

1 Souhrn

Mnoho mikrobiologických laboratoří, ať už ve farmaceutických firmách či na půdě hygienických stanic a firem zabývajících se výrobou potravin používá k analýze velkého množství mikrobiologických vzorků tradiční techniky založené na kultivaci příslušné kultury. Tyto techniky trvají mnoho hodin až dnů než získáme výsledek. Jsou pomalé a nejsou vhodné pro nekultivační mikroorganismy. Kultivačně založené techniky navíc neposkytnou skutečnou informaci o fyziologickém stavu organismu in situ, který je důležitý v průmyslové výrobě mnoha mikrobiálních produktů (1) a často při vysokém počtu mikroorganismů, kdy není možno počet mikroorganismů stanovit, prodlužuje se tak celá doba kultivace o další ředění vzorku a o čas nárůstu daného mikroorganismu.

Průtoková cytometrie umožňuje získání skutečného mikrobiálního stanovení jednotlivých mikroorganismů bez závislosti na typu mikrobiální kultury. Nicméně, průtoková cytometrie nebyla široce využívána pro obvyklou mikrobiální analýzu. Důvodem je hlavně vysoká cena a složitosti vybavení přístroje, nutnost zapracování průtokového cytometru a nedostatek zkušebních vzorků s vhodnými biologickými vlastnostmi pro konkrétní použití. Mnoho moderních přístrojů jsou nyní relativně jednoduše obsluhovatelné, díky zlepšení uživatelského rozhraní (1). V současné době toto vybavení je velkou měrou omezeno na jednoduché rozборы, například zkouška čistoty pro přítomnost celkového nebo životaschopného množství mikroorganismů. Přístroj, který poskytl výsledky této práce se nazývá BactiFlow ALS. Tento přístroj poskytuje velké množství aplikací pro stanovení mnoha vzorků z nejrůznějších průmyslových odvětví. Využili jsme tyto aplikace: stanovení celkového počtu mikroorganismů ve farmaceutických produktech, stanovení počtu kvasinek a plísní ve farmaceutických produktech a stanovení celkového počtu mikroorganismů ve vodě. Celá práce byla pojata jako srovnávací metoda mezi průtokovou cytometrií a klasickou kultivační metodou. V obou případech jsme měřili mikrobiologicky čisté farmaceutické produkty a vodu např. acidum citricum, natrii chloridum, aroma rubi idaei a další. Mikrobiologicky čisté vzorky jsme postupně zatěžovali mikroorganismy v koncentraci 10^2 , 10^3 a 10^4 CFU/ml. Použili jsme tyto mikroorganismy - Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Candida albicans.

Tato technologie umožňuje selektivně označit specifické druhy mikroorganismů, které prokazují metabolickou aktivitu a neporušenou buněčnou membránu. Mikroorganismy mohou být obsaženy v různých formách (např. voda, bláto, jídlo, nápoje) a tyto formy mohou být v přírodě vysoce proměnné (např. voda z vodovodu ve srovnání s říční vodou). Mnoho forem má vysoké pozadí autofluorescence (např. řasy a minerály ve vodních vzorcích) nebo se mohou nespecificky poutat do používaných fluorescenčních biologických reagensů (např. bílkovinné micely v mléce). Formulace biologických reagensů a vzorově předběžné úpravy jsou rozhodující pro vývoj vhodných mikrobiologických zkoušek čistoty. Vývojové trendy ve vybavení a biologických reagensů pro mikrobiologické aplikace jsou revidovány se specifickými příklady z environmentální nebo průmyslové mikrobiologie. Zvážení širšího rozvoje mikrobiálních zkoušek čistoty díky cytometrii je dnes rozhodující v mnoha směrech (1).