

# **Slazená kondenzovaná smetana z pohledu kontaminace koliformními bakteriemi**

Michal Rybenský, DiS.

---

Bakalářská práce  
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2011/2012

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michal RYBENSKÝ, DiS.**

Osobní číslo: **T09145**

Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Slazená kondenzovaná smetana z pohledu kontaminace koliformními bakteriemi**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Hlavní znaky, výskyt a význam koliformních bakterií v potravinářském průmyslu
2. Technologie výroby slazené kondenzované smetany
3. Možné zdroje kontaminace slazené kondenzované smetany koliformními bakteriemi
4. Výskyt koliformních bakterií ve výrobku

### II. Praktická část:

1. Příprava suspenze koliformních bakterií
2. Zaočkování do slazené kondenzované smetany
3. Sledování postupného úbytku
4. Zpracování výsledků

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

1. KLABAN, D. V. Svět mikrobů: malý mikrobiologický slovník. Hradec Králové: GAUDEAMUS, 1999, 303 s. ISBN 80-7041-639-4.
2. ŠILHÁNKOVÁ, L. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. vydání. Praha: Academia, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
3. ATLAS, Ronald M. Microorganisms in our World. St. Louis: Mosby-Year Book, 1995. ISBN 08-8016-7804-8.
4. LOBOVSKÁ, Alena. Infekční nemoci: Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2002, 263 s. ISBN 80-246-0116-8.
5. GÖPFERTOVÁ, Dana, Daniela JANOVSÁ a Karel DOHNAL. Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena. 2. vydání. Praha: Triton, 1999, 134 s. ISBN 80-7254-049-1.
6. JIČÍNSKÁ, E. a J. HAVLOVÁ. Patogenní mikroorganismy v mléce a mléčných výrobcích. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1995, 56 s. ISBN 80-85120-47-X.
7. KLABAN, V. Ilustrovaný mikrobiologický slovník. Jihlava: Okresní hygienická stanice Jihlava, 2005, 38 s. ISBN 80-7262-341-9.
8. LUKÁŠKOVÁ, J. Hygiena mléka a mléčných výrobků: praktická cvičení. Brno: Ediční středisko VFU, 1995.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Jaroslava Lovasová  
Kroměříž

Datum zadání bakalářské práce:

6. ledna 2012

Termín odevzdání bakalářské práce:

21. května 2012

Ve Zlíně dne 15. února 2012

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
děkan



  
doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.  
ředitel ústavu

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl jsem seznámen s tím, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně .....

.....

---

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce je věnována sledování koliformních bakterií ve slazené kondenzované smetaně.

Část teoretická je zaměřena na výskyt koliformních bakterií v potravinářském průmyslu, zejména v mlékárenství. Je zde popsána technologie výroby zahuštěné kondenzované smetany „Jesenka“.

Část praktická se zabývá sledováním životaschopnosti koliformních bakterií – *Escherichia coli* a *En. aerogenes*, naočkovaných do zahuštěné slazené smetany. Pokles těchto bakterií ve výrobku je dán nepříznivými životními podmínkami – vysoký osmotický tlak vzniklý přidávkem cukru a zahuštěním výrobku a dále anaerobní prostředí v tubách.

Koliformní bakterie ve vzorku č. 1 a č. 2 byly stanoveny kultivační metodou na živné půdě Chromocult. Výsledky byly graficky znázorněny. Z grafů vyplývá, že nejprve došlo k rychlému poklesu koliformních bakterií, následně k částečnému přizpůsobení danému prostředí a zpomalení úbytku až po úplné vymizení těchto bakterií z výrobku.

Klíčová slova:

Koliformní bakterie, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, zahuštěná slazená smetana

## **ABSTRACT**

The submitted bachelor work deals with pursuing coliform bacteria in sweetened condensed cream.

The theoretical part aims at occurrence of coliform bacteria in food industry, especially the dairy industry. The work describes the technology of sweetened condensed cream production called Jesenka.

The practical part follows the viability of coliform bacteria - *Escherichia coli* and *En. aerogenes* inoculated in sweetened condensed cream. Decline in number of these bacteria is caused by adverse living conditions – high osmotic pressure caused by addition of sugar, thickening of the product and anaerobic conditions in the tubes.

Coliform bacteria in samples 1 and 2 were determined by method of cultivation in the culture medium called Chromocult. The results have been put in graphs. These show that there was first the fall in the number of coliform bacteria, then they partially adapted themselves to the given surroundings and finally they disappeared from the product.

Keywords:

Coliform bacteria, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, sweetened condensed cream

Děkuji Ing. Jaroslavě Lovasové za odborné vedení, ochotu, poskytnutí cenných rad a spolupráci při kompletování své práce.

Děkuji také všem pracovníkům Mlékárny Hlinsko, s.r.o., jmenovitě panu Ing. Milanu Sodomkovi, paní Ing. Daně Navrátilové a panu Zdeňku Joskovi za ochotu, odborné rady a pomoc v průběhu práce a také za vstřícnost a vytvoření dobrých pracovních podmínek.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.



# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>12</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>13</b>
<b>1 MIKROORGANIZMY A POTRAVINY</b> .....	<b>14</b>
1.1 Hlavní činitelé vnějšího prostředí .....	14
1.1.1 pH prostředí.....	14
1.1.2 Vodní aktivita.....	15
1.1.3 Osmotický tlak .....	16
1.1.4 Teplota.....	16
<b>2 BAKTERIE ČELEDI ENTEROBACTERIACEAE</b> .....	<b>17</b>
2.1 BAKTERIE KOLIFORMNÍ .....	17
2.1.1 Rod Escherichia .....	18
2.1.2 Rod Citrobacter .....	18
2.1.3 Rod Klebsiella.....	18
2.1.4 Rod Enterobacter.....	18
2.1.4.1 Enterobacter sakazakii .....	19
2.2 ESCHERICHIA COLI .....	21
2.2.1 Výskyt .....	21
2.2.2 Fyziologie.....	21
2.2.3 Biochemie .....	21
2.2.4 Morfologie.....	22
2.2.5 Antigenní struktury .....	22
2.2.6 Taxonomie.....	22
2.2.7 Význam .....	23
2.2.8 Patogenita.....	23
2.2.9 Léčba .....	24
2.3 ESCHERICHIA COLI A STŘEVNÍ INFEKCE .....	24
2.3.1 Enteropatogenní E. coli - EPEC.....	24
2.3.2 Enterotoxigenní E. coli - ETEC .....	25
2.3.3 Enteroinvazivní E. coli - EIEC.....	25
2.3.4 Enterohemoragické E. coli - EHEC .....	26
2.3.5 Attaching and effacing E. coli - A/EEC.....	26
2.3.6 Enteroagregativní E. coli – EAEC .....	26
2.3.7 Escherichia coli O157 .....	27
<b>3 VÝROBA KONDENZOVANÉ SLAZENÉ SMETANY</b> .....	<b>29</b>
3.1 SUROVINY PRO VÝROBU ZAHUŠTĚNÉ SLAZENÉ SMETANY.....	31
3.2 PŘÍJEM SYROVÉHO MLÉKA .....	31
3.2.1 Příjem syrového mléka.....	31
3.2.2 Uskladnění syrového mléka v úšchovných tancích .....	32
3.2.3 Odstředování a chlazení syrového mléka .....	32
3.2.4 Pasterace smetany .....	32
3.2.5 Standardizace .....	32
3.3 VLASTNÍ VÝROBA ZAHUŠTĚNÉ SLAZENÉ SMETANY .....	32
3.3.1 Pasterace a předhušťování.....	32
3.3.2 Homogenizace.....	33

3.3.3	Pitná voda.....	33
3.3.4	Rozpouštění cukru.....	33
3.3.5	Pasterace cukerného sirupu.....	33
3.3.6	Dohušťování.....	33
3.3.7	Laktóza.....	34
3.3.8	Chlazení, krystalizace.....	34
3.3.9	Skladování zahuštěné slazené smetany.....	34
3.3.10	Plnění.....	34
3.3.11	Balení – kontrola.....	34
3.3.12	Skladování výrobků.....	35
3.3.13	Expedice hotových výrobků.....	35
<b>4</b>	<b>MIKROBIOLOGIE ZAHUŠTĚNÝCH MLÉČNÝCH VÝROBKŮ.....</b>	<b>36</b>
4.1	MIKROBIOLOGIE SLAZENÉHO KONDENZOVANÉHO MLÉKA, SMETANY.....	36
4.2	MIKROBIÁLNÍ VADY.....	37
4.2.1	Tvorba plynu (bombáže).....	37
<b>5</b>	<b>MOŽNOSTI ZDROJŮ A VÝSKYTU KOLIFORMNÍCH BAKTERIÍ.....</b>	<b>38</b>
5.1	ZDROJE KONTAMINACE MLÉKA.....	38
5.2	ZDROJE KONTAMINACE PŘI VÝROBĚ ZAHUŠTĚNÉ SLAZENÉ SMETANY.....	38
<b>6</b>	<b>HODNOCENÍ KVALITY ZAHUŠTĚNÝCH SLAZENÝCH MLÉČNÝCH VÝROBKŮ.....</b>	<b>40</b>
6.1	ODBĚR VZORKŮ.....	40
6.2	PŘÍPRAVA VZORKŮ K ROZBORU.....	40
6.3	SMYSLOVÉ ZKOUŠENÍ.....	40
6.4	FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VYŠETŘENÍ.....	41
6.5	MIKROBIOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ.....	41
6.6	TERMOSTATOVÁ ZKOUŠKA.....	41
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>KULTIVAČNÍ VYŠETŘENÍ.....</b>	<b>43</b>
7.1	METODY ZPRACOVÁNÍ.....	44
<b>8</b>	<b>STANOVENÍ KOLIFORMNÍCH BAKTERIÍ V ZAHUŠTĚNÉ SLAZENÉ SMETANĚ.....</b>	<b>45</b>
8.1	PŘÍPRAVA SUSPENZE KOLIFORMNÍCH BAKTERIÍ.....	45
8.1.1	Stanovení počtu koliformních bakterií metodou roztěru.....	45
8.1.2	Výpočet množství bakterií v 1 ml suspenze.....	45
8.1.3	Stanovení počtu bakterií plotnovou metodou.....	46
8.2	PŘÍPRAVA VZORKU Č. 1 A VZORKU Č. 2.....	46
8.3	VLASTNÍ POSTUP PŘI ZPRACOVÁNÍ VZORKU.....	47
8.3.1	Otevírání obalů vzorků.....	47
8.3.2	Navážka (odměření) vzorku.....	48
8.3.3	Homogenizace vzorku.....	48
8.3.4	Ředění vzorku.....	48
8.3.5	Očkování do živné půdy.....	48
8.3.6	Kultivace.....	50
8.3.7	Odečítání a hodnocení výsledků.....	50

8.4	CHROMOGENNÍ ŽIVNÁ PŮDA.....	51
<b>9</b>	<b>POČET KOLIFORMNÍCH BAKTERIÍ V ZAHUŠTĚNÉ SLAZENÉ SMETANĚ .....</b>	<b>53</b>
9.1	ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ PRO VZOREK Č. 1 DO TABULKY.....	53
9.2	GRAFICKÉ ZPRACOVÁNÍ VZORKU Č. 1.....	55
9.3	ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ PRO VZOREK Č. 2 DO TABULKY.....	57
9.4	GRAFICKÉ ZPRACOVÁNÍ VZORKU Č. 2.....	59
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>61</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>63</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>67</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>68</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>69</b>

## ÚVOD

Patogenní mikroorganismy jsou běžně přítomny v ekosystému prvovýroby. Některé z nich jsou kohabitanty hospodářských zvířat (kůže, respirační a gastrointestinální trakt) a tvoří normální složku kontaminující mikroflóry surovin.

Mikrobiologická kontrola – monitorování výskytu patogenních mikroorganismů ve výrobním prostředí, meziproduktech výroby a finálních výrobcích – je jen jedním z opatření. Zjištění přítomnosti nebo nepřítomnosti patogenního mikroorganismu ve vzorcích z potravin a z prostředí kontroluje efektivnost všech ostatních preventivních opatření (pasterace, chlazení, dezinfekce aj.).

Vzdor nepřístupnosti kultivace patogenních mikroorganismů v mikrobiologických laboratorních technické kontroly v závodech se v těchto laboratorních někdy kultivují, protože při rutinních stanoveních nepatogenních mikrobiálních ukazatelů hygienické úrovně výroby nelze jejich případnému vykultivování zabránit. Některé patogenní bakterie – salmonely, listerie, stafylokoky, patogenní varianty *Escherichia coli*, *Bacilu cereus* – rostou dobře při 20 až 30 °C na nutričně bohatých půdách a mohou tedy být vykultivovány při stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů (CPM). Patogenní enterobakterie lze vykultivovat i selektivně při stanovení počtu koliformních bakterií plotnovou metodou, jako typické nebo atypické koliformní kolonie (enteropatogenní kmeny *E. coli*, yersinie, laktózo-pozitivní salmonely) nebo nekoliformní nezbarvené kolonie (salmonely, shigely), kterým však obvykle není věnována další pozornost.

Tato bakalářská práce je zaměřena na sledování výroby slazené zahuštěné smetany „Jesenka“ a další použití k mikrobiologickému rozboru. Po cílené kontaminaci této smetany koliformními bakteriemi je pozorováno jejich chování a životaschopnost v daném prostředí. Dále je v práci uveden možný zdroj kontaminace a výskyt koliformních bakterií v průběhu výroby slazené kondenzované smetany.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 MIKROORGANIZMY A POTRAVINY

Mikroorganismy jsou nezbytnou součástí životního prostředí i potravin. V potravinářském průmyslu jsou často MO rozdělovány na prospěšné a škodlivé. Škodlivé vyvolávají kažení potravin. Prospěšné jsou záměrně využívány ve zpracovatelských odvětvích, např. v mlékárenství, pekařství, pivovarnictví, lihovarnictví apod.

V boji proti škodlivým mikrobům a patogenům v potravinách jsou využívány poznatky vlivu vnějších faktorů na jejich aktivitu. Na prvním místě jsou užívány postupy mechanické vedoucí k omezení kontaminace potravin při jejím vlastním zpracování. Spočívají v odstraňování prachu, nečistot, zbytků organického znečištění ze strojů, inventáře a úklidu prostředí.

Při výrobě potravin a pokrmů jsou voleny takové pracovní a technologické operace, aby mikroorganismy kontaminující surovinu byly usmrceny. Především se jedná o použití dostatečně vysoké teploty a doby jejího působení. Dále jsou voleny specifické požadavky pro zacházení s již vyrobenou potravinou, a to například skladování za teplot neumožňujících pomnožení mikrobů (teploty pod + 10 °C nebo nad + 65 °C). Teplota podmiňuje intenzitu života mikroorganismů. Tento snadno ovlivnitelný faktor je využíván v potravinářském průmyslu (pasterace mléka aj.) a běžně v kuchyňské praxi při výrobě pokrmů.<sup>[8]</sup>

Potraviny obsahují živiny, které mikroorganismům umožňují získávat látky potřebné pro svůj růst a tvorbu nových buněk. Složitější živiny rozkládají na jednodušší látky a tato metabolická aktivita je doprovázená změnou (kažením) potravin. Jako živé organismy potřebují ke své plné životní aktivitě vhodné prostředí. Mikroorganismy mají schopnost rychle se přizpůsobovat novým podmínkám prostředí a jsou schopny odolávat jeho změnám. Pro svoji nepatrnou velikost, která se pohybuje kolem jednoho mikrometru (0,000001 m), jsou pouhým okem neviditelné. Mezi hlavní činitele vnějšího prostředí, ovlivňující možnost a intenzitu života MO, patří: pH, obsah vody, osmotický tlak, teplota, výživa, oxidoredukční potenciál, povrchové napětí, záření, hydrostatický tlak a jiné.<sup>[2]</sup>

### 1.1 Hlavní činitele vnějšího prostředí

#### 1.1.1 pH prostředí

Růst MO i jejich biochemická činnost jsou silně ovlivňovány koncentrací vodíkových iontů v prostředí. Každý mikrobiální druh se může rozmnožovat pouze v určitém roz-

mezí pH. Např. pro optimální růst bakterie *E. coli* je prostředí s pH 6,0 – 8,0 (min. pH je 4,3 a max. pH je 9,5).

### 1.1.2 Vodní aktivita

Obsah vody v prostředí má rozhodující vliv na vývoj MO. Živiny přístupné buňkám se ve vodě rozpouštějí a s vodou se odstraňují z buňky zplodiny životní činnosti MO. Vysušením prostředí se zastaví životní činnost mikrobů, ale úplně se nezničí, neboť jsou schopny si po určitou dobu podržet životaschopnost.

Mikroorganismy však nemohou využít celý obsah vody tak, jak se v potravinách vyskytuje. Část vody je vázána osmotickými silami a adsorpcí na některé součásti potravin a právě tato voda je MO nepřístupná. Měřítkem onoho množství vody, které není potravinami vázáno, a jež je tedy přístupné MO, se stala aktivita vody ( $a_w$ ).

Ta je vyjádřena zlomkem:  $a_w = P / P_o$ , kde  $P$  je tlak vodních par potravin,  $P_o$  je tlak vodní páry nad vodou při stejné teplotě,  $a_w$  je tedy vyjádřeno v hodnotách 1 a níže.

K faktorům určujícím velikost  $a_w$  náleží:

- a) celkový obsah vody v potravine
- b) množství a vlastnosti ve vodě rozpuštěných látek, jako například elektrolytů, kyselin, sacharidů, rozpustných dusíkatých látek
- c) způsob a mechanismus, jakým je voda v potravinách strukturálně vázána na určité komponenty potravin, například sacharidy, bílkoviny atd.

Většina MO zodpovědná za rozklad potravin a též patogenní mají růstové optimum nad  $a_w = 0,98$ . Zvláště citliví na snížení  $a_w$  jsou gramnegativní MO. Většina enterobakterií zastavuje růst pod  $0,95 a_w$ . S určitými výjimkami jsou grampozitivní MO všeobecně tolerantnější vůči nižším hodnotám  $a_w$  než gramnegativní.

Technologicky je možno snížit aktivitu vody různými způsoby, zejména vysušením nebo odvodněním, zvýšením koncentrace elektrolytů – přidavkem soli a přidáním dalších rozpustných substrátů, zejména sacharidů.

Např. minimální  $a_w$ , při níž patogenní mikroflóra roste (při téměř optimálních teplotách) je u *Escherichia coli*  $0,95$ . Zahuštěné mléko má  $a_w = 0,93 - 0,98$ .<sup>[10]</sup>

### 1.1.3 Osmotický tlak

Zvýšení koncentrace rozpuštěných látek v roztoku vede ke zvýšení jeho osmotického tlaku. Také v mikrobiální buňce je určitý osmotický tlak, neboť v buněčné šťávě je rozpuštěna řada solí a meziproduktů metabolismu. Za normálních podmínek se vnitrobuněčný osmotický tlak většiny bakterií pohybuje v rozmezí od 0,35 do 0,6 MPa.

### 1.1.4 Teplota

Vliv na životaschopnost koliformních bakterií má i teplota. Teplota vnějšího prostředí je jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují rychlost rozmnožování mikroorganismů i možnost jejich života. Rozeznáváme tři základní body teploty: minimální teplotu, tj. nejnižší teplotu, při níž se daný druh rozmnožuje ještě zjizitelnou rychlostí, optimální teplotu, při níž se rozmnožuje největší rychlostí, a maximální teplotu, tj. nejvyšší teplotu, při které je schopen se ještě rozmnožovat.

Teplota prostředí podmiňuje intenzitu aktivity množení mikrobů. Tepelné rozmezí jejich růstu se pohybuje v širokém rozpětí od  $-10$  po  $+50$  °C. Teploty v intervalu tohoto rozpětí nevedou ke zničení mikrobů. Teprve teplota nad  $+70$  °C, působící v delším časovém intervalu, vede k jejich usmrcení. Teplota hluboko pod bodem mrazu mikroby neusmrcuje. Stejně tak jako teplota blízká  $0$  °C pouze jejich životní projevy zpomaluje.

Při teplotě optima prostředí mezi  $+20$  až  $+40$  °C za příznivého působení dalších faktorů prostředí (voda, pH, přístup vzduchu aj.) probíhá množení (růst) mikroorganismů dělením maximální rychlostí v exponenciální závislosti na čase. Tento nárůst mikrobiálního znečištění způsobuje kažení, případně zdravotní závadnost potravin. Skupiny potravin, které svými vlastnostmi umožňují rychlé pomnožování mikroorganismů, se označují jako potraviny lehce kazivé nebo rizikové. Do rizikových skupin potravin se řadí: maso, mléko, cukrářské a lahůdkářské výrobky, zelenina a ovoce. Pro svoji lehkou kazivost vyžadují skladování při teplotách kolem  $0$  °C.<sup>[6]</sup>



## 2 BAKTERIE ČELEDI ENTEROBACTERIACEAE

Čeď Enterobacteriaceae, zahrnující gramnegativní střevní tyčinky, má velký význam z hygienického hlediska, a proto je jí v potravinářství věnována mimořádná pozornost. Jde o nesporetné tyčinky, peritrichní nebo bez bičíků, které mají respirační i kvasný metabolismus. Většinou jsou prototrofní. Vedle nepatogenních a podmíněně patogenních rodů sem patří i obávané střevní patogeny (*Salmonella*, *Shigella*), patogeny dýchacích cest a fytopatogeny.<sup>[2], [14]</sup>

Většina těchto mikrobů žije ve střevech obratlovců, odkud se dostávají do okolního prostředí, odpadních vod a hnojené půdy. Některé tvoří součást obligátní mikroflóry střeva.

### 2.1 Bakterie koliformní

Náleží do čeledi Enterobacteriaceae. Představují gramnegativní tyčinky aerobní nebo fakultativně anaerobní, netvořící spory, které zkvašují laktózu s tvorbou plynů CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>, kyselin, např. kyseliny mléčné a octové, a aldehydu. Vykazují negativní test na cytochromoxidasu a produkují enzym zvaný beta-galaktosidasa. Konkrétně do této skupiny koliformů patří *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, rod *Citrobacter* a některé druhy rodu *Klebsiella*. Dříve se tato skupina bakterií označovala jako „coliaerogenes“.<sup>[14], [17]</sup>

Koliformní bakterie mají přímý vztah k fekálnímu znečištění, i když to nemusí platit obecně. Koliformní bakterie se v potravinářských výrobcích a surovinách, na předmětech denního užívání a v pitné, povrchové i odpadní vodě jednoduše zjišťují a stanovují. Při hodnocení jejich počtu se vychází z určitých hygienických předpisů nebo norem. Posuzování jejich přítomnosti a množství však někdy v praxi naráží na jisté nedorozumění. To pochází z jejich triviálního pojmenování „fekální bakterie“, z čeho se někdy nesprávně usuzuje, že potraviny, které tyto bakterie obsahují, byly anebo jsou znečištěné fekáliemi.<sup>[17]</sup>

Dříve se koliformní bakterie považovaly za striktní čili absolutní indikátory čerstvého znečištění živočišnými exkrementy. Ovšem později bylo prokázáno, že se mohou také nacházet i ve vodách znečištěných organickými látkami bez přímé souvislosti s fekální kontaminací. Z tohoto důvodu se také doporučilo nahradit název fekální koliformní bakterie přesnějším označením – termotolerantní koliformní bakterie, neboť snášejí, čili tolerují teplotu 43 °C, při které mohou růst a rozmnožovat se. Jejich stanovení se například doporučuje k hodnocení účinnosti dezinfekce při úpravě pitných vod.<sup>[1]</sup>

### 2.1.1 Rod *Escherichia*

Patří sem tyčinky, které zkvašují kromě laktózy také glukózu, většinou za tvorby plynu. Rod bakterií obsahující zvláště tyto druhy: *Escherichia coli*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* a *E. vulneris*, z nichž však nejvýznamnějším a nejvíce prozkoumaným druhem je právě *E. coli*.<sup>[9]</sup>

### 2.1.2 Rod *Citrobacter*

Rod bakterií, který je považován za normálního (fyziologického) obyvatele střevního systému lidí a zvířat. Byl také prokázán ve střevech ptáků, obojživelníků a některého hmyzu. Dále se například nachází v půdách, ve vodách, potravinách atd. Ve vyšších koncentracích může způsobit onemocnění oslabených jedinců.<sup>[1]</sup>

Rod *Citrobacter* zahrnuje v podstatě tři druhy: *Citrobacter amalonaticus*, *C. freundii* a *C. koseri*, dříve *C. diversus*. Poslední dva druhy mohou způsobit průjmovité onemocnění lidí, většinou lehčího rázu. Celý rod má název od toho, že má schopnost využívat citrátu jako jediného zdroje uhlíku. Touto schopností, využívat citrát z prostředí, se liší od rodu *Escherichia*. Tvoří gramnegativní tyčinky náležející do čeledi *Enterobacteriaceae*. V hygienické a klinické mikrobiologii jsou druhy *C. freundii* a *C. koseri* považovány za fakultativně patogenní mikroorganismy.<sup>[9]</sup>

### 2.1.3 Rod *Klebsiella*

Rod bakterií, které jsou nepohyblivé, opouzdřené, tyčinkovitého tvaru a silnější než ostatní enterobakterie. Vyskytují se ve vodě, půdě, zaživacím i dýchacím ústrojí lidí a zvířat. Protože klebsiely nemají bičíky, postrádají tzv. H-antigeny.

Nejznámějším zástupcem je *Klebsiella pneumoniae*, jejíž opouzdřené kmeny jsou velmi nebezpečné. Mohou vyvolat bronchopneumonie, plicní abscesy a septikémie, často s nejhorším průběhem. Také způsobují infekci močových cest.

Druh *Klebsiella planticola* se obvykle nachází na zelenině, semenech a listech různých rostlin i ve vodě.<sup>[1]</sup>

### 2.1.4 Rod *Enterobacter*

Doslovně „střevní“ bakterie, z řeckého enteron = střevo a baktron = tyč, hůl. Dříve se tento rod nazýval *Aerobacter*. Patří do něho zejména tyto druhy *Enterobacter aeroge-*

nes, *E. cloacae* a ještě další, méně důležité a známé jako například *E. amnigenus*, *E. asburiae*, *E. cancerogenus*, *E. gergoviae*, *E. intermedius* a *E. sakazakii*.

Rod *Enterobacter* se v přírodě vyskytuje prakticky všude, také v zažívacím traktu lidí a zvířat. Z hlediska hygienické mikrobiologie patří *E. aerogenes* a *E. cloacae* ke kolidárním mikroorganismům. Z pohledu klinické mikrobiologie mohou zvláště poslední dva jmenované druhy způsobovat infekce močových cest nebo lehčí průjmy, zejména u malých dětí.<sup>[1,14]</sup>

Z rodu *Enterobacter* je nejrozšířenější druh *Enterobacter aerogenes*, který se vyskytuje ve střevním traktu zdravých zvířat i lidí a je také velmi rozšířen v přírodě. Od *E. coli* se liší využíváním citrátu jako zdroje uhlíku a tvorbou acetoinu (tj. 3-hydroxy-2-butanonu) a 2,3--butandiolu při kvašení cukrů.<sup>[9]</sup>

#### 2.1.4.1 *Enterobacter sakazakii*

Žlutě pigmentovaný *Enterobacter cloacae*“ byl v roce 1980 rozpoznán jako nový druh mikroorganismu a přejmenován na *Enterobacter sakazakii*. V roce 2007 bylo zjištěno, že *Enterobacter sakazakii* se skládá z více druhů s rozlišným genotypem a fenotypem. Bylo analyzováno 210 izolovaných kmenů *E. sakazakii* s využitím molekulárně-biologických technik a navržena reklasifikace tohoto organismu do nového rodu *Cronobacter*, jenž obsahuje nejméně šest různých druhů a řadí se mezi *Enterobacteriaceae*.

Současná platná potravinářská legislativa vycházející z nařízení Evropské komise však dosud používá název *Enterobacter sakazakii*, místo *Cronobacter* spp. V literatuře se však zatím používají nejednotně oba názvy, *Enterobacter sakazakii* a *Cronobacter* spp., jako synonyma, mimo jiné proto, že zatím nejsou propracovány metody detekce *Cronobacter* spp. a rovněž není prozkoumána patogenita jednotlivých druhů tohoto nového rodu.<sup>[30]</sup>

*Enterobacter sakazakii* je fakultativně anaerobní, nesporotvorná, krátká gramnegativní tyčinka, pohyblivá díky přítomnosti peritrichálních bičků. Velikost vegetativních buněk je v průměru 0,5 – 1,5 x 2 – 3 μm. Na neselektivních půdách tvoří žluté nebo bezbarvé kolonie dvou různých morfologií:

- a) první typ jsou suché nebo mukoidní, vroubkované kolonie
- b) druhý typ jsou kolonie hladké

*E. sakazakii* je oxidáza negativní, kataláza pozitivní, redukuje nitráty, jako zdroj uhlíku využívá citrát, hydrolyzuje eskulin a arginin, dekarboxyluje L-ornitin. Fermentuje glukózu a další cukry za tvorby kyselin. Obvyklá je i aktivita enzymu  $\alpha$ -glukosidázy.

Virulence jednotlivých kmenů *E. sakazakii* je značně rozdílná, avšak přesné mechanismy nejsou zatím známy. Provedené studie ukazují, že bakterie jsou schopny průniku do střevních buněk a přežívají v makrofázích. Dále jsou schopny invaze do savčích endoteliálních buněk. Některé kmeny produkují molekuly podobné enterotoxinům.

Některé kmeny *E. sakazakii* produkují extracelulární heteropolysacharidové pouzdro, které bakteriím napomáhá přilnout k povrchům a následně vytvářet biofilm. Předpokládá se, že pouzdro hraje roli v ochraně bakterií proti vysychání, protože polysacharid je vysoce hydratovaný.

*Enterobacter sakazakii* je oportunní patogen, který napadá především novorozence a imunitně oslabené jedince. Rizikovou skupinou jsou předčasně narození novorozenci s nízkou porodní váhou a potlačenou imunitou ve věku od 3 dnů do 4 let.

Onemocnění novorozenců se vyskytuje vzácně, mívá však závažný a rychlý průběh s vysokou mírou úmrtnosti (30 – 80 %). Klinické příznaky zahrnují sepsi (otrava krve), meningitidu (zánět mozkových blan) a nekrotizující enterokolitidu. Nejčastější formou onemocnění je meningitis. Mortalita novorozenců trpících meningitidou je 40 - 80 %, smrt následuje během hodin po prvních projevech symptomů onemocnění. U jedinců, kteří zánět mozkových blan přežijí, se obvykle vyvinou nevratná postižení, včetně závažných neurologických komplikací. <sup>[31], [32]</sup>

U dospělých pacientů zahrnuje onemocnění *E. sakazakii* široké spektrum příznaků - zánět spojivek, zánět žlučového a močových cest, infekce ran, zápal plic.

Do mikrobiologického rizika sušené dětské výživy byl v roce 2004 zahrnut také *Enterobacter sakazakii*. Kromě sušené mléčné kojenecké výživy, která je typickým vehikulem, byl *E. sakazakii* izolován i z dalších potravin živočišného i rostlinného původu (např. luštěniny, cereálie, ovocné a zeleninové saláty, masné výrobky, syrové mléko, čerstvé sýry).

*E. sakazakii* roste v širokém rozmezí teplot 6 – 47 °C, optimum je 39 °C. Bakterie je citlivá k záhřevu, pasterační teploty ji devitalizují. Některé kmeny mohou mít zvýšenou termo-toleranci díky produkci tzv. heat-shock proteinů. <sup>[30]</sup>

*E. sakazakii* má dobrou odolnost k nízkému pH. Je schopen přežít v sušených mléčných výrobcích při vodní aktivitě cca 0,2 řadu měsíců. Vysoká odolnost k osmotické-

mu stresu je v tomto případě připisována přítomnosti polysacharidového ochranného pouzdra.<sup>[31]</sup>

## 2.2 Escherichia coli

*Escherichia coli* (velmi často jen zkráceně *E. coli*) je nejprozkoumanějším mikrobiálním druhem, neboť slouží jako modelový organismus pro biochemické, genetické i fyziologické studie. Je prvním bakteriálním druhem, u něhož byla pozorována a prostudována konjugace (spájení) buněk a výměna genetického materiálu. Jeho chromozom byl podrobně zmapován a také bakteriofágy, které jej napadají, patří k nejprostudovanějším.<sup>[2]</sup>

Byla objevena německo-rakouským pediatrem a bakteriologem Theodorem Escherichem v roce 1885.<sup>[23]</sup>

### 2.2.1 Výskyt

*Escherichia coli* je fakultativně anaerobní gramnegativní bičíkatá tyčinkovitá bakterie žijící v tlustém střevě teplokrevných živočichů. Je jedním s nejdůležitějších zástupců střevní mikroflóry a její přítomnost je nezbytná pro správný průběh trávicích procesů ve střevě.

### 2.2.2 Fyziologie

Optimální teplota růstu 30 – 37 °C, roste v rozsahu teplot 10 – 45 °C, avšak v mléce se vyskytují psychrotrofní kmeny, které rostou i při nižších teplotách. *E.coli* se ničí při teplotě 60 °C za 30 minut, varem během jedné minuty, při skladování potravin v chlazeném nebo zmrazeném stavu přežívá. Optimální pH 6,8 – 7,2. Bakterie je značně odolná, ve vlhkém prostředí (v pitné a odpadní vodě, ve výkalech aj.) relativně dlouho přetrvá vitální. Tyto bakterie se mohou nacházet v syrovém či nedostatečně uvařeném mase, nepasterovaném mléce a mléčných výrobcích, syrové zelenině a nepasterované jablečné šťávě.<sup>[25]</sup>

### 2.2.3 Biochemie

*Escherichia coli* zkvašuje cukry (např. glukózu, laktózu, některé pentózy a alkoholické cukry) za intenzivní tvorby kyselin a plynu. Tvoří z těchto cukrů hlavně kyselinu mléčnou, pyrohroznovou, octovou a mravenčí, přičemž část kyseliny mravenčí rozkládá na oxid uhličitý a vodík. Gramnegativní povahy *Escherichia coli* a její schopnosti

zkvašovat laktózu za vzniku kyselin se využívá pro zjištění této bakterie v potravinách nebo ve vodě: příslušné diagnostické selektivní půdy totiž obsahují laktózu jako zdroj uhlíku, barvivo (např. pH indikátor), které změnou barvy prokáže zkvašování laktózy a sloučeninu (např. další barvivo nebo anionaktivní tenzid), které zabrání rozmnožování grampozitivních bakterií, jež jsou většinou ve vyšetřovaném materiálu mnohem četnější než gramnegativní bakterie a živnou půdu by přerostly.

#### 2.2.4 Morfologie

Jde o gramnegativní tyčky se zaoblenými konci, 2-3  $\mu\text{m}$  dlouhé, 0,6  $\mu\text{m}$  široké, někdy mohou být krátké - kokobacilární, barví se homogenně. Na povrchu mají různé typy fimbrií, z nichž jedny jsou zastoupeny ve velkém počtu na povrchu bakteriální buňky a umožňují adhezi na hostitelskou buňku. Některé typy *E. coli* tvoří pouzdra a jejich kolonie mají hlenovitý charakter. <sup>[24]</sup>

#### 2.2.5 Antigenní struktury

Podle antigenní struktury se dělí na sérotypy. Somatických (O) antigenů je 167, k nim se váží K a H antigeny, takže jejich kombinací vzniká 240 sérotypů. Kapsulární antigeny se dělí podle chemického složení na ty, které jsou tvořeny kyselými nebo neutrálními polysacharidy, a na ty, které se skládají z bílkovin a tvoří struktury podobné fimbriím. <sup>[24]</sup>

#### 2.2.6 Taxonomie

Rod *Escherichia coli* zahrnuje dva biotopy, z nichž biotop I tvoří 95 %, biotop II tvoří 5 % kmenů. Jednotlivé kmeny jsou charakterizovány kombinacemi O (stěnový), K (kapsulární) a H (bičíkový) antigenů. Kmeny EEC tvoří skupiny sérovarů. Některé jsou rozšířeny po celém světě, jiné sérovary se vyskytují pouze v určitých geografických oblastech.

Čtyři druhy *Shigella* a *E. coli* jsou jeden druh na základě příbuznosti DNA. Kmeny *Shigella* a *E. coli* je často velmi nesnadné rozlišit biochemicky, protože existují aerogenní shigely a anaerogenní, nepohyblivé, laktózo- negativní kmeny *E. coli*. Kmeny *E. coli* mohou způsobovat průjemová onemocnění, takže patogenicitu neposkytuje definitivní rozlišení. Shigely jsou ve skutečnosti metabolicky inaktivní bioskupiny *E. coli*. Taxonomicky nelze ospravedlnit samostatné rody, dokonce ani samostatné druhy pro tyto organismy. <sup>[6]</sup>, <sup>[18]</sup>

Tab. 1. Biotopy *Escherichia coli*

Test	Biotop I	Biotop II
indol	+	-
metylvá červeň	+	+
Voges – Proskauerova reakce	-	-
Citrát	-	-

### 2.2.7 Význam

Jen málo mikroorganismů je tak univerzálních jako *Escherichia coli*. Dokáže velmi snadno přijímat geny od jiných bakteriálních druhů, zejména z čeledi *Enterobacteriaceae*, a tím se přizpůsobit vnějším podmínkám. Bakterie tohoto druhu se běžně vyskytují v gastrointestinálním traktu ve střevech člověka i teplokrevných zvířat. Většina kmenů *E. coli* je nepatogenních, pro svého hostitele užitečných. Některé se pozitivně podílejí na trávicím procesu, syntetizují některé důležité vitamíny, např. B<sub>12</sub>, K<sub>1</sub> a K<sub>2</sub>. Zabraňují růstu škodlivých bakterií, protože s nimi soutěží o živiny a kyslík. Tím *Escherichia coli* přispívá k celkové rovnováze mikroorganismů přítomných ve střevech. Některé kmeny se dokonce používají jako probiotika, např. při trávicích obtížích nebo ke kolonizaci střeva zabraňující průniku a rozšíření patogenních bakterií. Při snížené imunitě osob však může dojít k šíření *E. coli* ze střevního traktu dále po těle. Mohou poté vyvolávat infekce močových cest, vzácně i sepse. <sup>[22]</sup>

### 2.2.8 Patogenita

Patogenní *Escherichia coli* vyvolává 2 typy onemocnění:

- a) extraintestinální (zejména močových cest, septická onemocnění, infekce ran, hnisavé procesy)
- b) v intestinálním traktu infekce provázené průjmy (určité kmeny)

Extraintestinální formy jsou vyvolány převážně komenzálními sérotypy a infekce je často endogenní. Mohou se uplatnit ty kmeny, které vzdorují baktericidii séra a fagocytóze, tj. mají polysacharidový kapsulární antigen; v močovém traktu ty, které mají tzv. P fimbrie, jimiž adherují na sliznici močových cest (uropatogenní *E. coli*). *E. coli* je pyogenní bakterie. <sup>[13], [24]</sup>

### 2.2.9 Léčba

*E. coli* je citlivá primárně na většinu antibiotik (s výjimkou benzylpenicilinu), ale zejména nemocniční kmeny mají sekundární rezistenci přenosového typu. Terapie extraintestinálních infekcí spočívá v léčbě antibiotiky, u intestinálních forem je nutno dbát na rehydrataci.<sup>[24]</sup>

## 2.3 Escherichia coli a střevní infekce

Infekce vyvolané *Escherichia coli* způsobují nejčastěji průjemové onemocnění dětí a dospělých. *E. coli* je běžný komenzál tlustého i tenkého střeva. Slouží jako běžný indikátor fekální kontaminace pitné vody, potravin apod. Pomocí antigenů O, K a H lze rozlišit 240 sérotypů.

V zažívacím traktu se určité kmeny *E. coli* uplatňují jako patogeny různými mechanismy, podle kterých se skupiny těchto tzv. enteropatogenních kmenů *E. coli* označují jako:

1. enteropatogenní v užším slova smyslu (EPEC)
2. enterotoxigenní (ETEC)
3. enteroinvazivní (EIEC)
4. enterohemoragické (EHEC)
5. attaching and effacing (A/EEC)
6. enteroagregativní (EAEC)

### 2.3.1 Enteropatogenní E. coli - EPEC

Tyto kmeny určitelné sérologickou metodou mohou způsobit gastroenteritidy. Ty se uplatňují u lidí s oslabenou imunitou, kojenců a starých lidí. Z hlediska střevních infekcí vyvolanými některými sérotypy *E. coli* se podle Karolčeka (1985) rozpoznávají 3 typy onemocnění:

- a) tzv. epidemický průjem novorozenců a kojenců se zvracením, při kterých dochází k velmi rychlé dehydrataci útlého organismu
- b) průjemové onemocnění starších dětí a dospělých, tzv. cestovatelské nebo turistické průjmy (travellers diarrhoea)
- c) onemocnění dyzenteriformního charakteru



V současné době se ve vyspělých zemích vyskytuje již velmi zřídka, je však stále velkým problémem v rozvojových zemích. Z imunologického hlediska se zvláště jedná o sérotypy O55 a O111, u větších dětí a u dospělých tyto enteropatogenní kmeny žádné onemocnění nevyvolávají. Bylo prokázáno, že schopnost vyvolat tyto novorozenecké průjmy je vázána pouze na některé sérotypy, které kolonizují tenké a tlusté střevo. Jejich identifikace se opírá o sérotypizaci. Toto onemocnění se vyskytuje na kojeneckých odděleních nemocnic a šíří se inkubátory, kojeneckou výživou, lahvemi, dudlíky, předměty nemocničního prostředí kontaminovanými fekáliemi nemocných dětí. Z hlediska přenosu těchto bakterií je významné jejich pomnožení v roztocích mléčné kojenecké výživy, když se připravuje na 24 hodin a není ihned (do 2 hodin) ochlazená na teplotu 7 °C a nižší. Za minimální infekční dávku (MID) se považuje  $>10^6$  KTJ. Zdrojem jsou zdraví nosiči (matky, zdravotnický personál).<sup>[11], [16], [17]</sup>

U kmenů EPEC nebyla prokázána tvorba enterotoxinů. Patogenetickým mechanismem je těsná vazba bakterií s enterocyty střeva a tím dochází k rozpouštění mikroklků (mikrovili). Konečným důsledkem je potom poškození epiteliálního povrchu střev.<sup>[1]</sup>

### 2.3.2 Enterotoxigenní E. coli - ETEC

Při vstupu do zažívacího ústrojí osídlují tenké střevo pomocí kolonizačních faktorů, což jsou proteinové fimbrie. Tyto kmeny mohou vyvolat průjmy jak u dětí, tak i dospělých osob. U onemocnění se zpravidla neobjevuje horečka. Vyskytují se převážně ve velmi teplých či tropických oblastech, např. v Mexiku, Bangladéši nebo v Egyptě. Do této skupiny se zahrnují i tzv. průjmy cestovatelů. ETEC mohou produkovat dva typy enterotoxinů: jednak **termolabilní enterotoxin** podobný enterotoxinu *Vibrio cholerae* (tzv. cholergen) - inaktivní při 60 °C po dobu 30 minut, dále **enterotoxin termostabilní** - odolný do 100 °C po dobu 15 minut. Genetická informace pro tvorbu těchto toxinů je lokalizována v plasmidech.<sup>[1], [14]</sup>

### 2.3.3 Enteroinvazivní E. coli - EIEC

Vykazují stejný mechanismus patogenity jako shigely. Pronikají tedy do buněk a v nich se množí, u postižených proto vyvolávají dysenterický syndrom. Jedná se o horečnaté průjmové onemocnění s tenezmy. Charakteristickým nálezem je stolice s příměsí krve s vysokým obsahem bílých krvinek, zejména granulocytů. Příčinou jsou vředové defekty střevní stěny.<sup>[1], [16], [20]</sup>

Tyto kmeny specifických sérologických charakteristik (O a K antigeny) mají schopnost zachytit se na hostitelských buňkách a způsobit u člověka infekci močových cest, chirurgických ran, zánět pobřišnice, zánět žlučových cest, zánět mozkových blan, zápal plic a jiné. Tyto infekce nejsou předmětem potravinářské mikrobiologie.<sup>[17]</sup>

### 2.3.4 Enterohemoragické *E. coli* - EHEC

Mají podobný způsob adherence jako kmeny enteropatogenní, avšak vážou se především v tlustém střevě. Rovněž produkují toxin, který se označuje v anglickém písemnictví jako „shiga-like toxin“, čili toxin podobný shigelovému nebo také verotoxinem. Jedná se nejčastěji o sérotyp O157. Kmeny EHEC působí tzv. hemoragickou kolitidu s krvácením.

U některých nemocných se může vyvinout hemolyticko-uremický syndrom (HUS). U hemolyticko-uremického syndromu jde o mikroangiopatickou hemolytickou anemii s trombotizací, primárně jsou poškozeny endotelie kapilár. Onemocnění se vyskytuje v dětském věku a jeho průběh je většinou těžký a rychlý. Klinicky se projevuje klesáním diurézy až anurií, močovým nálezem, v krvi vzestupem kreatininu, urey, změnou koagulačních faktorů ap. Zdrojem infekce je nejčastěji kontaminované maso. Produkce toxinů je determinována profágem přítomným v buňkách enterohemoragické *E. coli*.<sup>[1], [16]</sup>

Tab. 2. Klinické a patologické obrazy průjmových *E. coli* infekcí<sup>[16]</sup>

<b><i>E. coli</i></b>	<b>Klinický syndrom</b>	<b>Místo infekce</b>	<b>Histopatologický nález</b>
ETEC	Vodnatý průjem	Tenké střevo	Beze změn
EPEC	Vodnatý průjem	Tenké střevo	Vyhlazení slizničního povrchu
EIEC	Dyzenterie	Tlusté střevo	Invazivní, zánětlivý
EHEC	Hemoragická kolitida, HUS	Tlusté střevo	Vyhlazení slizničního povrchu bez zánětu

### 2.3.5 Attaching and effacing *E. coli* - A/EEC

Tato skupina patogenních *E. coli* zatím nemá jednotné označení v českém jazyce. Vyvolává onemocnění zejména u skotu, pro člověka je patogenní jen příležitostně.<sup>[22]</sup>

### 2.3.6 Enteroagregativní *E. coli* – EAEC

Vyvolávají dlouhodobé průjmy zejména u dětí, onemocnění probíhá obvykle bez horečnatých stavů.<sup>[22]</sup>

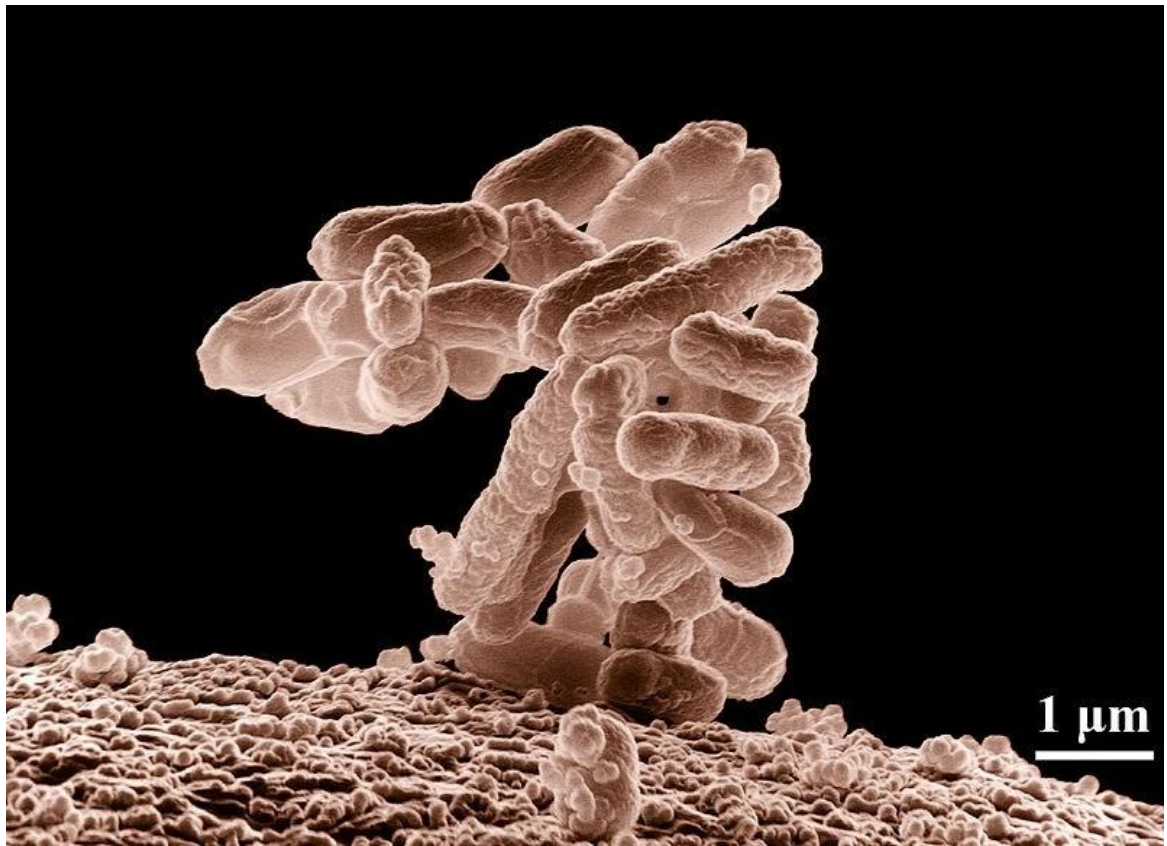
Minimální infekční dávka se odhadují EPEC  $10^6 - 10^{10}$ , ETEC  $10^8 - 10^{10}$ , EIEC  $10^6 - 10^8$ , EHEC  $10^2 - 10^3$  buněk. Některé kmeny EEC při kultivaci v tekutých médiích nebo v mléce vylučují toxiny do prostředí a mohou tedy kromě infekcí způsobovat i alimentární intoxikace.<sup>[6]</sup>

### 2.3.7 *Escherichia coli* O157

Většina bakterií *E. coli*, které se nacházejí ve střevech, je neškodných, avšak *E. coli* O157 je příčinou závažných onemocnění, často se smrtelnými následky (zejména u mladších dětí nebo starších lidí). Příznaky jsou různé, od vodnatého průjmu, přes zvracení a bolesti břicha až po světle červený krvavý průjem a bolestivé křeče v břiše (obvykle bez příznaků horečky). U 30 % nemocných se vyvine tzv. hemolytický-uremický syndrom. Ten se obvykle objevuje u malých dětí, u kterých je *E. coli* O157 jedním z hlavních důvodů selhávání funkce ledvin. Úmrtnost je od 1 % do 5 %, pokud epidemie zasáhne rizikovou skupinu obyvatel (starší lidi) může být tento poměr dokonce mnohem větší. Počáteční projevy onemocnění se objevují mezi jedním až 14 dny, průměrně však za 3 až 4 dny. Nemoc obvykle trvá dva týdny, ovšem za předpokladu, že nevzniknou další komplikace (například HUS). Z výkalů dospělých se vytratí za několik dní.

Ačkoliv se *E. coli* O157 může rozmnožovat v potravinách, její infekční dávka je velice nízká, okolo 100 bakterií. Infekce vzniká konzumací kontaminovaných potravin, pitné vody, přenosem mezi lidmi a přímým kontaktem zejména s domácími zvířaty a jejich fekáliemi, popřípadě kontaktem s různě znečištěnými předměty. Hlavním potravinovým vehikulem je nedostatečně tepelně upravené maso, zejména karbanátky, hamburgery, dále pak kontaminované vařené maso, zelenina hnojená živočišnou mrvou a neumyté kontaminované ovoce. Mezi další potravinové zdroje patří syrové mléko, sýr z nepasterovaného mléka a jablečný džus. Díky nízké infekční dávce je pravděpodobné, že křížová kontaminace mezi potravinami připravenými k přímému použití a syrovým masem, skončí onemocněním. Hlavním zásobníkem *E. coli* O157 je žaludek a střevní trakt dobytka a někdy i ovcí. Přežívají a množí se v některých potravinách při pokojové teplotě, při teplotách 4 °C může jejich počet klesat. Jsou zničeny běžným tepelným opracováním.<sup>[7], [13], [21]</sup>

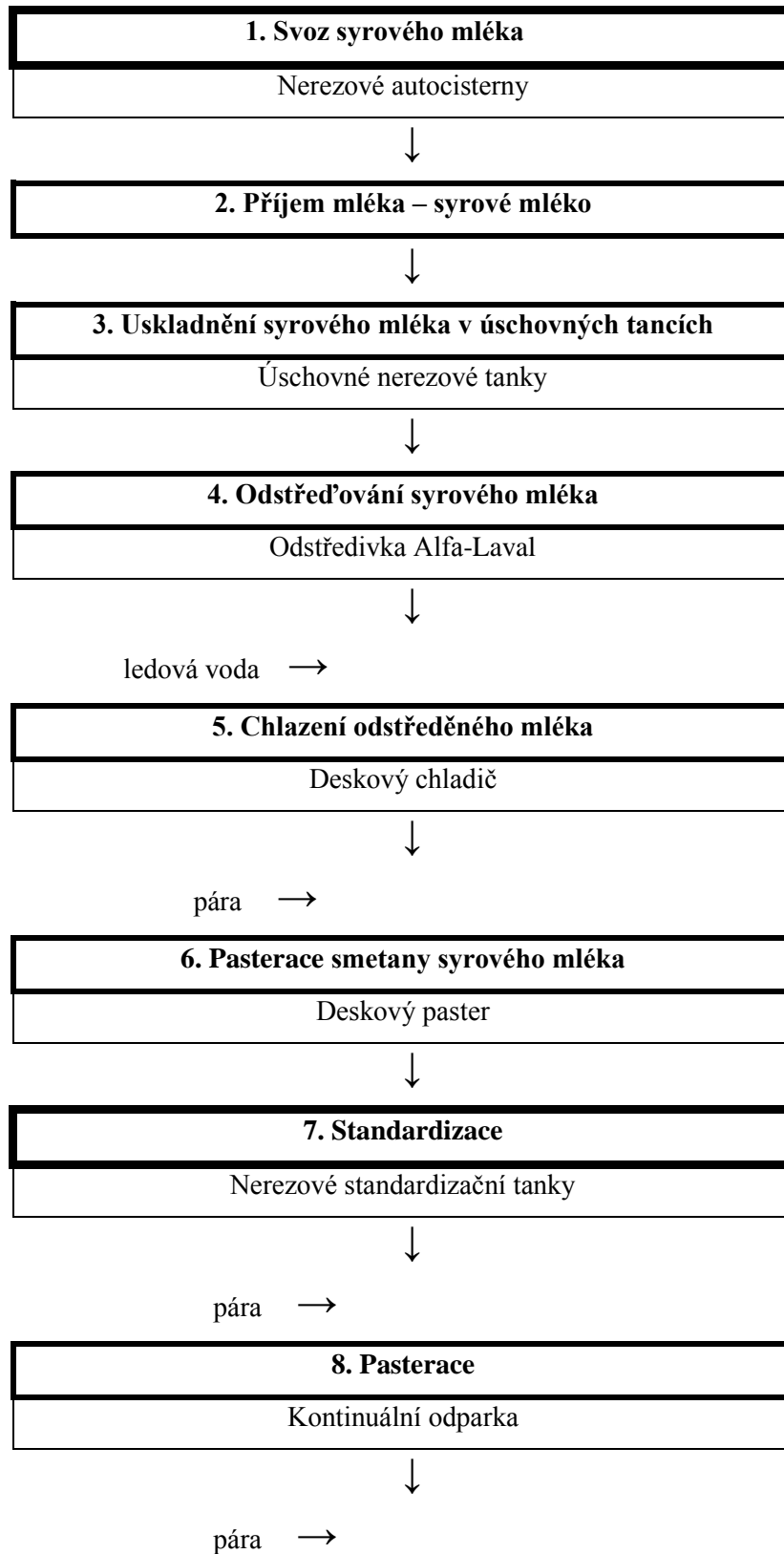
Například ve Spojených státech amerických Food and Drug Administration vydala varování, aby důkladně tepelně zpracovali maso na hamburgery a doporučila zvýšení teploty pro hamburgery na 86,1 °C. Nedostatečně tepelně zpracované hamburgery nejsou považovány za bezpečné a už nebudou dostupné v žádném rychlém občerstvení.<sup>[13]</sup>

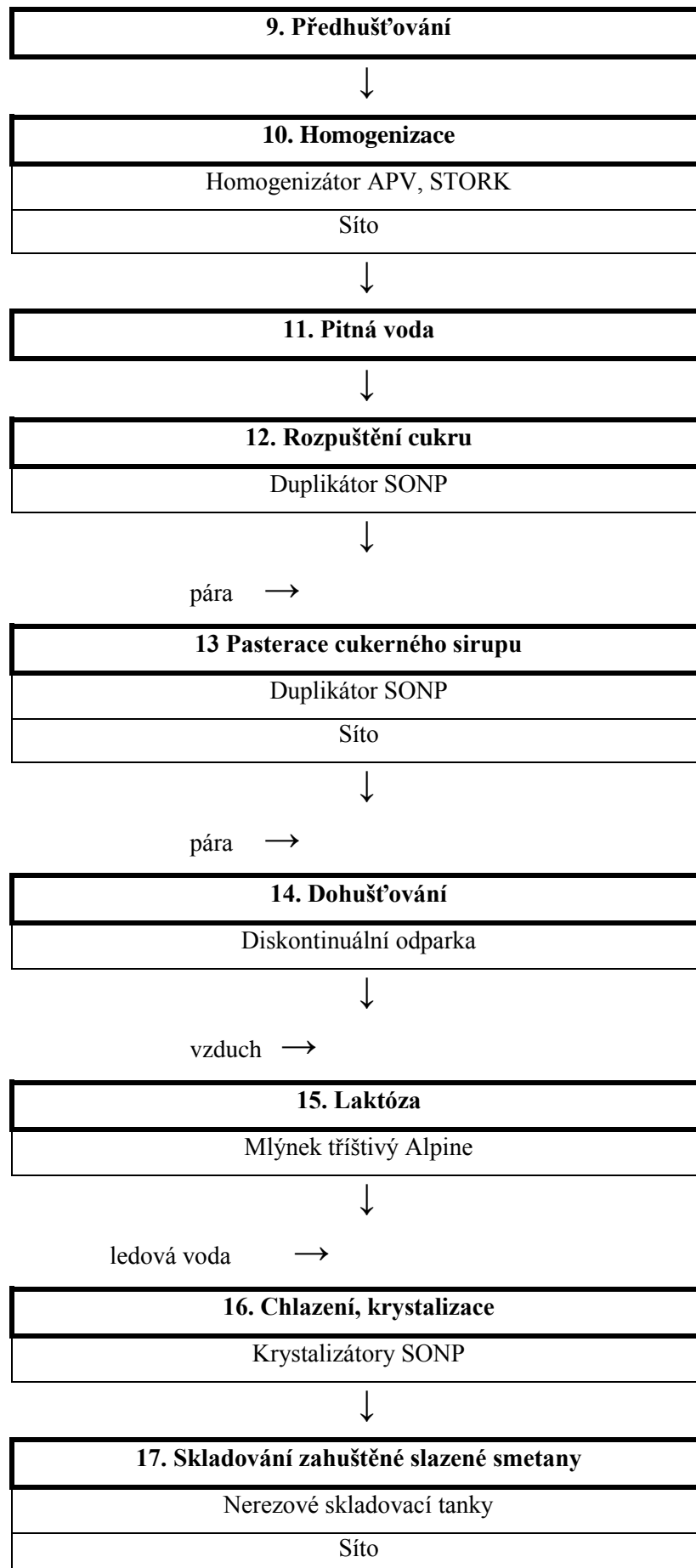


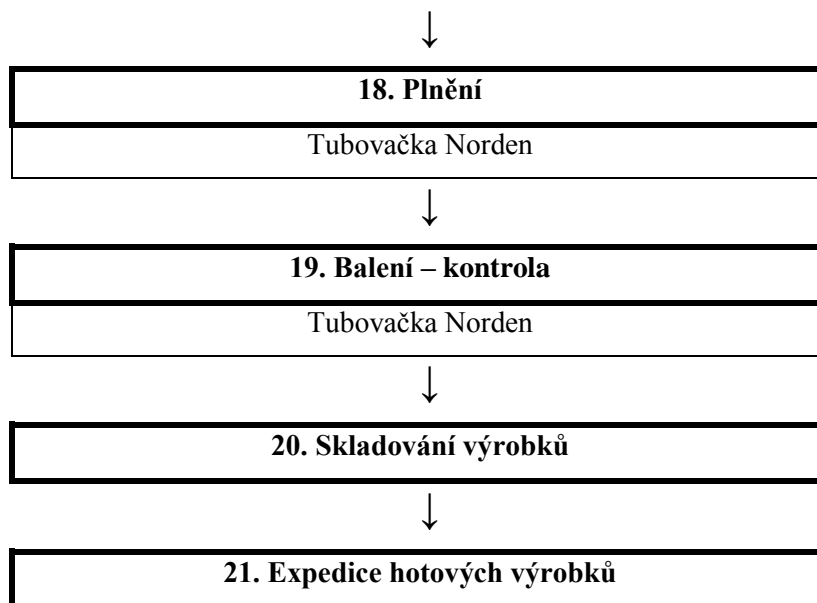
Obr. 1. *Escherichia coli* O157:H7 <sup>[28]</sup>

### 3 VÝROBA KONDENZOVANÉ SLAZENÉ SMETANY

#### Schéma výroby







### 3.1 Suroviny pro výrobu zahuštěné slazené smetany

Pro výrobu zahuštěné slazené smetany se používají čtyři základní suroviny:

Syrové kravské mléko (dle ČSN 570529)

Smetana (dle ČSN 570660)

Rafinovaný cukr (dle ČSN 565720)

Rafinovaná laktóza (dle PN 571502 PML Nový Bydžov) <sup>[12]</sup>

### 3.2 Příjem syrového mléka

#### 3.2.1 Příjem syrového mléka

Z biologického hlediska se několikrát měsíčně sleduje přítomnost mikroorganismů. Stanovuje se CPM (celkový počet mikroorganismů), SB (somatické buňky). Z fyzikálního hlediska se sleduje vniknutí mechanické nečistoty vizuální kontrolou. Při příjmu syrového mléka je nutný odběr vzorků pro provozní laboratoř. Sleduje se z chemického hlediska přítomnost RIL (rezidua inhibičních látek). Ve výsledku musí být RIL negativní. Z odebraného vzorku se dále v laboratoři stanovuje tuk v mléce butyrometricky (minimálně 3,6 %), specifická hmotnost hustoměrem (minimálně 28 °L), kyselost metodou Soxhlet-Henkela (minimálně 6,2 SH, maximálně 7,8 SH). <sup>[12]</sup>

### 3.2.2 Uskladnění syrového mléka v úschovných tancích

Úschovné tanky jsou z nerezové oceli, jejich objem se pohybuje v desítkách tisíc litrů. Mléko se uskladňuje na dobu maximálně 24 hodin při teplotě 8 °C. Opět se odebere vzorek mléka k mikrobiologickému rozboru na stanovení CPM (max. 1000 v 1 ml) a enterokoků (max. 50 v 1 ml).

### 3.2.3 Odstředování a chlazení syrového mléka

Syrové mléko zahřejeme na teplotu 55 až 65 °C a odstředíme. Odstředěné mléko zchladíme na teplotu 8 °C a uskladníme maximálně na dobu 24 hodin. Chlazené mléko se přečerpává do standardizačních tanků pro další použití.<sup>[12]</sup>

### 3.2.4 Pasterace smetany

Získaná smetana po odstředění mléka se pasteruje na deskovém pasteru při teplotě 93 °C za dodržení pasterační doby 10 sekund. Pasteraci se má snížit celkový počet mikroorganismů v mléce, zničit všechny patogenní zárodky a zneškodnit enzymy, které by mohly být příčinou biochemických změn slazené kondenzované smetany. Pasterovaná smetana se chladí na teplotu 8 °C a uskladní maximálně na 24 hodin. Opět se odebere vzorek pro provozní laboratoř. Stanovuje se tuk butyrometricky (hodnota podle potřeby), stanovuje se kyselost metodou Soxhlet-Henkela (minimálně 4,2 SH, maximálně 6 SH). K mikrobiologickému rozboru na stanovení CPM (max. 10<sup>5</sup> v 1 ml) a koliformních bakterií (max. 50 v 1 ml).<sup>[4]</sup>

### 3.2.5 Standardizace

Pro standardizaci se používají nerezové standardizační tanky. Standardizace se provádí přidáním odstředěného mléka do syrového nebo syrového mléka do smetany na získání potřebné tučnosti standardizovaného mléka nebo smetany.<sup>[12]</sup>

## 3.3 Vlastní výroba zahuštěné slazené smetany

### 3.3.1 Pasterace a předhušťování

Pasterace se provádí v kontinuální odparce Holvrieka při teplotě 115 °C za dodržení pasterační doby 65 sekund. Jednou za tři měsíce se provádí kontrola – spady ovzduší a zjišťuje se přítomnost mikroorganismů (stanovení CPM, plísní a kvasinek). V kontinuál-



ní odparce Holvrieka probíhá i předhušťování, které do jisté míry může ovlivnit kvalitu výrobku.

### 3.3.2 Homogenizace

Předhuštěné mléko se přečerpá do diskontinuální odparky a následně do homogenizátoru. Homogenizace probíhá při určitém homogenizačním tlaku, který rovněž ovlivňuje kvalitu výrobku.

### 3.3.3 Pitná voda

Pro přípravu cukerného sirupu je nutná nezávadná pitná voda, neboť hrozí kontaminace mléka mikroorganismy z vody. Je nezbytné pravidelně provádět mikrobiologický rozbor pitné vody. Stanovuje se počet enterokoků (max. 0 ve 100 ml), počet koliformních bakterií (max. 0 ve 100 ml), dále počet mezofilních bakterií (max. 20 v 1 ml) a počet psychrofilních bakterií (max. 200 v 1 ml).<sup>[12]</sup>

### 3.3.4 Rozpouštění cukru

Nejprve se provede kontrola kvality cukru na přítomnost mikroorganismů – koliformních bakterií (max. negativní v 1 g). V duplikátoru SONP se v pitné vodě rozpouští požadované množství cukru za vzniku cukerného sirupu. Množství přidaného cukru (sacharózy) se volí tak, aby bylo dosaženo tzv. „cukerného poměru“, koncentrace sacharózy ve vodě výrobku, 60,5 – 64,5 %.

### 3.3.5 Pasterace cukerného sirupu

Pasterace probíhá v duplikátoru SONP při pasterační teplotě 105 °C za dodržení pasterační doby minimálně 30 minut. Dále se cukerný sirup přečerpává do odparky. Přířadkem cukerného sirupu se zvýší osmotický tlak ve slazené kondenzované smetaně a tím se omezí, až zastaví růst některých mikroorganismů.<sup>[4]</sup>

### 3.3.6 Dohušťování

Dohušťování připraveného polotovaru probíhá v diskontinuální odparce na obsah sušiny (min. 75 %). Provádí se odběr kontrolního vzorku na stanovení tuku (23 %) a sušiny (76 %).

### 3.3.7 Laktóza

Nejprve se provede kontrola kvality laktózy na přítomnost mikroorganismů – koliformních bakterií (max. negativní v 1 g). Laktóza se mele na tříštivém mlýnku Alpine. Požadované množství laktózy se naváží pro přípravu koncentráту laktózy. Při přípravě tohoto koncentráту je nutné dodržet teplotu 28 °C. Tato teplota musí být dodržena i při zaočkování v krystalizátoru.<sup>[12]</sup>

### 3.3.8 Chlazení, krystalizace

Polotovár se vychladí na teplotu 24 °C a za stálého míchání se udržuje při této teplotě 45 až 60 minut. Tím se podpoří rychlá krystalizace laktózy v krystalizátoru SOPN a krystaly jsou potom velmi jemné, na jazyku nerozpoznatelné.<sup>[4]</sup>

### 3.3.9 Skladování zahuštěné slazené smetany

Zahuštěná slazená smetana se z krystalizátoru přečerpá do skladovacích tanků TUS 25, které jsou nerezové o objemu 25000 l. Doba skladování je maximálně 48 hodin. Ze skladovacích tanků se odebírá vzorek slazené smetany k mikrobiologickým rozborům, tj. stanovení CPM (max. 10000 v 1 g), stanovení koliformních bakterií (max. 0 v 1 g) a stanovení plísní a kvasinek (max. 50 v 1g).

### 3.3.10 Plnění

Zahuštěná slazená smetana se plní do tub na tubovačce Norden 2002, která se musí připravit. Musí se provést seřízení data, dezinfekce a čištění tubovačky. Po naplnění se provádí vizuální kontrola tub – kontrola správnosti data, hmotnosti obsahu tuby (75 g), závěru tuby, čistoty tuby a kontrola teploty smetany (25 °C).

### 3.3.11 Balení – kontrola

Z tubovačky Norden se tuby skupinově balí do kartonových krabic, které se dávají na palety. Vizuálně se provede kontrola úplnosti kartonové krabice a palety. Tomu ovšem předchází odběr a rozbor vzorku (hotového výrobku) pro provozní laboratoř. Mikrobiologickým rozbohem se stanoví CPM (max. 10000 v 1 g), koliformní bakterie (max. 0 v 1 g), plísně a kvasinky (max. 50 v 1 g). Dále se stanoví kyselost metodou Soxhlet-Henkela (8 SH), sušina (76 %) a tuk (23 %).<sup>[12]</sup>

### 3.3.12 Skladování výrobků

Hotové výrobky se na paletách skladují maximálně jednu třetinu záruční lhůty, což odpovídá 40 dnům při skladovací teplotě maximálně 24 °C.

### 3.3.13 Expedice hotových výrobků

Po uvolnění výrobků a výstupní kontrole se produkt expeduje. Je nutné dodržet jakostní požadavky, zkontrolovat úplnost a kvalitu balení (shoda s dodacím listem) a vystavit průvodní dokumenty. <sup>[12]</sup>

## 4 MIKROBIOLOGIE ZAHUŠTĚNÝCH MLÉČNÝCH VÝROBKŮ

Mikrobiologie těchto výrobků je poměrně jednoduchá, protože se při jejich výrobě nikde nevyužívá činnosti bakterií. Všechny technologické postupy sledují ničení všech druhů bakterií a pro bakterie, které by tyto zásahy přežily, se vytvářejí nepříznivé životní podmínky. Proto se zvýšenou měrou používá vysoké pasterace, sterilace a zahušťování.<sup>[3]</sup>

### 4.1 Mikrobiologie slazeného kondenzovaného mléka, smetany

Slazené kondenzované mléko lze vyrábět pouze tehdy, jsou-li splněny některé důležité podmínky. Výchozí surovina – mléko – musí být bezvadná z hlediska chuti i mikrobiologického hlediska. Nejvhodnější je mléko z oblastí pastevních, kde se nezkrmují vedlejší produkty zemědělského průmyslu nepříznivě ovlivňující chuť a mikrobiologickou jakost mléka. Mléko použité k výrobě kondenzovaného slazeného mléka musí být čerstvé.<sup>[4]</sup>

Dalším důležitým činitelem, který má vliv na jakost a trvanlivost výrobku, je teplota použitá při předeřívání mléka. Teplotami dosahujícími 88 až 96 °C, popřípadě dlouhodobou pasterací, mají být bezpečně zničeni všichni patogenní mikroby i zničena většina technicky škodlivých vegetativních buněk. Naproti tomu některé termorezistentní zárodky a spirálující bacily předeřívání mléka přežívají a ve slazeném kondenzovaném mléce pak mohou být původci různých závad.<sup>[4]</sup>

Trvanlivost výrobku závisí kromě pasteračního záhřevu na koncentraci přidaného cukru. Přídavek cukru působí konzervačně tím, že se zvyšuje osmotický tlak. Tím se vytváří pro mikroby prostředí fyziologicky suché (anabióza). Při zahušťování se připouští roztok řepného cukru (celková sušina 73,2 %, 30 – 31 % mléčné sušiny).<sup>[3]</sup>

Ačkoli je osmotický tlak značně vysoký, obsahuje slazené kondenzované mléko některé mikroorganismy, které hypertonické prostředí snášejí, nebo se mu přizpůsobují. U takovýchto přizpůsobených mikroorganismů nenastává plasmolýza a mikroby se zde udrží v živém stavu několik měsíců, až několik roků. Bývají to MO, které přežily předeřívání i zahušťování mléka, popřípadě se do zahuštěného slazeného mléka dostaly dodatečně při chlazení nebo při plnění plechovek, případně tub.<sup>[4]</sup>

Z MO, které byly ve slazeném kondenzovaném mléce nalezeny a mnohé mohly být původcem různých jeho vad, lze uvést různé druhy, např. sarcin, bakterie rodu *Proteus*, *Str. faecalis*, *Str. albus*, rody *Escherichia* a *Aerobacter*, sporuláty, mikrokoky a termofily,

dále některé druhy nepravých kvasinek a plísní rodu *Aspergillus*. Celkový počet však bývá velmi nízký, od 100 do 10 000 buněk.<sup>[3]</sup>

## 4.2 Mikrobiální vady

K nejčastěji se vyskytujícím vadám způsobeným činností mikroorganismů patří **tvorba plynu způsobujícího bombáže**. Dále **houstnutí mléka** za vzniku nenormální chuti a vůně je způsobeno mikrobem *Micrococcus freudenreichii*. Tvorbu tzv. **knoflíkových hnízd** na povrchu nebo u stěn plechovky způsobují plísně *Aspergillus glaucus*. Kvasinky dávají **kvasničnou** nebo **ovocnou příchut'**. Mezi další vady patří **ovocná vůně, plesnivá vůně, žluklost, zkysnutí** atd.<sup>[3]</sup>

### 4.2.1 Tvorba plynu (bombáže)

Příčinou bombáží ve slazeném kondenzovaném mléce, obsahujícím 40 % sacharosu, mohou být kromě jiného i bakterie *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, ale i spirálujícími kvasinkami *Tor. lactis condensii*. Je-li původcem této vady *Aerobacter aerogenes*, jsou bombáže velmi silné. Mléko z takovýchto krabic má vysokou kyselost a bývá vločkovitě vysrážené. Vyšší procento cukru, nad 40 % již silně omezuje růst bakterie *Aerobacter aerogenes*. Zdrojem kontaminace bývají často mouchy a dochází k ní při plnění krabic.

Posuzuje-li se tepelná odolnost bakterií způsobujících bombáže, je patrné, že jejich tepelná odolnost je tak malá, že nemohou přežít teploty používané při výrobním procesu. Proto je třeba hledat zdroje kontaminace slazeného kondenzovaného mléka hlavně až po předeřívání. Kontaminace bakteriemi *Escherichia coli* a *Aerobacter aerogenes* nastává hlavně u plničky.<sup>[4]</sup>

## 5 MOŽNOSTI ZDROJŮ A VÝSKYTU KOLIFORMNÍCH BAKTERIÍ

### 5.1 Zdroje kontaminace mléka

Hovězí dobytek je zřejmě hlavním rezervoárem EHEC v prvovýrobě. V různých terénních průzkumech 3 až 30 % ze stolice zdravého skotu (telata, krávy, buvoli) obsahovalo *E. coli* O157 : H7, ale i jiné verotoxigenní sérotypy. *E. coli* O157 : H7 byla také izolována ze stolice zdravých dojnic, jejichž mléko způsobilo u konzumentů výskyt dyzentérií provázených uremicko-hemorragickým syndromem.

Epidemiologický cyklus kmenů EHEC v prostředí prvovýroby je obdobný cyklu salmonel. Zvířecí bacilonosiči i onemocnělá zvířata kontaminují prostředí, v němž se *E. coli* ve vhodných lokalitách (voda, krmiva, hnojená půda, hnůj) dále saprofytický rozmnožuje. Z těchto zdrojů pak infikuje další zvířata. Mléko může být při dojení kontaminováno z vemen znečištěných hnojem infikovaným EHEC nebo i přímým vylučováním bakterií do mléka z mastitid, způsobovaných *E. coli*.

Ostatní typy EEC – EPEC, EIEC, lidský biotop ETEC – mohou infikovat mléko při ručním dojení nebo při manipulaci s mlékem. Mléko může být kontaminováno EEC také z infikované vody, která je pro tyto bakterie důležitým prostředkem přenosu infekce.

Také v prostředí výrobních závodů je voda a bacilonosiči hlavní příčinou kontaminace výrobků kmeny EEC.

### 5.2 Zdroje kontaminace při výrobě zahuštěné slazené smetany

Ve výrobním prostředí a během výroby se při patogenní kontaminaci uplatňuje také člověk, jako trvalý hostitel nebo bacilonosič některých patogenních bakterií (patogenní druhy enterobakterií).<sup>[6]</sup>

Pokud je syrové mléko náhodně kontaminované koliformními bakteriemi, pasterací se tyto bakterie zničí.

K opětovné kontaminaci by mohlo dojít při:

- přečerpávání přehuštěného mléka do diskontinuální odparky při náhodném vniknutí mechanických nečistot
- přečerpávání cukerného sirupu do odparky při náhodném vniknutí mechanických nečistot

- mletí laktózy
- nedokonalém mytí krystalizátoru – zbytky mléka na stěnách nebo vniknutí mechanických nečistot vyvolají pomnožení koliformních bakterií
- přečerpání zahuštěné slazené smetany z krystalizátoru do skladovacích tanků při náhodném vniknutí mechanických nečistot
- nedostatečném vyčištění skladovacích tanků
- plnění – nedokonalá čistota tubovačky a plnicího zařízení
- rekontaminaci tub

## 6 HODNOCENÍ KVALITY ZAHUŠTĚNÝCH SLAZENÝCH MLÉČNÝCH VÝROBKŮ

Zahuštěné slazené mléčné výrobky mají prodlouženou trvanlivost, jsou určeny pro přímou spotřebu a průmyslové zpracování.

### 6.1 Odběr vzorků

Odebírá se neotevřené balení v takovém počtu, aby celková hmotnost byla nejméně 150 g. Při braní vzorků zahuštěného slazeného mléka z velkospotřebitelských obalů je nutné obsah dokonale promíchat kovovým míchadlem tak, aby se promísila i vrstva ulpělá na stěně obalu, která často mívá odlišné složení. Vzorek se nabírá čistou, suchou naběračkou v množství nejméně 250 g, u cisteren nejméně 500 g.

### 6.2 Příprava vzorků k rozboru

Neotevřený obal či vzorkovnice se u neslazeného zahuštěného mléka několikrát protřepe a převrací. Pak se otevře a výrobek se opakovaně přelévá, aby se zjistilo, že i na stěnách a dně ulpělé usazeniny se homogenně rozmíchají. U slazeného zahuštěného mléka se míchá špachtlí tak, aby byly zasaženy horní i dolní vrstvy. Výrobky v tubách se vytlačí do prachovnice, tuba se podélně rozřízne a obsah se co nejúplněji převede do uzavíratelné vzorkovnice.

### 6.3 Smyslové zkoušení

Dále jsou uvedeny požadavky na smyslové vlastnosti, kterým musí tyto výrobky vyhovovat. Při smyslovém zkoušení se posuzuje barva, konzistence, chuť a vůně u všech výrobků v původním stavu a musí dosáhnout charakteristiky uvedené v tabulce (viz. níže). Z přicházejících odchylných smyslových vlastností se jedná zejména o následující odchylky:

- a) **barva**: nahnědlá, šedá, ojediněle bílé napálené kousky, až hnědá, nestejnorodá
- b) **konzistence**: vločkovitá, moučnatá, písčitá, usazeniny na dně, silně oddělený tuk, kousky
- c) **chuť a vůně**: karamelová, nahořklá, připálená, zatuchlá, žluklá, po plísniích a chemikáliích



Tab. 3. Smyslové požadavky na zahuštěné mléčné výrobky

	<b>Zahuštěné slazené výrobky</b>
Barva	bílá s lehce smetanovým nádechem, stejnorodá
Konzistence při 20 °C	hladká, viskózní, stejnorodá, mírný sediment není na závadu
Chuť a vůně	příjemně mléčná, sladká až mírně škrablavá, s příchutí po pasteraci

#### 6.4 Fyzikálně chemické vyšetření

Tab. 4. Některé fyzikální a chemické požadavky (průměrné složení v procentech)

<b>Druh</b>	<b>voda</b>	<b>tuk</b>	<b>bílkoviny</b>	<b>laktóza</b>	<b>sacharóza</b>
Zahuštěné slazené mléko	25	9,1	8,7	12,1	43,2
Zahuštěná slazená smetana	24	23	5,3	6,5	40

#### 6.5 Mikrobiologické vyšetření

a) *odběr vzorků:*

- odebírá se celé spotřebitelské balení

b) *příprava vzorku k rozboru:*

- plechovka se v místě otvírání otře vatou namočenou v etanolu a osuší
- pokud je plechovka opatřena papírovou etiketou, odstraní se
- před otevřením se obsah důkladně promíchá

c) *vlastní rozbor:*

- u slazených zahuštěných mléčných výrobků se stanovují mezofilní mikroby aerobní a fakultativně anaerobní, koliformní bakterie, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, osmofilní kvasinky a plísňe

#### 6.6 Termostatová zkouška

Termostatová zkouška slouží k posouzení vzniku vad, které mohou nastat pomnožením mikroflóry přítomné ve výrobku. Pokud není předepsáno jinak, provádí se termostatová zkouška uložením do termostatu na 35 – 37 °C na 14 dnů.<sup>[5]</sup>

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 7 KULTIVAČNÍ VYŠETŘENÍ

Kultivační vyšetření může mít charakter kvalitativní, kvantitativní, případně kombinovaný. Tímto vyšetřením se zjišťují jen životaschopné mikroorganismy.

Při kultivačním vyšetření se jako jednotky (jedna kolonie) může někdy projevit nejen jedna samostatná životaschopná buňka ve zkoušeném vzorku, ale i několik buněk, které jsou vázány na společnou částičku vzorku nebo se náhodně ocitly po naočkování v živné půdě v takové blízkosti, že jejich potomstvo vytvořilo dohromady společnou kolonii. Také biologická seskupení (řetízky, tetrády apod.) a náhodné shluky složené z více buněk dávají vzniknout jediné kolonii.

Výsledek je ovlivněn kultivačními podmínkami – složením živné půdy, jejím pH, kultivační teplotou, přístupem vzdušného kyslíku, délkou kultivace apod.

Způsob kultivačního vyšetření záleží na tom, je-li jeho cílem zjistit kvantitativní hodnoty, tj. počet mikroorganismů v daném vzorku, nebo prokázat přítomnost určitých druhů či skupin mikroorganismů bez ohledu na jejich množství, nebo určit izolovaný neznámý kmen mikroorganismů.

V prvním případě je třeba zabezpečit, aby nenastaly žádné změny, které by mohly před zpracováním a během zpracování ovlivnit obsah mikroorganismů ve vzorku. Při rozboru se používají co nejspolehlivější kvantitativní metody. Takový rozbor má charakter skupinového stanovení, to znamená, že se zjišťuje počet buněk určité fyziologické nebo taxonomické skupiny mikroorganismů. Využívá se převážně selektivních, selektivně diagnostických a kolektivních půd.

Ve druhém případě je nutno vyšetřit co největší množství vzorku. Používají se nahromadovací a pomnožovací metody umožňující prokázat i ojedinělé buňky hledaných druhů mikroorganismů. Toto stanovení má povahu kvalitativní a vyžaduje citlivé diagnostické a selektivně diagnostické půdy.

Ve třetím případě se zjišťují biochemické vlastnosti izolovaných mikrobů kultivací v řadě diagnostických půd. Stanovení má vysloveně kvalitativní charakter. <sup>[11]</sup>

## 7.1 Metody zpracování

K mikrobiologickému rozboru jsem použil plotnovou metodu pro stanovení počtu koliformních bakterií. Jedná se o kultivační metodu na živné půdě Chromocult. Při stanovení koliformních bakterií jsem se řídil ČSN/ISO 4832.

Touto normou se nahrazuje ČSN 560085. Změny proti předchozí normě: zavádí se pouze jedna kultivační půda, umožňuje se volba teploty podle účelu rozboru (technologie nebo zdravotní nezávislost), mění se způsob výpočtu a vyjádření výsledků. <sup>[19]</sup>

## 8 STANOVENÍ KOLIFORMNÍCH BAKTERIÍ V ZAHUŠTĚNÉ SLAZENÉ SMETANĚ

### 8.1 Příprava suspenze koliformních bakterií

Nejprve byly pomnoženy bakterie *E. coli* a *En. aerogenes* v několika zkumavkách se šikmým agarem (3 + 3 zkumavky). Dále byla použita McFarlandova stupnice k orientačnímu určení zákalu. Byl připraven zákal 2. stupně z obou bakterií za použití sterilní očkovací kličky, tzn. že do fyziologického roztoku byly vpraveny tyto koliformní bakterie.

#### 8.1.1 Stanovení počtu koliformních bakterií metodou roztěru

Podstatou této metody je, že známý objem suspenze (0,01 ml) se rozetře sterilní očkovací jehlou na ohraničenou plochu o obsahu 100 mm<sup>2</sup> speciálního podložního sklíčka. Podložní sklíčko musí být čisté a odmaštěné. Potom se tento roztěr vysuší, fixuje se plamenem a obarví methylenovou modří (5 minut). Dále opatrně opláchnou vodou, usuší se a mikroskopuje imerzním objektivem (stonásobné zvětšení). Počet bakterií na ploše zorného pole se přepočte na 1 ml suspenze.

#### 8.1.2 Výpočet množství bakterií v 1 ml suspenze

Vzhledem k tomu, že v zorném poli je velké množství bakterií, počítá se pouze s 1/8 zorného pole.

Tab. 5. Počet koliformních bakterií v 1/8 zorného pole

zorné pole	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ø
počet bakterií	192	234	175	332	10	8	192	267	27	432	187,5

Celé zorné pole:  $187,5 \times 8 = 1\,500$  (bakterií)

Při tomto zvětšení plocha zorného pole odpovídá 0,0123 mm<sup>2</sup>.

Výpočet množství bakterií v 0,01 ml suspenze:

1 500 bakterií ..... 0,0123 mm<sup>2</sup>

X bakterií ..... 100 mm<sup>2</sup>

X = 12201626,02 bakterií

Výpočet množství bakterií v 1 ml suspenze:

$$12201626,02 \times 100 = 1,2 \cdot 10^9 \text{ bakterií}$$

### 8.1.3 Stanovení počtu bakterií plotnovou metodou

Kultivace se provádí na živné půdě VČŽL (krystalová violet, neutrální červeň, žlučové soli a laktóza). Z předpokládaného počtu bakterií ( $1,2 \cdot 10^9$ ) se odvodí, že hlavní ředění bude  $10^{-7}$ . Zaočkuje se 6., 7. a 8. ředění přelivem živnou půdou VČŽL. Kultivace probíhá při  $30^\circ\text{C}$  po dobu 24 hodin. Po kultivaci se vyberou Petriho misky obsahující více než 10 a méně než 150 kolonií. Pro stanovení počtu  $N$  koliformních bakterií v 1 ml suspenze se použije následující rovnice:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d} \quad (1)$$

kde  $\sum C$  je součet charakteristických kolonií spočítaných na vybraných plotnách  
 $n_1$  počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění  
 $n_2$  počet ploten použitých pro výpočet ze druhého ředění  
 $d$  faktor ředění (první pro výpočet použité ředění)

Touto metodou se stanovil počet koliformních bakterií  $1 \cdot 10^8/\text{ml}$ .

## 8.2 Příprava vzorku č. 1 a vzorku č. 2

Nejprve byly čtyři kádinky o objemu 1 l vysterilizovány v autoklávu. Do každé z kádinek byl asepticky odtočen 1 kg zahuštěné slazené smetany z tubovačky Norden. Naplněné kádinky byly opatřeny aluminiovou zátkou a odneseny do mikrobiologické laboratoře.

Cílem bylo, aby ve vzorku č. 1 bylo řádově  $10^3$  koliformních bakterií a ve vzorku č. 2 řádově  $10^2$  koliformních bakterií. Proto byly připraveny dvě suspenze. Jedna s počtem koliformních bakterií  $10^6$  a druhou s počtem  $10^5$ . Ve výsledku bylo poté zjištěno, že v připravených suspenzích se nacházelo 10krát až 100krát více bakterií. První dvě kádinky se zahuštěnou slazenou smetanou byly označeny číslem 1 a do každé bylo odpipetováno 3 ml inokula o koncentraci  $10^6$  koliformních bakterií v 1 ml. Obě kádinky byly důkladně promíchány sterilní nerezovou tyčinkou. Zbylé dvě kádinky se zahuštěnou slazenou smetanou

byly jednotlivě kontaminovány 3 ml inokula o koncentraci  $10^5$  koliformních bakterií v 1 ml a opět důkladně promíchány sterilní nerezovou tyčinkou.

### **Plnění kontaminované zahuštěné smetany do jednotlivých tub**

Čisté tuby byly označeny a naplněny tak, aby tuba se zahuštěnou slazenou smetanou vážila 82,5 g, což odpovídá normální hmotnosti při běžném plnění tub. Naplněné tubičky byly asepticky uzavřeny na tubovačce Norden 2002. Tubičky byly podle čísla vzorku rozděleny do dvou kartonových krabic a zavřeny folií.

Vzorky se uchovávají v laboratoři při pokojové teplotě. Každý třetí den se provádí kultivační vyšetření. Hodnoty vyšetření se průběžně zaznamenávají do laboratorního deníku.

## **8.3 Vlastní postup při zpracování vzorku**

Laboratorní zpracování vzorků se skládá z několika operací:

- 1. otevírání obalů vzorků**
- 2. navážka (odměření) množství potřebného k vyšetření**
- 3. homogenizace**
- 4. ředění**
- 5. očkování do živných půd**
- 6. kultivace**

Doba od započetí přípravy navážky vzorku a jeho ředění do započetí inokulace živných půd nesmí přesáhnout 30 minut. Doba mezi ukončením přípravy inokula (výchozí suspenze, ředění) a okamžikem, kdy se inokulum přelévá půdou, nesmí překročit 15 min.<sup>[19]</sup>

### **8.3.1 Otevírání obalů vzorků**

Obal, v němž je vzorek uložen, se musí otevřít takovým způsobem, aby bylo možno odebrat navážku odpovídající průměrným hodnotám celého vzorku a současně aby nemohlo dojít ke kontaminaci. K otevření byl použit ostrý bodec, který byl, stejně jako obal Jensenky, potřen dezinfekčním roztokem a následně plamenem sterilován.

### 8.3.2 Navážka (odměření) vzorku

Ze vzorků se musí odebrat navážka tak, aby v ní byly rovnoměrně zastoupeny všechny složky vzorku. Hmotnost vzorku je 10 g.

### 8.3.3 Homogenizace vzorku

Homogenizací se rozumí rovnoměrné rozptýlení mikroorganismů do celého objemu zkoušeného vzorku nebo jeho ředění. K přípravě výchozí suspenze se použije 10 g zkušebního vzorku a ten se smísí s devítinásobným množstvím ředícího roztoku. Ředícím roztokem je fyziologický roztok s peptonem o pH 7, případně destilovaná voda.<sup>[11]</sup>

Homogenizace vzorku probíhá v odměrné baňce, ve které je devítinásobek destilované vody a u dna sterilizované skleněné kuličky. Baňka je opatřena vatovou zátkou. Krouživým pohybem se obsah rozmíchá – homogenizuje.

Nesprávná nebo nedostatečná homogenizace může způsobit, že v různých částech vzorku (nebo ředění vzorku) je nestejná koncentrace mikroorganismů. To způsobí, že na souběžně očkovaných miskách vyrůstají velmi rozdílné počty kolonií. Obsahuje-li vzorek po homogenizaci hrubé částice, mohou po naočkování do živné půdy překrývat vyrostlé kolonie nebo naopak mohou být při odečítání omylem považovány za kolonie.

### 8.3.4 Ředění vzorku

Účelem ředění je dosáhnout takové koncentrace mikrobů v inokulu, aby se kolonie, které narostou v naočkovaných půdách, daly dobře spočítat. Příliš nízký i příliš vysoký počet kolonií může být příčinou nesprávného stanovení. Při vysokém počtu jsou kolonie drobné, hustě nahlučené. Mohou srůstat, překrývat se, vzájemně se inhibovat apod. odečítání je namáhavé a snadno dochází k chybám.

### 8.3.5 Očkování do živné půdy

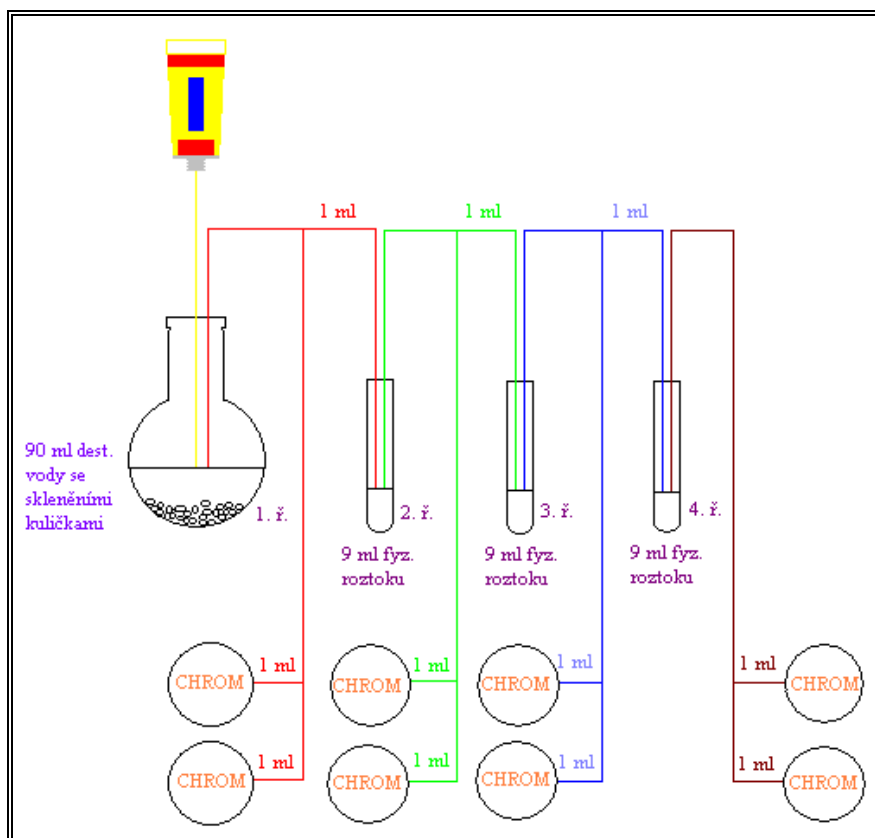
Při očkování je třeba zvolit množství inokula, stupeň ředění a způsob očkování. Při očkování agarových půd přelivem se očkuje 1 ml vzorku nebo jeho ředění. Při očkování agarových půd roztěrem se na povrch ztuhlé půdy rozetře 0,1 ml nebo 0,2 ml vzorku nebo ředění.

Stupeň ředění se určuje podle předpokládaného počtu mikroorganismů. Vychází se z příslušných norem tak, aby se celkový počet koliformních bakterií pohyboval 15 – 150 charakteristických kolonií a u *E. coli* 15 – 150 charakteristických kolonií.<sup>[11]</sup>



U vzorku č. 1 bylo naočkováno zpočátku 2., 3. a 4. ředění. Později, když klesl jejich počet, bylo naočkováno 1., 2. a 3. ředění.

U vzorku č. 2 bylo naočkováno zpočátku 1., 2. a 3. ředění, později byla naočkována pouze dvě ředění – první a druhé. Třetí ředění nebylo nutno očkovat, protože již bylo negativní.



Obr. 2. Ředění (1. - 4.) a očkování zahuštěné slazené smetany

### Způsob očkování

Očkování přelivem do živné půdy Chromocult. Sterilní pipetou se naočkuje upravený vzorek – 1. ředění do dvou sterilních Petriho misek. Do každé misky 1 ml inokula. Inokulum v Petriho miskách se do 15 minut přelije rozpuštěnou agarovou půdou vytemperovanou na  $45 \pm 0,5$  °C v množství  $18 \pm 2$  ml. Agarová půda má být silná asi 4 mm. Nalítá půda se na pracovní desce stolu promíchá krouživými pohyby po a proti směru otáčení hodinových ručiček s inokulem, aby se mikroorganismy dokonale rozptýlily v celém objemu půdy. S promícháním je třeba začít ihned po nalití a skončit se musí dříve, než začne půda rosolovatět. Po promíchání se musí nechat misky s půdou v klidu, dokud agarová vrstva úplně neztuhne.

Tento postup se opakuje s dalšími ředěními (2., 3., případně 4. ředění), vždy s novou sterilní pipetou pro každé ředění. Sterilita půdy se ověřuje kontrolní plotnou, která se nalije při zalívání inokula. Po úplném ztuhnutí se povrch zaočkované půdy přelije ještě cca 4 ml téže půdy o teplotě  $(45 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$  a nechá se utuhnout. K mikrobiologickému stanovení se použila průmyslově vyrobená živná půda Chromocult.

### 8.3.6 Kultivace

Naočkované Petriho misky se ukládají do termostatu obrácené dnem vzhůru. Růst mikroorganismů v živém prostředí je ovlivněn hlavně teplotou, přístupem kyslíku a vlhkostí. Teplota je v termostatu udržována automaticky na zvolené hodnotě  $37 ^\circ\text{C}$  po dobu 24 hodin. Doba kultivace záleží na stanovované skupině mikroorganismů a použitým druhu živné půdy. Jestliže je nedostatečná, bývají kolonie příliš malé a mohou být přehlédnuty. Příliš dlouhá kultivace může vést k přerůstání a srůstání kolonií, k vysychání půdy a k nežádoucím změnám indikátorových reakcí v diagnostických půdách.

### 8.3.7 Odečítání a hodnocení výsledků

Po určené době inkubace se spočítají charakteristické kolonie koliformních bakterií. Nový selektivní agar fy Merck Chromocult R Coliformen Agar umožňuje rozlišit kolonie *Escherichia coli*, jiných koliformních bakterií a jiných druhů enterobakterií na jedné plotně podle různého zbarvení kolonií. Kolonie *Escherichia coli* jsou na tomto agaru tmavě fialovomodré, kolonie ostatních koliformních bakterií červené a kolonie jiných enterobakterií bezbarvé.

Zcela spolehlivě nelze koliformní bakterie rozdělit na rizikové, potenciálně patogenní „fekální“ koliformní a nepatogenní environmentální („z prostředí“). V normě používané inkubační teploty  $30 ^\circ\text{C}$ ,  $35 ^\circ\text{C}$  nebo  $37 ^\circ\text{C}$  jsou jen optimální pro růst jednotlivých typů ( $30 ^\circ\text{C}$  pro koliformní bakterie z prostředí,  $35\text{-}37 ^\circ\text{C}$  pro fekální koliformní bakterie), avšak oba typy jsou schopny růst i při supra- resp. sub- optimálních teplotách, takže při žádné z uvedených tří teplot nelze selektivně vykultivovat pouze jeden z obou typů koliformních. Typ koliformních bakterií vykultivovaný při té které ze tří uvedených teplot může spíše záviset na typu koliformních, který převládá v analyzovaném vzorku než na konkrétní inkubační teplotě. <sup>[11], [19]</sup>

## Výpočet

Pro výpočet se použijí misky obsahující méně než 150 charakteristických kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředění. Je třeba, aby jedna z těchto misek obsahovala alespoň 15 charakteristických kolonií.

Počet  $N$  koliformních bakterií na 1 gram výrobku se vypočte podle následující rovnice:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d} \quad (2)$$

kde  $\sum C$  je součet charakteristických kolonií spočítaných na vybraných plotnách

$n_1$  počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění

$n_2$  počet ploten použitých pro výpočet ze druhého ředění

$d$  faktor ředění (první pro výpočet použité ředění)

Výsledek se vyjádří jako počet koliformních bakterií v 1 g vzorku.

## 8.4 Chromogenní živná půda

Pro stanovení koliformních bakterií použijeme předem připravené živné půdy.

Chromogenní plotnová půda: kryptonový agar se žlučovými solemi obsahující kyselinu 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-glukuronovou (ve zkratce TBA s BCIG, rovněž se užívá zkratka TBX za Tryptone Bile X-glucuronide medium).

Kultivační půda: agar s tryptonem, žlučovými solemi a glukuronidem (agar TBX)

### Složení:

Enzymaticky natrávený kazein	20 g
Žlučové soli (purifikované)	1,5 g
Kyselina 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-glukuronová (BCIG)	0,075 g
Dimethyl sulfoxid (DMSO)	3 ml
Agar	9 až 18 g
Voda	1 000 ml

**Příprava kompletní půdy:**

Všechny složky základu půdy spolu s roztokem BCIG v dimethyl sulfoxidu se rozpustí ve vodě za varu. Upraví se pH tak, aby po sterilaci jeho hodnota činila  $7,2 \pm 0,2$  při 25 °C. sterilace v autoklávu s teplotou udržovanou na 121 °C po dobu 15 min.

Sterilní médium rozpuštěné a vychlazené na 50 °C se rozlévá po 12 – 15 ml do sterilních PM, pokud se očkuje roztěrem.

## 9 POČET KOLIFORMNÍCH BAKTERIÍ V ZAHUŠTĚNÉ SLAZENÉ SMETANĚ

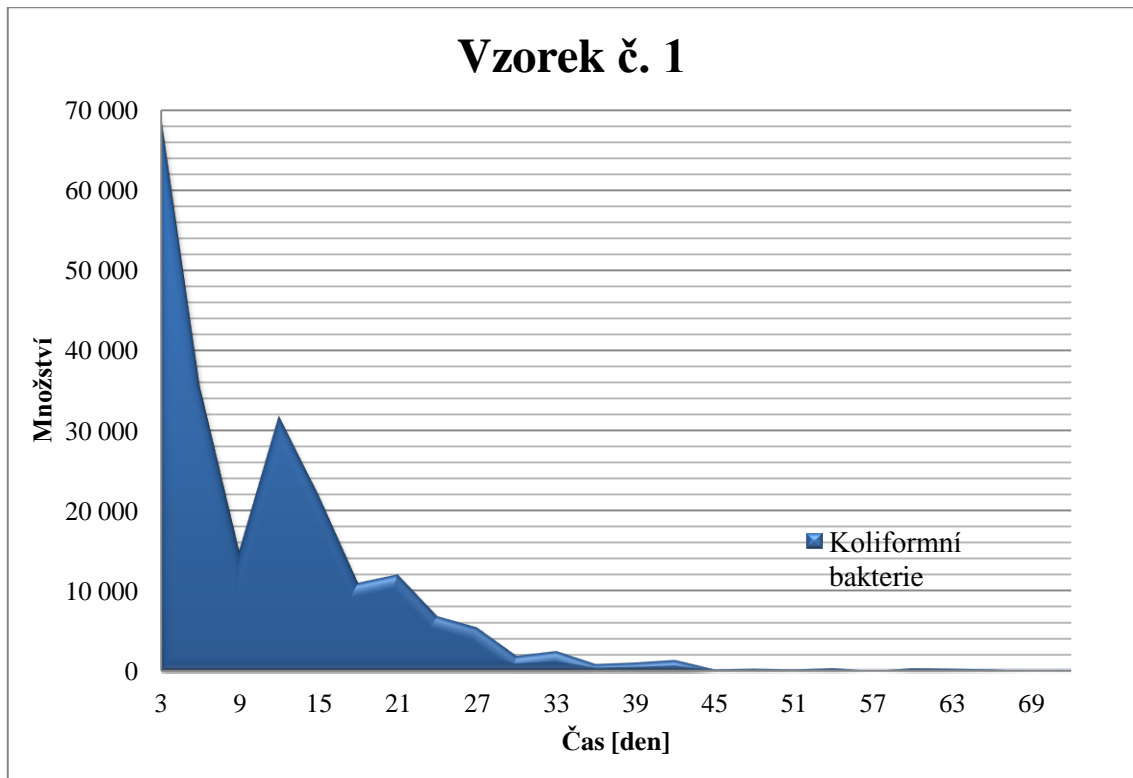
### 9.1 Zpracování výsledků pro vzorek č. 1 do tabulky

Tab. 6. Průběh sledování koliformních bakterií ve vzorku č. 1

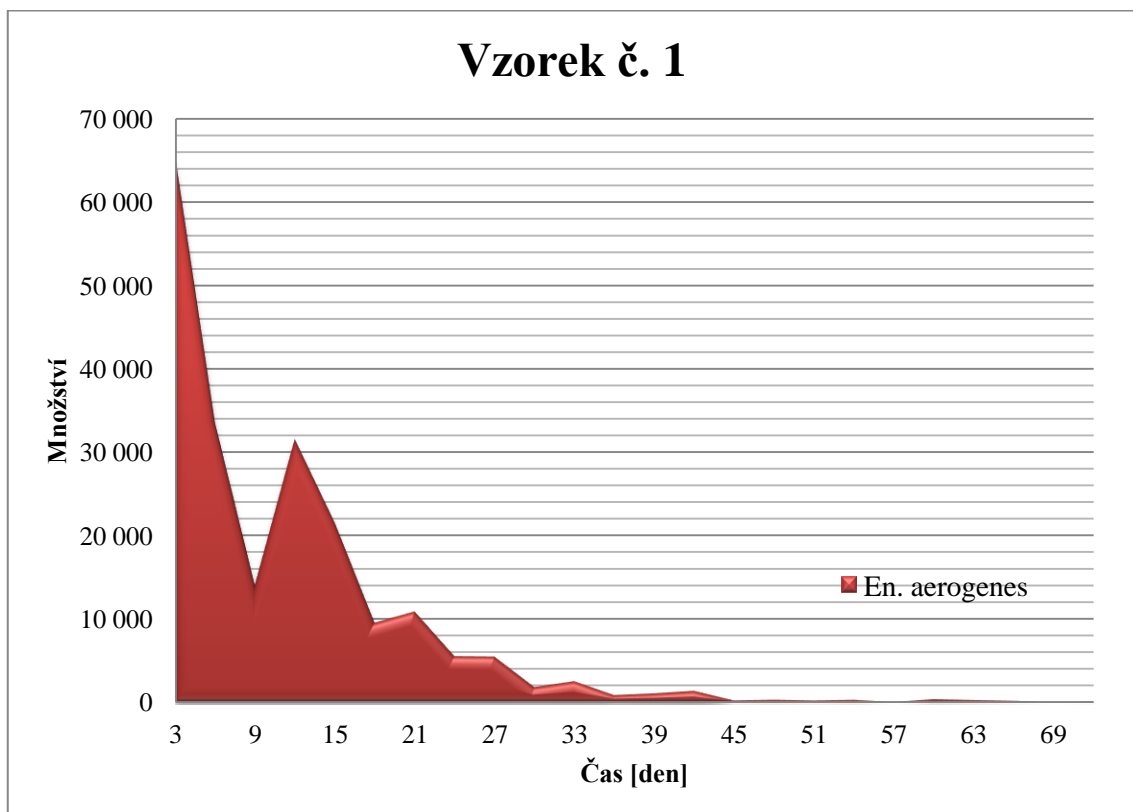
Čas [den]	1. PM	2. PM	Ředění	<i>En. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	Počet KTJ
3	1 122	939	2. ředění	65500	4550	<b>70 050</b>
	67	73	3. ředění			
	5	6	4. ředění			
6	438	418	2. ředění	33500	2150	<b>35 650</b>
	31	36	3. ředění			
	negativní	1	4. ředění			
9	330	-	2. ředění	14000	1000	<b>15 000</b>
	14	-	3. ředění			
	3	-	4. ředění			
12	296	333	2. ředění	31500	350	<b>31 850</b>
	234	222	3. ředění			
	35	29	4. ředění			
15	229	216	2. ředění	21500	500	<b>22 000</b>
	25	18	3. ředění			
	4	5	4. ředění			
18	371	441	2. ředění	9500	1500	<b>11 000</b>
	11	8	3. ředění			
	1	negativní	4. ředění			
21	115	125	2. ředění	10857	1200	<b>12 057</b>
	11	14	3. ředění			
	negativní	negativní	4. ředění			
24	68	69	2. ředění	5500	1350	<b>6 850</b>
	11	13	3. ředění			
	negativní	negativní	4. ředění			
27	77	32	2. ředění	5450	0	<b>5 450</b>
	negativní	negativní	3. ředění			
	negativní	negativní	4. ředění			
30	201	187	1. ředění	1800	100	<b>1 900</b>
	9	10	2. ředění			
	2	negativní	3. ředění			
33	307	364	1. ředění	2400	100	<b>2 500</b>
	23	27	2. ředění			
	2	3	3. ředění			

Čas [den]	1. PM	2. PM	Ředění	<i>En. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	Počet KTJ
36	85	90	1. ředění	835	40	<b>875</b>
	1	1	2. ředění			
	negativní	negativní	3. ředění			
39	107	107	1. ředění	1045	25	<b>1 070</b>
	3	3	2. ředění			
	negativní	negativní	3. ředění			
42	123	155	1. ředění	1350	40	<b>1 390</b>
	negativní	9	2. ředění			
	negativní	1	3. ředění			
45	14	27	1. ředění	195	10	<b>205</b>
	1	1	2. ředění			
	negativní	negativní	3. ředění			
48	25	34	1. ředění	280	15	<b>295</b>
	negativní	negativní	2. ředění			
	negativní	negativní	3. ředění			
51	10	30	1. ředění	185	15	<b>200</b>
	negativní	negativní	2. ředění			
	negativní	negativní				
54	30	43	1. ředění	270	95	<b>365</b>
	2	1	2. ředění			
	negativní	negativní	3. ředění			
60	34	39	1. ředění	350	15	<b>365</b>
	4	5	2. ředění			
	negativní	negativní	3. ředění			
63	33	27	1. ředění	240	60	<b>300</b>
	negativní	negativní	2. ředění			
	negativní	negativní	3. ředění			
66	20	20	1. ředění	150	50	<b>200</b>
	1	3	2. ředění			
	negativní	negativní	3. ředění			
72	9	11	1. ředění	95	5	<b>100</b>
	2	negativní	2. ředění			
	negativní	negativní	3. ředění			

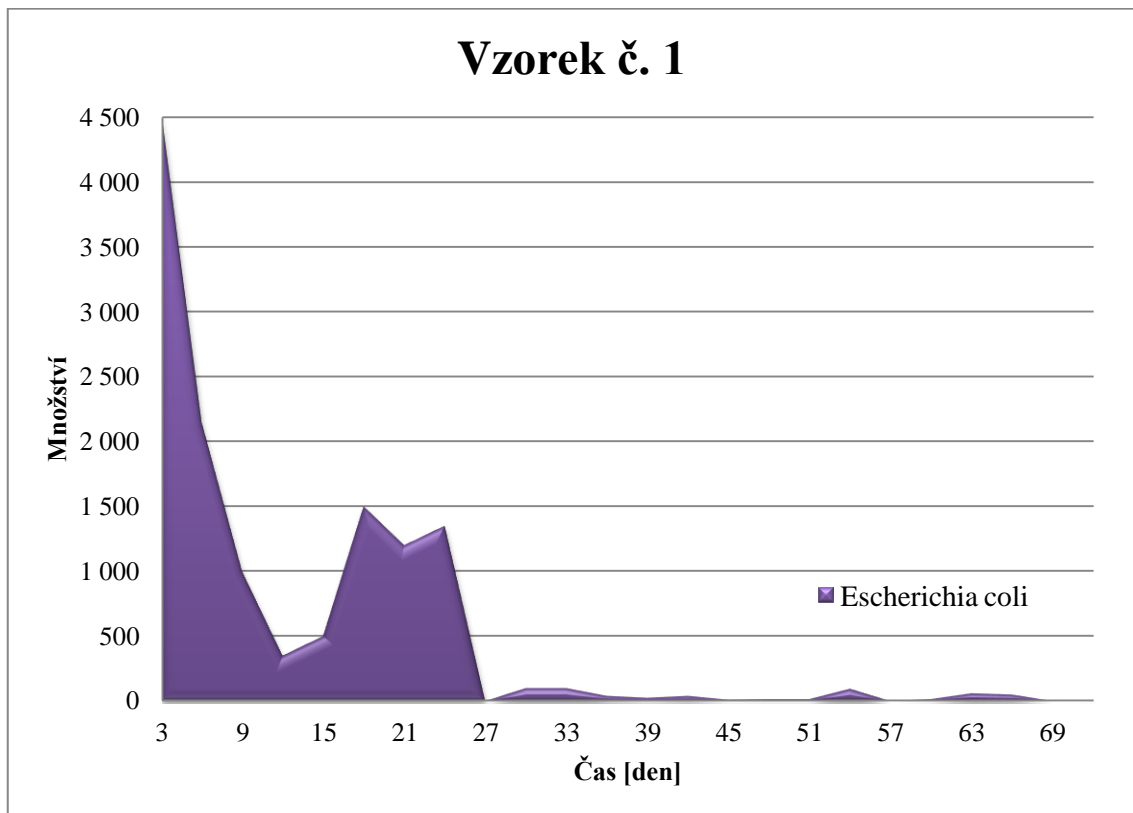
## 9.2 Grafické zpracování vzorku č. 1



Obr. 3. Graf závislosti počtu koliformních bakterií v 1 g vzorku č. 1 na čase



Obr. 4. Graf závislosti počtu *En. aerogenes* v 1 g vzorku č. 1 na čase



Obr. 5. Graf závislosti počtu *Escherichia coli* v 1 g vzorku č. 1 na čase



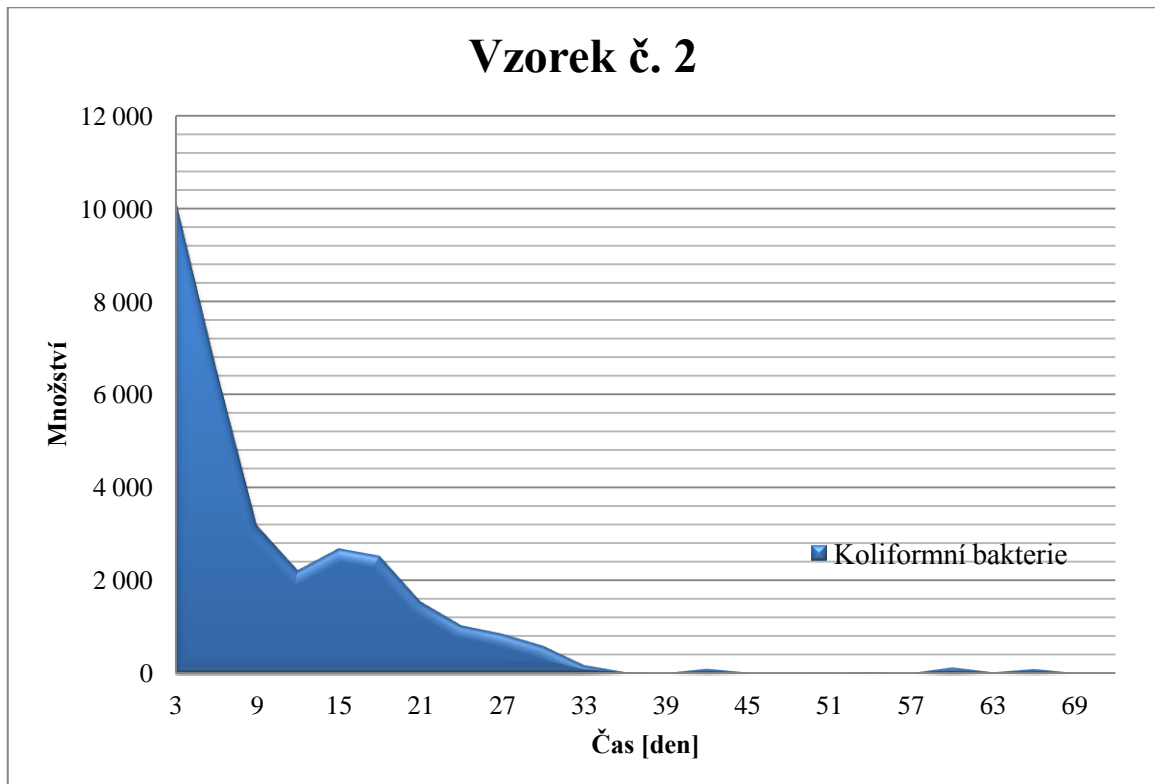
### 9.3 Zpracování výsledků pro vzorek č. 2 do tabulky

Tab. 7. Průběh sledování koliformních bakterií ve vzorku č. 2

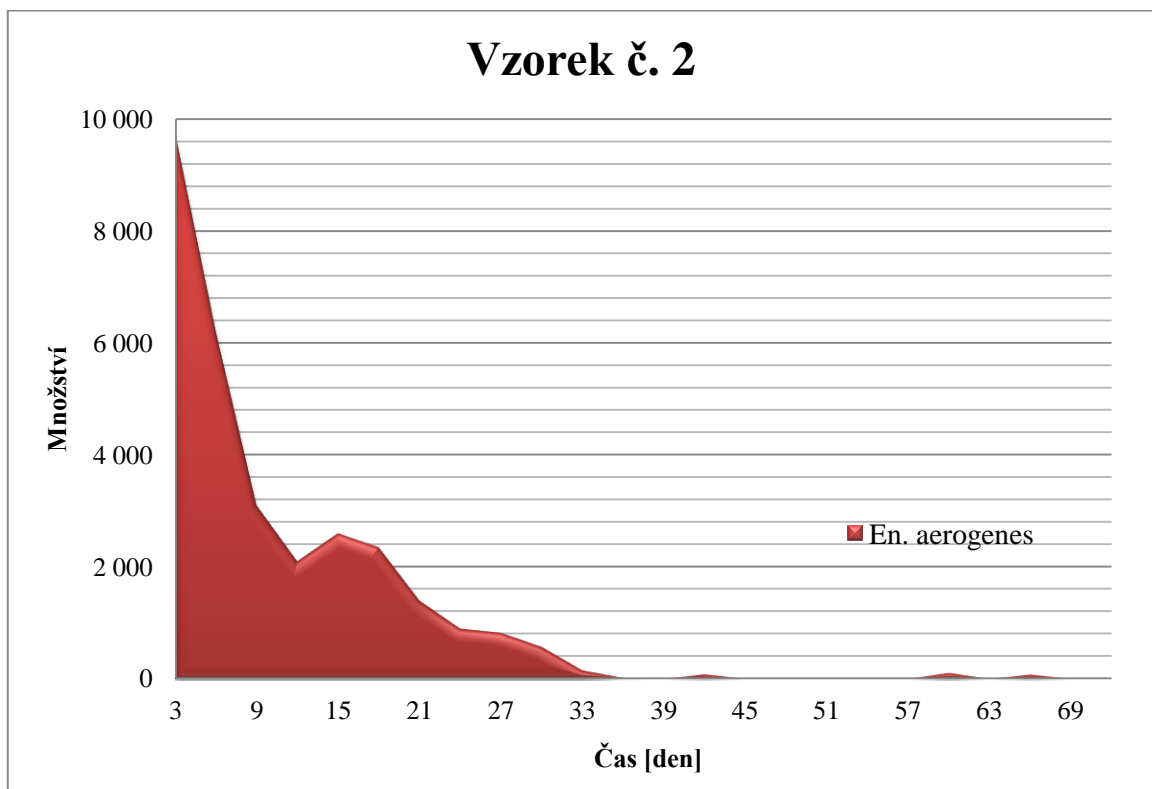
Čas [den]	1. PM	2. PM	Ředění	<i>En. aerogenes</i>	<i>E.coli</i>	Počet KTJ
3	532	1017	1. ředění	9 750	473	<b>10 223</b>
	107	110	2. ředění			
	5	6	3. ředění			
6	616	619	1. ředění	6200	357	<b>6 557</b>
	68	58	2. ředění			
	2	2	3. ředění			
9	233	-	1. ředění	3100	80	<b>3 180</b>
	31	-	2. ředění			
	5	-	3. ředění			
12	500	341	1. ředění	2100	110	<b>2 210</b>
	21	21	2. ředění			
	4	3	3. ředění			
15	168	178	1. ředění	2600	80	<b>2 680</b>
	28	24	2. ředění			
	1	5	3. ředění			
18	292	251	1. ředění	2350	170	<b>2 520</b>
	19	32	2. ředění			
	5	negativní	3. ředění			
21	298	180	1. ředění	1400	140	<b>1 540</b>
	20	17	2. ředění			
	negativní	1	3. ředění			
24	268	230	1. ředění	900	125	<b>1 025</b>
	11	16	2. ředění			
	negativní	negativní	3. ředění			
27	92	77	1. ředění	825	20	<b>845</b>
	6	7	2. ředění			
	negativní	1	3. ředění			
30	54	63	1. ředění	575	10	<b>585</b>
	3	3	2. ředění			
	negativní	negativní	3. ředění			
33	17	17	1. ředění	155	15	<b>170</b>
	1	negativní	2. ředění			
	negativní	negativní	3. ředění			
36	2	2	1. ředění	20	0	<b>20</b>
	negativní	negativní	2. ředění			
	negativní	negativní	3. ředění			
39	negativní	negativní	1. ředění	0	0	<b>0</b>
	negativní	negativní	2. ředění			
	negativní	negativní	3. ředění			

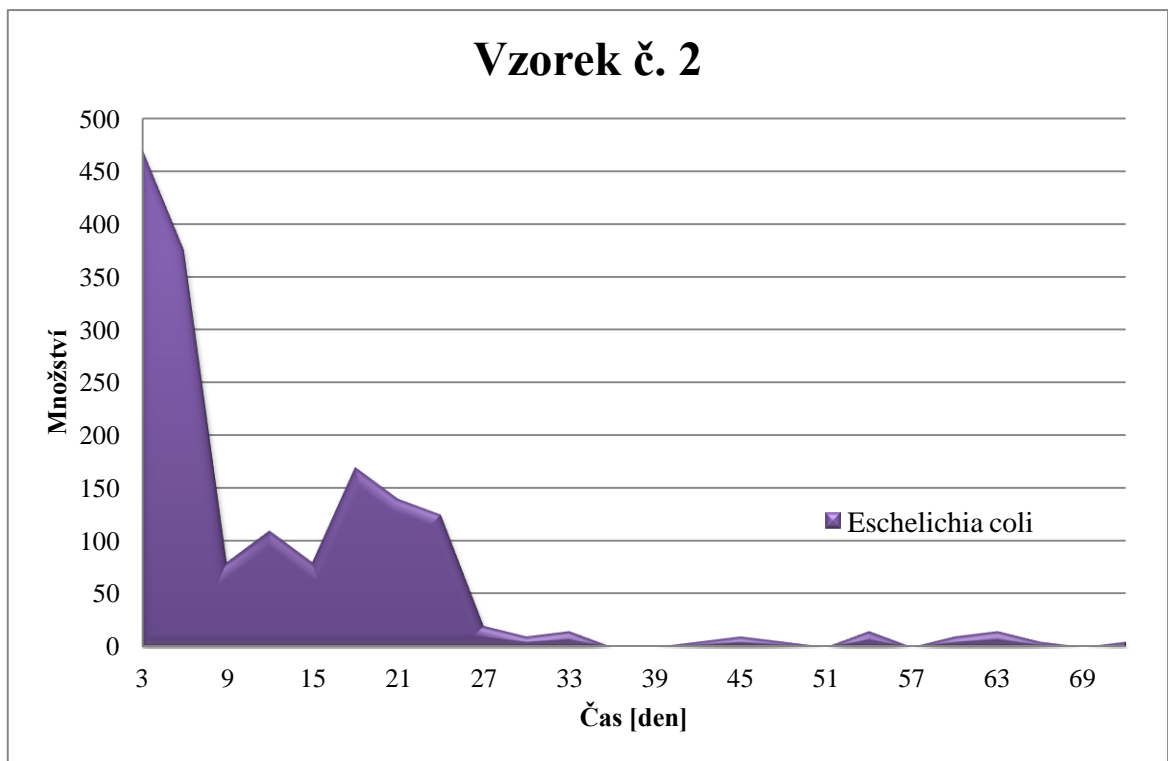
Čas [den]	1. PM	2. PM	Ředění	<i>En. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	Počet KTJ
42	negativní	negativní	1. ředění	85	5	<b>90</b>
	negativní	negativní	2. ředění			
	-	-	3. ředění			
45	1	1	1. ředění	0	10	<b>10</b>
	negativní	negativní	2. ředění			
	-	-	-			
48	1	negativní	1. ředění	0	5	<b>5</b>
	negativní	negativní	2. ředění			
	-	-	-			
51	negativní	negativní	1. ředění	0	0	<b>0</b>
	negativní	negativní	-			
	-	-	-			
54	3	1	1. ředění	5	15	<b>20</b>
	negativní	negativní	-			
	-	-	-			
60	10	14	1. ředění	110	10	<b>120</b>
	2	negativní	2. ředění			
	negativní	negativní	3. ředění			
63	1	2	1. ředění	0	15	<b>15</b>
	negativní	negativní	-			
	-	-	-			
66	7	10	1. ředění	80	5	<b>85</b>
	negativní	negativní	2. ředění			
	negativní	negativní	3. ředění			
72	1	negativní	1. ředění	0	5	<b>5</b>
	negativní	negativní	2. ředění			
	-	-	-			

## 9.4 Grafické zpracování vzorku č. 2



Obr. 6. Graf závislosti počtu koliformních bakterií v 1 g vzorku č. 2 na čase

Obr. 7. Graf závislosti počtu *En. aerogenes* v 1 g vzorku č. 2 na čase



Obr. 8. Graf závislosti počtu *Escherichia coli* v 1 g vzorku č. 1 na čase

## ZÁVĚR

Tak jako všechny organizmy, tak i koliformní bakterie mají své optimální životní podmínky – vhodné pH, optimální teplota, vodní aktivita, osmotický tlak, aerobní a anaerobní prostředí, atd., při kterých jsou životaschopné a dokážou se rozmnožovat.

Cílem mé práce bylo zjistit chování koliformních bakterií v zahuštěné slazené smetaně „Jesence“. Zjistil jsem, že pH i teplota skladování „Jesanky“ je vhodným prostředím pro koliformní bakterie. Hlavní vliv na životaschopnost koliformních bakterií má vodní aktivita, se kterou souvisí osmotický tlak. Snížení vodní aktivity a zvýšení osmotického tlaku se docílí přidáním určitého množství sacharidů a zahuštěním na odparce. Tím dojde k velkému poklesu těchto bakterií v „Jesence“. Dalším faktorem snížení počtu koliformních bakterií v „Jesence“ je anaerobní prostředí v uzavřených tubách. Koliformní bakterie jsou fakultativně anaerobní, tzn. že k životu potřebují částečně i kyslík.

Ve vzorcích (1. i 2.) došlo nejprve k velmi rychlému poklesu, následně k částečnému přizpůsobení danému prostředí a pozvolna až k vymizení koliformních bakterií, a to i přesto, že jsem naočkoval řádově 10x větší množství těchto bakterií.

V praxi by se jenom těžko mohla „Jesenka“ kontaminovat tak velkým počtem těchto bakterií (jedině při nedodržení sanitačních postupů).

Pokles koliformních bakterií ve vzorcích byl závislý na čase. Ve vzorku č. 1. došlo k velkému úbytku bakterií v prvních třech týdnech a k vymizení došlo zhruba za dva měsíce. Ve vzorku č. 2 došlo k velkému úbytku bakterií do deseti dnů od zaočkování, k úplnému vymizení do pěti týdnů. Později se ještě objevilo malé množství těchto bakterií ve vzorku, které bylo způsobeno pravděpodobně nedokonalým rozmícháním inokula v zahuštěné slazené smetaně při přípravě vzorků.

Jesenka se na paletách skladují maximálně jednu třetinu záruční lhůty, což odpovídá 40 dnům při skladovací teplotě maximálně 24 °C. V případě náhodné kontaminace tohoto výrobku koliformními bakteriemi je nutné skladovat odděleně a sledovat jejich počet. V případě výskytu velmi malého množství koliformních bakterií s klesající tendencí lze dát výrobek do prodeje.

Z výsledků vyplývá, že jediným důležitým opatřením pro potlačení výskytu koliformních bakterií je přísné dodržování sanitačních postupů při výrobě, balení a skladování „Jesanky“. V praxi toto zabezpečuje tzv. HACCP systém. Zkratka z anglických slov: „ha-

zard analysis critical control points“. Tento systém představuje nový přístup ke kontrole hygieny potravin. Jednak spočívá v analýze nebezpečí porušení zdravotní nebo hygienické nezávadnosti určitého potravinářského výrobku a potom ve vyhledávání a zabezpečování tzv. kritických bodů nejen v průběhu technologického procesu, ale také i v době skladování, přepravy a distribuce. Důležitým rysem systému je jeho komplexnost, neboť zahrnuje nejen základní technologický postup, ale bere též v úvahu způsoby zacházení a manipulace s potravinářským výrobkem po vlastním ukončení výrobního cyklu či postupu. Kritický kontrolní bod (CCP) představuje postup nebo operace v procesu výroby, distribuce a prodeje potravin, ve kterém je nejvyšší riziko porušení zdravotní nezávadnosti potravin. CCP představují také místa nebo prostory, jsou soustavně kontrolovány a na nichž se uplatňují ochranná opatření k zamezení, odstranění nebo snížení nebezpečí na přijatelnou míru.

Konkrétně u Jesenky jsou stanoveny verifikační (ověřovací) postupy pro dva kritické kontrolní body – pasterace standardizované smetany a pasterace cukerného sirupu. Kontrola těchto kritických bodů se provádí stanovením CPM a koliformních bakterií v zahuštěné smetaně a cukerném sirupu.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

Monografie:

- [1] KLABAN, D. V. *Svět mikrobů: malý mikrobiologický slovník*. Hradec Králové: GAUDEAMUS, 1999, 303 s. ISBN 80-7041-639-4.
- [2] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vydání. Praha: Academia, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [3] NĚMEC, J. a F. DVOŘÁK. *MIKROBIOLOGIE: pro 2. ročník učilišť a učňovských škol oborů mlékař, lučebník tuků a konzervář*. 2. vydání. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1971, 546 s.
- [4] DOLEŽÁLEK, J. *Mikrobiologie: mlékárenského a tukařského průmyslu*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1962, 135 s.
- [5] LUKÁŠKOVÁ, J. *Hygiena mléka a mléčných výrobků: praktická cvičení*. Brno: Ediční středisko VFU, 1995.
- [6] JIČÍNSKÁ, E. a J. HAVLOVÁ. *Patogenní mikroorganismy v mléce a mléčných výrobcích*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1995, 56 s. ISBN 80-85120-47-X.
- [7] SPRENGER, R.A. *Hygiena potravin pro středně pokročilé*. 4. vydání. 1999, 56 s. ISBN 1-904544-19-3.
- [8] KOŠÍKOVÁ, J., Z. NOVOTNÝ a S. WASSERBAUER. *Hygienické minimum pro pracovníky v potravinářství*. 2. vydání. Jihlava, 1999, 38 s.
- [9] KLABAN, V. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Jihlava: Okresní hygienická stanice Jihlava, 2005, 38 s. ISBN 80-7262-341-9.
- [10] MATYÁŠ, Z. *OBEČNÁ HYGIENA POTRAVIN*. 1991, 214 s.
- [11] ŽIŽKA, B. a M. KORBEOVÁ. *Mikrobiologie I*. 1992, Praha, 195 s.
- [12] Provozní materiály Mlékárny Hlinsko, s.r.o.
- [13] ATLAS, Ronald M. *Microorganisms in our World*. St. Louis: Mosby-Year Book, 1995. ISBN 08-8016-7804-8.
- [14] HAYES, P.R. *FOOD MICROBIOLOGY AND HYGIENE*. Second Edition. London: CHAPMAN & HALL, 1995. ISBN 0 412 53980 2.

- [15] SPRENGER, Richard A. *Food Hygiene Handbook*. 16th Edition. Doncaster: highfield.co.uk, 2003, 64 s. ISBN 1 904544 18 5.
- [16] LOBOVSKÁ, Alena. *Infekční nemoci: Učební texty Univerzity Karlovy v Praze*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2002, 263 s. ISBN 80-246-0116-8.
- [17] GÖRNER, Fridrich a Lubomír VALÍK. *APLIKOVANÁ MIKROBIOLOGIE POŽIVATÍN*. Bratislava: MALÉ CENTRUM, 2004, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [18] JIČÍNSKÁ, Eva a Jana HAVLOVÁ. *METODY DETEKCE PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ V POTRAVINÁCH*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1996, 115 s. ISBN 80-85120-49-6.
- [19] JIČÍNSKÁ, Eva a Jana HAVLOVÁ. *MIKROBIOLOGICKÁ KONTROLA POTRAVIN A POTRAVINÁŘSKÝCH SUROVIN V LEGISLATIVĚ EU*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1998, 84 s. ISBN 80-85120-95.
- [20] GÖPFERTO VÁ, Dana, Daniela JANO VSKÁ a Karel DOHNAL. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena*. 2. vydání. Praha: Triton, 1999, 134 s. ISBN 80-7254-049-1.
- [21] ROLNÝ, Dušan. *MIKROBIOLOGIE, EPIDEMIOLOGIE A HYGIENA*. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p., 1981, 164 s.
- [22] KARPÍŠKOVÁ, Renáta. *Výživa a potraviny: Zpravodaj pro školní stravování*. Praha: výživaservis, 2011, ROČNÍK 66, 6/2011. ISSN 1211-846X.

#### Internetové zdroje:

- [23] Escherichia coli. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: [http://cs.wikipedia.org/wiki/Escherichia\\_coli](http://cs.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli)
- [24] Escherichia coli. KRMENČÍK, P. a J. KYSILKA. [online]. [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: [http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/escherichia\\_coli.php](http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/escherichia_coli.php)
- [25] Escherichia coli. [online]. [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=76555>
- [26] Jesenka. [online]. [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: <http://www.tatramleko.cz/img/produkty/big/tuba-slazena-smetana-23.jpg>
- [27] Klasa JESENKA. [online]. [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: <http://www.tatramleko.cz/certifikaty/Klasa-JESENKA.pdf>



- [28] Escherichia coli O157:H7. [online]. [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: <http://feww.wordpress.com/category/new-zealand/>
- [29] Escherichia coli. [online]. [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: <http://www.bacterialinfection.net/causes-of-bacterial-infections>
- [30] BLAŽKOVÁ, Martina, Ladislav FUKAL a Pavel RAUCH. NEBEZPEČNÝ PATOGEN Enterobacter sakazakii A JEHO DETEKCE. *Chemické listy* [online]. 2009 [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010\\_02\\_113-118.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_02_113-118.pdf)
- [31] Cronobacter sakazakii. *Veterinární farmaceutická univerzita Brno* [online]. [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: <http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/cs/cs.html>
- [32] Vývoj imunochemických metod detekce a charakterisace kmenů bakterie Enterobacter sakazakii. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/studium/temata/anotace/hochel01cz.pdf>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

MO	Mikroorganizmy
DNA	Kyselina deoxyribonukleová
MID	Minimální infekční dávka
KTJ	Kolonie tvořící jednotku
EEC	Enterovirulentní E. coli
EPEC	Enteropatogenní E. coli
ETEC	Enterotoxigenní E. coli
EIEC	Enteroinvazivní E. coli
EHEC	Enterohemoragické E. coli
A/EEC	Attaching and effacing E. coli
EAEC	Enteroadgregativní E. coli
HUS	Hemolytický-uremický syndrom
CPM	Celkový počet mikroorganismů
SB	Somatické buňky
RIL	Rezidua inhibičních látek
SH	Soxhlet-Henkela
VČŽL	Krystalová violet, neutrální červeň, žlučové soli a laktóza
DMSO	Dimethyl sulfoxid
BCIG	Kyselina 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-glukuronová
PM	Petriho miska
$a_w$	Aktivita vody
HACCP	Hazard analysis critical control points
CCP	Kritické kontrolní body
ČSN	České technické normy

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1. <i>Escherichia coli</i> O157:H7 <sup>[28]</sup> .....	28
Obr. 2. Ředění (1. - 4.) a očkování zahuštěné slazené smetany.....	49
Obr. 3. Graf závislosti počtu koliformních bakterií v 1 g vzorku č. 1 na čase .....	55
Obr. 4. Graf závislosti počtu <i>En. aerogenes</i> v 1 g vzorku č. 1 na čase .....	55
Obr. 5. Graf závislosti počtu <i>Escherichia coli</i> v 1 g vzorku č. 1 na čase .....	56
Obr. 6. Graf závislosti počtu koliformních bakterií v 1 g vzorku č. 2 na čase .....	59
Obr. 7. Graf závislosti počtu <i>En. aerogenes</i> v 1 g vzorku č. 2 na čase .....	59
Obr. 8. Graf závislosti počtu <i>Escherichia coli</i> v 1 g vzorku č. 1 na čase .....	60
Obr. 9. Jesenka - zahuštěná slazená smetana <sup>[26]</sup> .....	71
Obr. 10. Ocenění Jesenky <sup>[27]</sup> .....	72
Obr. 11. <i>Escherichia coli</i> <sup>[29]</sup> .....	73

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1. Biotopy <i>Escherichia coli</i> .....	23
Tab. 2. Klinické a patologické obrazy průjmových <i>E. coli</i> infekcí <sup>[16]</sup> .....	26
Tab. 3. Smyslové požadavky na zahuštěné mléčné výrobky .....	41
Tab. 4. Některé fyzikální a chemické požadavky (průměrné složení v procentech) .....	41
Tab. 5. Počet koliformních bakterií v 1/8 zorného pole .....	45
Tab. 6. Průběh sledování koliformních bakterií ve vzorku č. 1 .....	53
Tab. 7. Průběh sledování koliformních bakterií ve vzorku č. 2 .....	57

## SEZNAM PŘÍLOH

- P I Popis výrobku
- P II Jesenka - zahuštěná slazená smetana
- P III Ocenění Jesenky
- P IV *Escherichia coli*

## **PŘÍLOHA P I: POPIS VÝROBKU**

**Název výrobku:** Zahuštěná slazená smetana

**Obchodní jméno:** Jesenka 75 g

**Výrobce:** Mlékárna Hlinsko, s.r.o.

**Způsob použití:** Přímá spotřeba

**Vlastnosti výrobku:** Zahuštěná slazená smetana s obsahem tuku 23 % a obsahem sušiny 76%.

Smetana je homogenizovaná, slazená přídatkem sacharózy a plněná do hliníkových tub.

Hliníkové tuby jsou na vnitřní straně lakované potravinářským lakem.

Tuby jsou zavírány strojně založením.

Průměrná výživová energie ve 100 g výrobku:

Energie: 1790 kJ/430 kcal

Bílkoviny: 5,3 g

Sacharóza: 44,2 g

Laktóza: 7,8 g

Tuk: 23 g

PN-HL-5-03

Hmotnost: tuba 75 g

Datum výroby

Datum minimální trvanlivosti: 3 měsíce od data výroby

**Způsob balení:** Výrobek je balen do hliníkových tub s vnitřní lakovou úpravou, s plastovými uzávěry. Tuby jsou ukládány po 48 kusech do lepenkových krabic, které jsou přepáskovány polyetylenovou páskou a ukládány na palety.

**Skladování:** Skladování při teplotě od 2 °C do 24 °C

### **Popis způsobu užití u spotřebitele:**

- přímá spotřeba všemi skupinami populace
- zahuštěná slazená smetana je vhodná do kávy, čaje, na přípravu sladkých těst a jako poleva na lesní plody
- po otevření ihned spotřebovat

## PŘÍLOHA P II: Jesenka - zahuštěná slazená smetana



Obr. 9. Jesenka - zahuštěná slazená smetana <sup>[26]</sup>

## PŘÍLOHA P III: Ocenění Jesenky



Obr. 10. Ocenění Jesenky <sup>[27]</sup>



**PŘÍLOHA P IV: Escherichia coli**



Obr. 11. Escherichia coli <sup>[29]</sup>