sanitačním roztokem neusmrcené nesmočené spory dále roznášeny.

Hodnocení „0“ (plíseň se sanitačním roztokem smáčí s mírnými obtížemi) naznačuje, že se výběr sanitačního roztoku ubírá správným směrem, nicméně je zde ještě prostor ke zlepšení - zvýšení koncentrace aktivních látek, přidavek/zvýšení koncentrace látek snižujících povrchové napětí, zvýšení teploty, prodloužení doby působení (dle aplikačního rozmezí daného sanitačního roztoku).

Hodnocení „+“ (plíseň se sanitačním roztokem smáčí bez obtíží) indikuje, že byl z hlediska smáčivosti plísně vybrán vhodný sanitační roztok a podmínky jeho působení.

Hodnocení smáčivosti plísní je prováděno senzoricou, a proto by mělo být prováděno v panelu o n hodnotitelích, kde n nabývá hodnot 2 až 5. Výsledek hodnocení se pak uvede

jako počet hodnotitelů a součet jednotlivých hodnocení, přičemž každé „+“ je ohodnoceno jedním kladným bodem a každé „-“ jedním záporným bodem. Čím je hodnocení blíže hodnotám +n, 0 nebo -n, tím je interpretace spolehlivější. Jestliže se při hodnocení téhož sanitačního roztoku a téže plísně v souboru výsledků vyskytne současně hodnocení „+“ i „-“, mělo by být hodnocení zopakováno.

Aby byl sanitační roztok při eliminaci plísní dostatečně účinný, je nutné, aby byl zároveň antifungálně aktivní a měl dostatečnou smáčecí schopnost.

IV. Popis uplatnění metodiky

Certifikovaná metodika QJ1210300 CM 1 je primárně určená pro laboratoře poskytující analýzy, servis a poradenství mlékárnám, faremním zpracovatelům mléka a popř. i dalším potravinářským provozům a dále výrobcům a distributorům sanitačních prostředků pro potravinářství. Vzhledem k nenáročnosti na přístrojové vybavení a materiál může být metodika používána také přímo v provozních laboratořích mlékáren aj. potravinářských závodů. Avšak vzhledem k tomu, že jsou při práci pomnožovány plísně, a tak hrozí riziko kontaminace laboratoře a navazujících prostor plísněmi, lze doporučit, aby se tyto podniky obracely s prováděním analýz podle QJ1210300 CM 1 na specializované servisní laboratoře.

Certifikovaná metodika QJ1210300 CM 1 byla uplatněna u uživatele MILCOM a.s., který je připraven provést analýzy dle potřeb zájemců.

V. Ekonomické aspekty

Certifikovanou metodiku QJ1210300 CM 1 mohou provádět všechny laboratoře vybavené pro klasickou kultivační mikrobiologii. Náklady na zavedení metodiky se pak pohybují nanejvýš v řádu 1 tis. Kč, jakožto nákladů na zakoupení složek potřebných pro přípravu kultivačních půd.

Náklady na analýzu jednoho vzorku sanitačního roztoku vůči jednomu kmenu plísně jsou odhadovány na 1 tis. Kč, přičemž očekávat lze jednu zakázku ročně za cenu odhadem 20 tis. Kč, což přinese zisk 4 tis. Kč. Za 5 let je odhadován zisk servisní a poradenské laboratoře 20 tis. Kč.

Ekonomický přínos je očekáván zejména u konečných uživatelů (mlékárny, faremní zpracovatelé mléka aj. potravinářské provozy) - zvýšení kvality výrobků až zabránění ztrátám celých šarží výrobků v důsledku masivní kontaminace plísněmi. V závislosti na objemu produkce konečných uživatelů tak tato metodika může zabránit ztrátám řádově 0,1 tis. až 100 tis. Kč za každou zlikvidovanou šarží.

VI. Seznam použité související literatury

- CLSI M38-A2 (2008): Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA. ISBN 1-56238-668-9.
- ČSN EN ISO 707 (2009): Mléko a mléčné výrobky - Návod pro odběr vzorků. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, Česká republika.

- ČSN EN 1650 + A1 (2013): Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení fungicidního účinku nebo účinku proti kvasinkám chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik používaných v potravinářství, průmyslu, domácnostech a veřejných zařízeních - Metoda zkoušení a požadavky (fáze 2/stupeň 1). 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 desetinasobných ředění - Část 1: Všeobecné pokyny pro přípravu výchozí suspenze a desetinasobných ředění. Český normalizační institut, Praha, Česká republika.
- ČSN EN ISO 6887-5 (2010): Mikrobiologie potravin a krmiv - Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinasobných ředění - Část 5: Specifické pokyny pro vzorky mléka a mléčných výrobků. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, Česká republika.
- ČSN EN ISO 7218 (2008): Mikrobiologie potravin a krmiv - všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení. 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 EN ISO 14698-1 (2004): Čisté prostory a příslušné řízené prostředí - regulace biologického znečištění - Část 1: Hlavní principy a metody. Český normalizační institut, Praha, Česká republika.
- ČSN ISO 21527-1 (2009): Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní - Část 1: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody vyšší než 0,95. 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.
- Kotzamanidis, Ch., Kourelis, A., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., Yiangou, M. (2010): Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic *Lactobacillus* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 140, pp 154 - 163.
- Sørhung, T. (2011): Yeasts and moulds - Spoilage moulds in dairy products. V knize Fuquay, J.W. (Ed.): *Encyclopedia of dairy science*, Second edition, pp. 780 - 784. Elsevier, Amsterdam, Nizozemí. ISBN 978-0-12-374407-4.
- Šilhánková, L. (2008): Chemické složení buněčné stěny plísní. V knize Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*, pp. 98, 3. vydání. Nakladatelství Academia, Praha, Česká republika. ISBN 80-200-1024-6.
- Williams, A.P. (2006): Other types of spoilage moulds. V knize Blackburn, C. de W. (Ed.): *Food spoilage microorganisms*, pp. 488 - 503. CRC Press, Cambridge, Velká Británie. ISBN 0-8493-9156-3.

VII. Seznam publikací, které metodice předcházely

- Němečková, I., Mihalová, D., Kejmarová, M., Roubal, P.: Metody testování účinnosti sanitčních roztoků proti plísním. Mlékařské listy - Zpravodaj 152 (2015): III - VII.
- Němečková, I., Kunová, G., Chramostová, J., Lisová, I., Šalaková, A., Roubal, P. (2014): Příklady nových výrobků, technologií, analytických metod a dalších výsledků pro praktické využití mlékárnami. Sborník přednášek, pp. 81 - 84. Kroměřížské mlékařské dny, 17. - 18. 9. 2014, Kroměříž, Česká republika.
- Němečková, I., Hanušová, J., Havlíková, Š., Kvasničková, E., Kejmarová, M., Kunová, G., Roubal, P., Purkrťová, S., Jebavá, I., Kalhotka, L., Šustová, K.: Mikrobiální původci vad mlékárenských výrobků. Kroměřížské mlékařské dny 2012, 19. - 20. 9. 2012, Kroměříž, Česká republika.
- Drbohlav, J., Roubal, P., Němečková, I., Pechačová, M., Peroutková, J., Hanzalová, D.: Živné médium na bázi sýra k testování růstu sýrařských plísní. Ověřená technologie, uživatel MILCOM a.s., 3. 8. 2010.
- Pechačová, M., Peroutková, J., Němečková, I., Roubal, P.: Sýrová matrice k testování kmenů plísní používaných v potravinářském průmyslu. Úřad průmyslového vlastnictví. Číslo přihlášky: 2009-21833, číslo dokumentu: 20347, datum zápisu: 9. 12. 2009.

VIII. Přílohy, dokumenty a doklady

- Smlouva s uživatelem MILCOM a.s.
- Posudek odborníka v daném oboru - Ing. Dagmar Skalníková, LACRUM, Velké Meziříčí, s.r.o.
- 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 QJ1210300 CM 1 vznikla s finanční podporou NAZV, č. projektu QJ1210300 v programu KUS.