

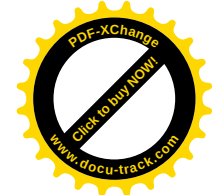
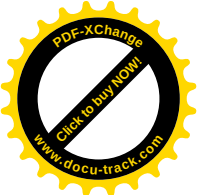
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Diplomová práce

2005

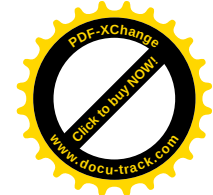
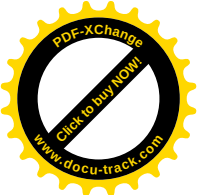
Roman Polzer



Přežívání bakterií ve fermentovaných mléčných výrobcích

Diplomová práce
2005

UTB ve Zlíně
Fakulta technologická

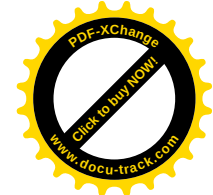
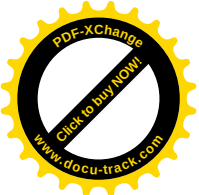


Předem této diplomové práce bych chtěl velice poděkovat panu RNDr. Miroslavu Grossmannovi za cenné podněty, rady a doporučení, které mi velice pomohli a přispěli k realizaci této práce. Dále pak děkuji panu Ing. Danielu Cikánkovi, CSc., za spolupráci, cenné připomínky, ochotu a vstřícnost a hlavně za poskytnutí vzorků pro laboratorní část. Poděkování také patří panu Prof. Ing. Pavlu Březinovi, CSc., za pomoc, ochotu a poskytnuté materiály, bez kterých by zpracování této práce bylo mnohem obtížnější.

Ve Zlíně, 15.04.2005

.....

Roman Polzer



Prohlašuji, že jsem na celé diplomové práci pracoval/a samostatně a použitou literaturu jsem citoval.

Ve Zlíně, 15.04.2005

.....

Roman Polzer



Abstrakt

U fermentovaných mléčných výrobků působí jako specifická překážka kontaminace produktu konkurenční mikroflóra. Ta konkurencí při získávání živin, tvorbou peroxidů, bakteriocinů a kyseliny mléčné tvoří inhibiční prostředí pro kontaminující mikroorganismy. Tato práce se zaměřuje na schopnosti rodu *Lactobacillus* přežívat v mléčných produktech v závislosti na teplotě a době skladování a jeho konkurenceschopnost vůči *E.coli*, *S.aureus*, *E.faecalis*, a *L.grayi* při kontaminaci produktu.

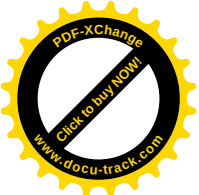
Abstract

Competitive microflora in fermented dairy products effects on products contamination as specific barrier to competition. The competition during nutrients obtaining, peroxide, bacteriocins and lactic acid fermentation creates barrier to competition for most of microorganism. This thesis is focused on *Lactobacillus* ability of survival in fermented dairy products depending on time and temperature storage and his effects on *E.coli*, *S.aureus*, *E.faecalis*, a *L.grayi*..

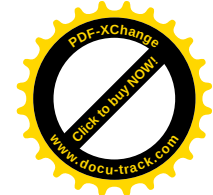
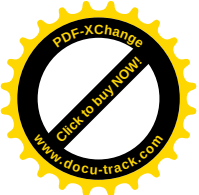


OBSAH

ÚVOD.....	8
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1.1. ROD LACTOBACILLUS.....	10
1.1.1. Taxonomie	10
1.1.2. Vlastnosti.....	10
1.1.3. Výskyt v potravinách a patogenita.....	11
1.1.4. Působení na lidský organismus.....	12
1.2. ESCHERICHIA.....	15
1.2.1. Taxonomie	15
1.2.2. Vlastnosti.....	16
1.2.3. Výskyt v potravinách a patogenita.....	16
1.3. LISTERIA.....	19
1.3.1. Taxonomie	19
1.3.2. Vlastnosti.....	19
1.3.3. Význam v potravinách a patogenita.....	20
1.4. STAPHYLOCOCCUS.....	21
1.4.1. Taxonomie	21
1.4.2. Vlastnosti.....	22
1.4.3. Výskyt v potravinách a patogenita.....	24
1.4.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	24
1.5. ENTEROCOCCUS.....	26
1.5.1. Taxonomie	26
1.5.2. Vlastnosti.....	29
1.5.3. Výskyt v potravinách a patogenita.....	30
1.5.4. <i>Enterococcus faecalis</i>	30
2. STANOVENÍ CÍLŮ A METOD	31
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
3.1. PŘEŽÍVÁNÍ RODU LACTOBACILLUS	32
3.1.1. MATERIÁL.....	32
3.1.2. PODMÍNKY PŘEŽÍVÁNÍ (SKLADOVÁNÍ).....	34
3.1.3. MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR	34
3.1.4. POUŽITÉ PŮDY	35
3.2. PŘEŽÍVÁNÍ PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ	35
3.2.1. SLEDOVANÉ MIKROORGANISMY	35
3.2.2. MATERIÁL.....	35
3.2.3. PODMÍNKY PŘEŽÍVÁNÍ (SKLADOVÁNÍ).....	36
3.2.4. MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR	36
3.2.5. POUŽITÉ PŮDY	37
4. VÝSLEDKY.....	38
4.1. METODIKA HODNOCENÍ	38
4.2. VÝSLEDKY K EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI PŘEŽÍVÁNÍ RODU LACTOBACILLUS.....	38
4.3. VÝSLEDKY K EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI PŘEŽÍVÁNÍ PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ.....	43
DISKUSE.....	55
ZÁVĚR	57
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	59
SEZNAM TABULEK.....	62



SEZNAM PŘÍLOH	63
PŘÍLOHY	64



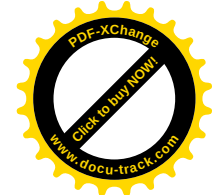
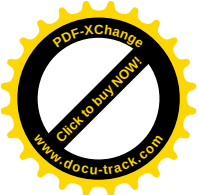
ÚVOD

Výživa je jedním ze základních předpokladů pro udržení života, člověk přijímá potravu v závislosti na podmínkách své existence. Mléko a stejně tak i všechny mléčné výrobky jsou nedílnou součástí výživy již od domestikace zvířat. Nedílnou součástí mlékárenské výroby jsou mikroorganismy. Ty zde vystupují ve funkci ušlechtilých mlékařských kultur a kontaminujících činitelů narušujících jakost, technologii výroby a zdravotní nezávadnost.

Mikroorganismy se při výrobě mléčných výrobků používají od pradávna. Ty již byly v surovině přítomny nebo se do nich dostali z vnějšího prostředí. Později se začaly uměle kultivovat a geneticky šlechtit žádoucí mikroorganismy a cíleně se ve výrobě začali používat. V potravinářských produktech, připravovaných procesem mléčné fermentace pomocí moderní technologie se využívá tzv. startovacích kultur. Tyto jsou bakterie podílející se zásadní činností na typu a kvalitě produktu a jsou v nich trvale přítomny v různém počtu. Přítomnost těchto bakterií deklarují výrobci jako součást kvality výrobku mající, vedle určení jeho charakteru, zásadní vlastnosti spočívající v protektivní schopnosti výrobku na zažívací trakt člověka. Mnohé z nich se dnes označují za tzv. probiotika neboli probiotické kultury.

Naproti tomu mléko a mléčné výrobky jsou vhodným prostředím pro nežádoucí mikroflóru. Jejich negativní účinek spočívá v nežádoucím rozkladu potravin, utlumující činnost ušlechtilých kultur a nejvíce z činnosti patogenních mikroorganismů. Ty způsobují nemoci člověka, jejich rychlé rozmnožování a metabolismus, nedostatečná hygiena mohou vést ke vzniku epidemií až pandemií. Proto úkolem celého potravinářského průmyslu je kromě přeměny potravinářských surovin dostatečně ochránit spotřebitele a společnost před činností těchto mikroorganismů.

Kontaminaci mléka a mléčných výrobků můžeme rozlišit na primární (endogenní) a sekundární (exogenní). Do vemene se mikroorganismy dostávají krevním oběhem nebo otvorem ze struků. Sekundární mikroflórou rozumíme mikroorganismy, které se dostanou do mléka až po nadojení. Ty se pak v mléce za příznivých podmínek rychle rozmnožují a mohou být původci různých vad a onemocnění. Příčin takovéto kontaminace je hned několik. Mikroorganismy se do mléka mohou dostat z těla dojnice. Na kůži a srsti se zachycuje prach a nečistoty, které často obsahují sporogenní aeroby *Bacillus subtilis*, místa znečištěná výkaly obsahují *E.coli* nebo *Aerobacter aerogenes*. Nositelem choroboplodných zárodků může být ošetřující personál. Vzduch ve stájích je obvykle také plný mikroorganismů. V neposlední



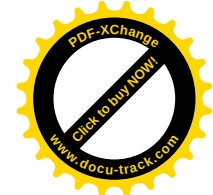
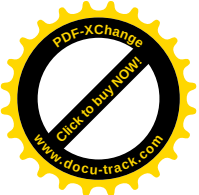
řadě pak nesmíme opomíjet krmivo, stelivo, výkaly, vodu, hmyz nebo nářadí a nádobí, které všechny mohou být zdrojem nežádoucí kontaminace (Doležálek, J., 1962).

Ze statistik vyplývá, že až 10% populace v průmyslově vyspělých zemích může být ročně postihnuto alimentárními onemocněními, jejichž zdrojem jsou potraviny. Proto v poslední době se klade nebývalý důraz na bezpečnost potravin. Všechny národní zdravotní systémy, Mezinárodní zdravotnická organizace, Evropská komise i další vychází při hodnocení potravin ze snižování zdravotních rizik a zdravotní nezávadnosti potravin. Mezinárodní komise pro mikrobiologickou specifikaci potravin (ICMSF) doporučila 6 základních kroků při řízení mikrobiologického rizika potravin:

- 1) odhad pravděpodobného rizika
- 2) volba odstranění rizika
- 3) definice cílů zdravotní nezávadnosti
- 4) potvrzení cílů zdravotní nezávadnosti prostřednictvím správné hygienické praxe a aplikací systému HACCP
- 5) stanovení mikrobiologických kritérií
- 6) definice základních postupů pro přijatelnost potravin

(Burdová, O., Lauková, A., 2001)

Výsledkem těchto činností, správné hygienické a výrobní praxe i uvědomělosti pracovníků ve všech potravinových závodech, pak budou potraviny nejen zdravotně nezávadné, ale i s výbornými technologickými a senzorickými vlastnostmi, s vysokou biologickou a nutriční hodnotou. A právě proto, že obliba fermentovaných mléčných výrobků stále narůstá a tento trend bude pokračovat i v následujících letech, je třeba zabezpečit i zde tyto aspekty.



1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. ROD LACTOBACILLUS

1.1.1. Taxonomie

Rod *Lactobacillus* představuje gram-positivní nesporulující tyčinky. Jsou chemoorganotrofní nebo fakultativně anaerobní mikroorganismy. Jejich základním znakem je rozklad glukosy za vzniku kyseliny mléčné. Vyskytují se střevním traktu, v rostlinných a živočišných produktech obsahujících sacharidy. Patří mezi tzv. čisté mlékařské kultury, v současné době se také díky svému příznivému působení na lidský organismus označuje za tzv. probiotickou kulturu. Taxonomicky rod *Lactobacillus* představuje bakterie čeledi *Lactobacillaceae*. Druhově se jedná o velice početný rod, který pro identifikaci jednotlivých druhů vyžaduje speciální expertizu, neboť běžné testy založené na biochemické aktivitě jsou slabé a závislé na přesných podmínkách daných kultur. (Holt, John G., 1993)

1.1.2. Vlastnosti

Jak již bylo popsáno výše, jedná se o gram-positivní, nesporulující tyčinky až vlákna, které se nevětví. Jsou nepohyblivé, jen vzácně se objevují pohyblivá peritricha. Jsou převážně termofilní mikroorganismy. Optimální teplota je 37 až 45°C. Teploty nad 60°C jsou smrtící. Při teplotách nižších 15°C se jejich růst zastavuje, avšak jsou známy i psychofilní kmeny rodu *Lactobacillus*, které vykazují růst při teplotách menší 5°C. (Šilhánková, L., 2002)

Většinou se jejich růst zastavuje již při 20°C. Optimální pH pro většinu bakterií je v rozmezí 4-5, avšak jednotlivé kmeny se navzájem liší. To souvisí s rezistencí proti inhibičnímu působení organických kyselin. Na přítomnost kyslíku reagují zástupci tohoto rodu různě. Homofermentativní kmeny rodu *Lactobacillus* jsou anaerobní organismy a kyslík na ně působí inhibičně. Všeobecně přítomnost kyslíku snižuje přítomnost produkce kyseliny mléčné, avšak existují i kmeny schopné využít kyslík na získávání NAD a ATP.

Obvykle je jejich růst zlepšen při obsahu 5% CO₂ v prostředí. Při obsahu 10% NaCl v prostředí se jejich růst zastavuje. Jsou kataláza negativní.

V zásadě je rozděluje na :



I. homofermentativní

A. optimální teplota mezi 37-60°C

1. produkující kyselinu mléčnou z laktózy

2. neprodukující kyselinu mléčnou z laktózy

B. optimální teplota mezi 28-32°C

II. heterofermentativní

A. optimální teplota mezi 28-32°C

1. rozkládající laktózu a rafinózu

2. nerozkládající rafinózu a laktózu

B. optimální teplota mezi 35-40°C

(Doležálek, J., 1962)

1.1.3. Výskyt v potravinách a patogenita

Laktobacily jsou považovány za nepatogenní mikroorganismy a hojně proto se využívají právě v potravinářském průmyslu. Zprávy o nálezech těchto mikroorganismů při různých choroboplodných procesech se vyskytují pouze ojediněle.

Rod *lactobacillus* se vyskytuje v přírodě téměř všude. Jeho druhy se vyskytují v mléce, v ústech, v trávicím traktu savců, na travinách, obilí a jiných rostlinách. V potravinářském průmyslu patří z biotechnologického hlediska mezi nejdůležitější mikroorganismy, přičemž největší význam má schopnost fermentace sacharidů za vzniku kyseliny mléčné. Protože kyselina mléčná zastavuje růst a rozmnožování hnilobných bakterií, využívá se činnost laktobacilů pro konzervaci zeleniny a krmiv. Příkladem může být silážování jetelovin a vyslazených řepných řízků, kysání zelí a okurek. V mlékárenském průmyslu se homofermentativní druhy používají při výrobě sýrů, některé pro přípravu kvašeného mléka a mléčných výrobků. Své využití naleznou také v průmyslové výrobě kyseliny mléčné z melasy fermentací sacharosy namísto laktosy. Heterofermentativní druhy se uplatňují v pekařském průmyslu při tvorbě kvásků.

Kromě svého průmyslového využití však může tento rod působit jako nevhodný kontaminant produktů. Některé heterofermentativní laktobacily se vyskytují jako nežádoucí kontaminace ve vinařství a pivovarnictví, kde způsobují sensorické vady. V droždářství mají za následek ztráty výtěžnosti. V masné výrobě mohou způsobovat zelenání produktů,



kdy fermentačně vytvořený peroxid vodíku reaguje s růžovými pigmenty uzeného masa za vzniku zeleného zbarvení.

(Šilhánková, L.,2002)

1.1.4. Působení na lidský organismus

***Lactobacillus* v zažívacím traktu.**

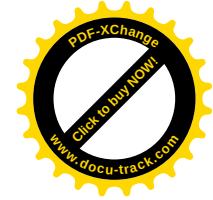
Střevní mikroflóra je komplexní entita s různými kmeny bakterií. V tenkém střevě jsou počty bakterií velmi nízké ve dvanáctníku, jejich počet však postupně narůstá směrem ke konci kyčelníku (ileum). Tlusté střevo osidlují především striktní anaeroby (organismy žijící bez přístupu vzdušného kyslíku). *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* a *Peptostreptococcus*, *Streptococcus* a *Lactobacillus* a v menší míře *Enterobacteriaceae*, *Clostridium* a kvasinky se vyskytují v koncentracích mezi 10^8 až 10^{11} cfu*/g. (http://www.activia.cz/mono_2.htm)

Laktobacily patří do první skupiny bakterií, která byla použita jako probiotikum. Později se začala používat i skupina Bifidobakterií, které mají schopnost kolonizovat trávicí trakt. Do něj se mohou dostat po požití potravin obsahující probiotika jako jsou mléko a jogurt.

Úloha střevní mikroflóry v procesu "trávení" v tlustém střevě.

- a) Metabolismus sacharidů (cukrů) -Tento proces umožní získání energie obsažené v těchto látkách.
- b) Metabolismus lipidů - Střevní mikroflóra zde hraje nepřímou roli, protože mění průběh zpětné absorpce cholesterolu a žlučových solí. Některé druhy bakterií jsou schopné rozložit žlučové soli a tím změnit průběh jejich vstřebávání.
- c) Metabolismus minerálních látek a vitaminů

(http://www.activia.cz/mono_2.htm)



Úloha lactobacilů při léčbě laktóзовé intolerance.

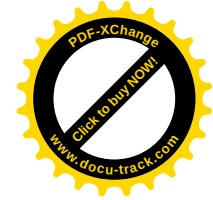
Studie z posledních 10-15 let ukázaly, že jogurt je přes svůj vysoký obsah laktózy osobami s laktózovou intolerancí dobře snášen. Tento pozitivní efekt je způsoben přítomností laktázy v bakteriích mléčného kvašení, které přežívají nízké pH žaludku a přispívají v tenkém střevě ke štěpení laktózy. Podmínkou je však neporušená buněčná membrána těchto bakterií. (Alm., L, 1982)

Osoby s intolerancí na laktózu mohou v důsledku snížené aktivity laktázy pouze částečně štěpit a vstřebávat laktózu z mléka a mléčných výrobků. Větší množství laktózy způsobuje u těchto osob klinické projevy intolerance jako bolesti v podbříšku, nadýmání, křeče, flatulenci a průjem rozdílné intenzity. Současně dochází ke zvýšené eliminaci vodíku dechem.

Pozitivní účinek jogurtů a jiných fermentovaných mléčných výrobků má několik příčin:

1. Při výrobě jogurtů a ostatních zakysaných mléčných výrobků se používá živých bakterií kultur (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*, *L. acidophilus* a *Bifidobacterium*), které obsahují b-galaktosidázu. Tento enzym překonává žaludeční pasáž a přispívá v tenkém střevě k hydrolýze laktózy. Nutným předpokladem je však intaktní obal buněk mikroorganismů; pokud je buněčná membrána porušena, dochází k inaktivaci enzymu žaludeční šťávou. Naopak je dostatečná permeabilita bakteriálních buněk v tenkém střevě, která se ještě zvyšuje působením žluči, důležitým faktorem pro štěpení laktózy.
2. Po požití jogurtu a ostatních zakysaných mléčných výrobků dochází k prodloužení tranzitní doby ve střevě. Z toho důvodu může i snížené množství laktázy ve střevě intolerantních osob spolu s laktázou jogurtových mikroorganismů déle na laktózu ve střevě působit.
3. V důsledku fermentace laktózy bakteriemi mléčného kvašení je její koncentrace v řadě zakvašených mléčných výrobků snížena.
4. Konečně se diskutuje, zda dlouhodobý konzum zakysaných mléčných výrobků ovlivňuje flóru tlustého střeva, snižuje tím symptomatiku laktóзовé intolerance a stimuluje aktivitu intestinální laktázy
5. U dětí s malabsorpcí, které mají po požití jogurtu méně potíží než po mléce, se odborníci domnívají, že jejich zbytková laktázová aktivita je vyšší než u dospělých.

(Stránský, 2004)



***Lactobacillus* jako součást vaginální mikroflóry.**

Ve zdravém vaginálním ekosystému převládají některé druhy rodu *Lactobacillus*, mající důležitý vliv na vaginální mikrobiologii. Některé druhy potlačují růst endogenní vaginální mikroflóry produkcí organických kyselin jako je kyselina mléčná, peroxidu vodíku a bakteriocinů či laktocinů. Produkce organických kyselin udržuje pH vaginálního prostředí < 4,5 a takto vytváří nepříznivé podmínky pro růst většiny endogenních patogenních bakterií. Laktobacily zvyšují oxido-redukční potenciál vaginálního prostředí, což inhibuje růst obligátních anaerobů.

Tyto kmeny laktobacilů byly zařazeny do druhů *L.casei* , *L.acidophilus* , *L.gasseri* , *L.paracasei* , *L.plantarum* , *L.jensenii* , *L.vaginalis* , *L.pentosus* , *L.bif fermentans* . (Aroutcheva A., et al., 2001)

***Lactobacillus* jako součást ústní mikroflóry.**

Lactobacillus acidophilus patří k ústohltanové mikroflóře zdravých lidí a působí protikataricky. (Doležálek, 1962)

Tvorba vitamínů.

Bakterie mléčného kysání produkují některé vitaminy, jako například vitamin K (jsou jeho hlavním zdrojem), vitamin B12, kyselina listová, biotin, riboflavin a kyselina pantotenová . Za určitých podmínek může být tato syntéza pro člověka podstatná (například u vitamínů B12 a K po resekci střeva apod.). (Štěpánková, M., Augustín, J., březen 2001)

Tvorba antibiotik.

Laktobacily dále pak produkují antibiotika (laktobacilin, laktolin) a látky antibiotické povahy (acidofilin). Účinně inhibuje růst koliformních bakterií a enterokoků, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* a *Enterobacter aerogenes*. (Grossmann, M., 1999)

1.2. ESCHERICHIA

1.2.1. Taxonomie

Bezpochyby nejprostudovanějším a nejprozkoumanějším mikrobiálním druhem je *Escherichia coli*. Jedná se o gram-negativní fakultativně anaerobní tyčinky, slouží jako modelový organismus pro biochemické, genetické i fyziologické studie. Je prvním bakteriálním druhem, u něhož byla pozorována a prostudována konjugace buněk a výměna genetického materiálu. *Escherichia* je běžnou střevní mikroflórou a v přírodě ji můžeme nalézt téměř všude. Je běžným obyvatelům střev většiny zvířat a lidí od jejich narození až po úmrtí. Je klasifikována jako indikátor fekálního znečištění. Ne všechny druhy a kmeny jsou patogenní, nicméně jejich přítomnost v potravinách je spojena se zdravotním rizikem. Jejich taxonomické zařazení je následující:

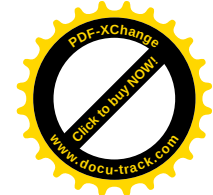
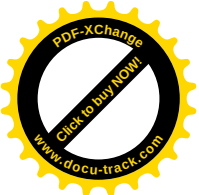
v řadě : *Enterococcaceae* - sekce Gram-negativní koky

K nejznámější *E.coli* byly přiřazeny nově popsány druhy *E.vulneris* a *E.hermanii*. Jedná se podmíněně patogenní mikroorganismy izolované často z klinických materiálů. Jejich diagnostika dosud není zcela běžná. Dnes je rod *Escherichia* tvořen pěti zástupci *E.coli*, *E.vulneris*, *E.hermanii*, *E. blattae* a *E. fergusonii*. Jejich rozlišení na základě biochemické aktivity udává tabulka I. (Bat, 1999)

Tabulka I Biochemické odlišnosti druhů rodu *Escherichia*

	E. coli		E. hermannii	E. blattae	E. fergusonii	E. vulneris
	Typical	Inactive				
KCN	–	–	+	–	–	+
Glukosa	+	–	+	+	+	
Laktosa	+	–	+/-	–	–	+
Cellobiosa	–	–	+	–	+	
Adonitol	–	–	–	–	–	+
Mannitol	+	+	+	–	+/-	+

Pozn.- + produkuje, - neprodukuje, +/- variabilní podle prostředí a podmínek



1.2.2. Vlastnosti

Escherichie jsou gram-negativní, fakultativně anaeorobní chemoorganotrofní mikroorganismy. Jedná se o pohyblivé, někdy opouzdřené tyčinky. Pohyb jim umožňují peritrichní bičíky, které se nacházejí kolem celé buňky. Kultivační nároky nemají vysoké, rostou dobře i na obyčejných půdách. Optimální teplota pro kultivaci je 37°C. Charakteristická je tvorba 2-3 mm velkých, mírně vypouklých, lesklých kolonií, na Endově půdě s kovově zlatým leskem. Na krevním agaru rostou některé kmeny s hemolýzou. Pro izolaci se s výhodou užívají laktózoové půdy- zejména Endova, Mc Conkeyho nebo deoxycholátová (DC agar).

Hlavní diagnostické znaky, které tento rod charakterizují, jsou tyto: kataláza pozitivní, oxidáza negativní, laktóza pozitivní mikroorganismus, tvoří indol, netvoří sirovodík a acetoin. Zkvašují sacharidy, zejména glukosu, laktosu, některé pentosy a alkoholické cukry, za intenzivní tvorby kyselin a plynu. Nejvíce fermentují sacharidy za vzniku kyseliny pyrohroznové, octové a mravenčí, přičemž část kyseliny mravenčí rozkládá na oxid uhličitý a vodík. (Holt, John G., 1993)

1.2.3. Výskyt v potravinách a patogenita

Rod *Escherichia* je z hygienického hlediska nejdůležitější. Nejvýznamnější *E.coli* se nachází ve spodní části střevního traktu člověka a teplokrevných zvířat, a vyskytuje se tedy i v jejich výkalech. Jeho přítomnost ve vodě nebo v potravinách je proto ukazatelem fekálního znečištění. Pravidelně se vyskytuje v potravinových surovinách, které byly nutně v kontaktu s hnojenou půdou. Přítomnost *E.coli* v potravinách ukazuje, že stejným způsobem se do tohoto prostředí mohou dostat i patogenní střevní bakterie rodu *Salmonella* nebo *Shigella*.

Jejich vyloučení z potravin či jejich omezení je možné správnou hygienickou praxí a tepelnou úpravou potravin. Pasterační, sterilační záhřev, zmrazování potravin působí devitalizace kmenů *E.coli* a snižují jejich počet v kontaminované potravine. U potravin s pH pod 5 se růst buněk omezuje až úplně zastavuje.

Pomocí serologických metod lze u *E.coli* odlišit více jak 170 O-antigenů, 80 K-antigenů a 56 bičíkových antigenů H. Serotypizace má svůj význam při odhalování možné patogenity izolovaných kmenů. Podrobnějším testováním se zjistilo, že jisté serotypy mají svůj charakter způsobu patogenního uplatnění. *E.coli* je komenzálem tlustého střeva člověka. Je součástí



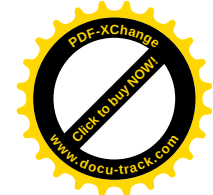
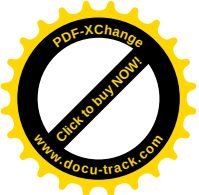
fyziologické flóry a podílí se na udržování eumikrobie střeva. *E.coli* se uplatňuje jako významný patogen:

1. Enteroinvazivní *E.coli* (EIEC) – vyvolávají dyzenterické průjmy starších dětí a dospělých. Průjmová onemocnění vyvolaná touto *E.coli* se velice podobají dyzentérii způsobené shigelami, jenže s mírnějším průběhem. Nepostihuje novorozence, ale pouze starší děti a dospělé.

Biochemická aktivita EIEC je nižší než u ostatních *E.coli*. Pro EIEC je typické, že jsou nepohyblivé a nejsou schopny dekarboxylace lysinu a pouze menší část štěpí laktosu. Jsou schopny penetrovat do epitelu buněk tlustého střeva, kde se množí. Důsledkem nitrobuněčného množení je destrukce epiteliálních buněk a zvrhovatění sliznice. Tyto vlastnosti lze prokázat inokulací kmene do spojivkového vaku morčete nebo králíka. Invazivní kmeny vyvolávají do 48 hodin keretokonjunktividu. Tato schopnost je pevně vázána na buňku. Antigenní struktura je podobná schigelám, se kterými mají společné antigeny. EIEC přísluší nejčastěji serotypům O 124 a O 28. Celkem je enteroinvazivních serotypů 14. Výskyt je častější na Slovensku než v České republice. Infekce se šíří podobně jako dyzenterie. Nejčastěji jsou *E.coli* přenášeny kontaminovanou vodou nebo potravinami, než kontaktem. Obraz onemocnění je shodný s dyzentérií – průjmy s tenesmy, ve stolici je hlen, případně charakteristický pro schigely a páchnoucí po spermatu.

2. Enteropaogenní *E.coli*. (EPEC) – EPEC vyvolávají těžké epidemické průjmy postihující novorozence a kojence často s nozokomiálním výskytem. Kmeny EPEC adherují na buňky střevní sliznice, rychle se množí a brzy se rozšíří do celého střeva. Dochází k histologickým změnám epitelu. Na rozdíl od EIEC nepenetrují do epiteliálních buněk a tyto nedestruují. Uvažuje se o možné produkci enterotoxinu nebo cytotoxinů. Existence těchto toxických produktů nebyla zatím potvrzena. Je pouze prokázáno, že enteropatogenita se váže k určitým serotypům, ale příslušnost k těmto serotypům není spolehlivým důkazem enteropatogenity. Nejrozšířenější serotypy jsou O 111 O 26 a O 55. Serotypizace je zatím jedinou metodou, která pomáhá EPEC identifikovat. Izolace významného serotypu nemusí být ještě potvrzením nálezu patogena a je pouze vyjádřením pravděpodobné patogenity zachyceného kmene.

3. Enterotoxické *E.coli* (ETEC) – Průjmová onemocnění vyvolaná ETEC postihují převážně země s teplejším podnebím, hlavně s nižší hygienickou úrovní, kde jsou jimi vyvolané průjmy

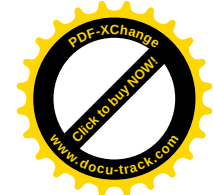
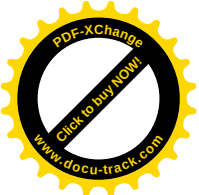


kojenců a dětí do pěti let častou příčinnou úmrtí. Cestovatelské horečky a průjmy jsou dalším projevem infekce ETEC. Postihnou velkou část osob přijíždějících do teplejších oblastí. Běžně se s nimi setkáváme i u Středozemního a Černého moře. Onemocnění je charakterizováno průjmem, někdy i teplotami a zvracením. Většinou probíhá bez komplikací a samo odezní. Cholera-like disease je choleriformní onemocnění způsobené ETEC v choleroých oblastech. ETEC jsou schopny tvorby termostabilního a termolabilního enterotoxinu. Termolabilní enterotoxin aktivuje střevní adenylcyclázu a zvýší tak hladinu cAMP. Následné změny v transportu Na a Cl iontů vyvolávají mohutný přestup vody do střeva a mechanismem účinku shodným s účinkem cholerového toxinu. Působení termolabilního toxinu nastupuje pomaleji, než u tepelně stabilního. Termostabilní toxin vyvolává zvýšení hladiny guanosin monofosfátu a tím rovněž přestupy vody do střevního lumen. Účinek nastupuje rychleji, ale také rychleji odezní. Silný přestup tekutiny do střeva je příčinou průjmu, který je hlavním příznakem onemocnění vyvolaných ETEC. Tvorba enterotoxinů je v bakteriální buňce kódována plasmidem. Konjunkcí se tento plasmid může přenést na netoxické kmeny. Možný je i přenos na enterobakterie jiných rodů. Aby se mohla ETEC uchytit na sliznici tenkého střeva a mohla uplatnit vliv toxinů, je pro ni nezbytná schopnost adherovat na slizniční buňky. Ta je umožněna fimbriemi s kolonizačním faktorem. Kolonizační faktory jsou proteiny, jejichž tvorba je kódována plasmidem. Kmen bez kolonizačního faktoru je nevirulentní, i když je schopen tvorby toxinů. Kultivací se od ostatních *E.coli* neliší. Základem diagnostiky jsou testy ukazující schopnost tvorby enterotoxinů. Příkladem může být test akumulace tekutiny v podvázané králíčí střevní kliče.

4. Enteroadhezivní *E.coli* (EAEC) – tu je možno identifikovat pouze podle schopnosti adheze na buňky tkáňové kultury označené HEp. 2. EAEC vyvolávají průjmy. Stolice je bez příměsí krve a neobsahuje leukocyty.

5. Enterohemoragické *E.coli* (EHEC) – vyvolávají hemarogickou kolitidu. Mimo zažívací trakt byly určeny jako původce hemolytického uremického syndromu. EHEC produkují toxiny.

6. *E.coli* způsobující infekce močových cest – enterobakterie jsou nejčastějšími původci močových infekcí. *E.coli* je vůbec nejčastěji izolovanou bakterií z močových cest. Kmeny izolované z urogenitálního traktu jsou často hemolytické.



7. *E.coli* způsobující pyogenní infekce – Při hodnocení frekvence výskytu bakterií v infikovaných ranách nalezneme *E.coli* na druhém místě hned za *S. aureus*. *E.coli* je též jedním u nejčastějších původců meningitid a sepsí i v dospělém věku. Časté jsou izolace ve sputu u infekcí dýchacích cest.

(Bednář, M., Fraňková, V., 1999)

1.3. LISTERIA

1.3.1. Taxonomie

Do skupiny pravidelných, nesporulujících gram-positivních mikroorganismů patří také rod *Listeria*. Jeho druhy můžeme nalézt běžně v přírodě na rostlinných materiálech nebo jako živočišnou mikroflóru. Jeho výskytu v potravinách se snažíme v max. míře předcházet.

Rod *Listeria* zahrnuje v současné době 6 různých druhů – *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* a *L. grayi*. Dříve do tohoto rodu patřil pouze jeden druh a to *L. monocytogenes*. Postupně byly objeveny další *L. denitrificans*, *L. grayi*, *L. murrayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* a nakonec *L. seeligeri*. Některé druhy pak byly překlasifikovány jinam. Dříve uváděný druh *L. murrayi* byl zahrnut do druhu *L. grayi*. *L. monocytogenes* je podmíněným patogenem lidí i zvířat, *L. ivanovii* vyvolává onemocnění u ovcí a jen výjimečně u lidí. Ostatní druhy jsou nepatogenní.

(Bat, 1999)

1.3.2. Vlastnosti

Listeria patří mezi gram-positivní mikroorganismy tyčinkovitého tvaru o velikosti buněk od 0,5 do 2 μm. Kromě tyčinek také někdy tvoří kokoidní krátké řetězce, zřídka vytváří dlouhá vlákna. Mladé kultury mívají spíše kokoidní buňky, naproti tomu starší jsou tyčinkovité, rovné nebo zahnuté. Při teplotě 20-25°C tvoří peritricha. Je to nesporulující fakultativně anaerobní bakterie a její pohyblivost závisí především na teplotě. Optimální teplota pro růst těchto bakterií je mezi 30-37°C, ale některé druhy, zejména nejznámější *L. monocytogenes*, se mohou rozmnožovat a růst i při teplotě 4°C. Protože jsou schopny se rozmnožovat i při tak nízkých teplotách, ikdyž velice pomalu, mohou při výskytu v potravinách představovat obrovské nebezpečí. Při teplotě 20-25°C tvoří bičíky, čímž se stávají pohyblivými a také



produkují antigeny a další virulentní metabolity. Při teplotě 37°C tyto bičíky ani antigeny netvoří.

Listeria se řadí mezi fakultativně anaerobní mikroorganismy a kultivuje se na řadě specifických mediích. Kultivace listerií není nikterak náročná. Rostou dobře za aerobních i mikroaerofilních podmínek i na obyčejných agarech. Kolonie mají barvu šedobílou až bílou, při šikmém osvětlení mají charakteristický modrozelený lesk. Na krevním agaru tvoří neprůhledné kolonie s úzkou vrstvou beta-hemolýzy. Odhalit a izolovat listerie bylo velice těžké a proto od jejich odhalení roku se začalo vyvíjet mnoho úsilí pro možnosti jejich izolace. Poprvé byly listerie izolovány v roce 1917 z tkáňového moku (Akinson), ale objeveny byly až v roce 1925 (Murray, Webb). Dnes existují mnohé způsoby pro jejich odhalování z různých druhů potravin. Mnoho komerčních dodavatelů dnes prodávají rychlé metody pro detekci rodu *Listeria* a hlavně pro *Listeria monocytogenes*. Většinou jsou nastaveny i pro detekci jiných mikroorganismů a jejich toxinů, ale obsahují komponenty specifické pro kultivaci listerií.

Rod *Listeria* je charakteristický produkcí enzymu kataláza, tvorbou kyselin rozkladem glukózy, threalosy, sacharosy, laktosy či maltosy a slabou produkcí sirovodíku. Dokáže zužitkovat také soli kyseliny citrónové. Odolnost těchto mikroorganismů je dána mnohými faktory. Jsou schopny se množit i bez přítomnosti kyslíku, mohou přežít pasteraci mléka i nízké teploty kolem 4°C a dobře snášejí i vysoké koncentrace solí v prostředí. Při koncentraci 20% NaCl přežijí až 8 týdnů.

(Bat, 1999)

1.3.3. Význam v potravinách a patogenita

Listerie se běžně vyskytují u většiny domácích zvířat, v půdě na rostlinách i ve stolici člověka. Jejich přítomnost v potravinách je velice závažným problémem. Zvláště *Listeria monocytogenes* patří k nejobávanějším patogenům v potravinářském průmyslu. Kontaminace potravin *L.monocytogenes* může totiž vést k vážným onemocněním. Ke kontaminaci může dojít primárně i sekundárně. Kontaminace při zpracování potravin může následovat až do výsledných produktů i u podniků s výborným hygienickým projektem. Naprostým základem pro hygienickou praxi je udržovat výrobní plochy čisté a suché. Listerie se objevuje v mnoha potravinách, proto veškeré potravinářské závody musí důsledné ve své hygienické praxi. Problém kontaminace listeriami ale i dalšími patogeny může částečně řešit systém HACCP a správný výrobní program. Standardní oddělení surovin a surových potravin od zpracovaných



výrobků, suché prostředí, efektivní úklid a sanitace podniku tyto aspekty mohou vést k redukci výskytu listerií v potravinách.

Kontaminovanými potravinami bývají nejčastěji nepasterizované mléko a mléčné výrobky (olomoucké tvarůžky, brynza), maso a výrobky z něj (čajovka), zelenina a ryby. V roce 1988 se velký výskyt listeriosy objevil ze špatně tepelně opracovaných hotdogů.

Listeriosa jako nemoc byla popsána v roce 1939 (Swann, Nyfeldt) a se u člověka projevuje běžně třemi klinickými formami: zánětem mozku, infekcí krve a potratem. Symptomy mohou být odstupňovány od chřipky až k více závažným projevům. U člověka se jeví patogenní pouze *L.monocytogenes*, ale ostatní druhy jako *L.ivanovii* způsobuje potrat u ovcí nebo zpomalený růst u jehňat. Úmrtnost na listeriosu je mnohem vyšší než u jiných bakteriálních onemocnění. Odhad činí asi 20%, ale toto číslo se může měnit, protože ne všechny projevy chřipky jsou identifikovány správně. Citlivá populace – mladí lidé, starci, lidé se sníženou obranyschopností a HIV pozitivní lidé by měli být zvláště obezřetní a vyhýbat se potravinám s možným výskytem listerií. Příčinou listeriových onemocnění je cytotoxický listerolysin. Nejběžnějším serotypem spojeným s chorobami z potravin je typ 4B, 1/2a a 1/2b.

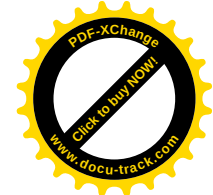
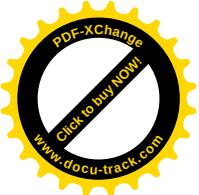
(Bat, 1999)

1.4. STAPHYLOCOCCUS

Rod *Staphylococcus* se řadí mezi grampozitivní mikroorganismy. Jako grampozitivní se označují ty mikroorganismy, jejichž buňky po usmrcení a obarvení Gramovým barvivem a moření jodovým roztokem toto barvivo působením rozpouštědel neztrácejí. Jako rozpouštědlo se nejčastěji používá acetonu nebo ethanolu. Tato schopnost je závislá na složení buněčné stěny bakterií. Hlavní složkou buněčné stěny grampozitivních bakterií a tedy i rodu *Staphylococcus* je kyselina teichoová. Ta je vázána kovalentní vazbou na muramovou kyselinu. Stěny gramnegativních bakterií kyselinu teichoovou neobsahují, což je příčinou vyplavování Gramova barviva z buňky působením rozpouštědla.

1.4.1. Taxonomie

Mikroorganismus rodu *Staphylococcus* patří podle *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* mezi gram-positivní koky. Jedná se o fakultativně anaerobní a



chemoorganotrofní organismus, který společně s dalšími druhy *Micrococcus*, *Stomatococcus* a *Planococcus* patří do čeledi *Micrococcaceae*. Jeho klasifikace je následující:

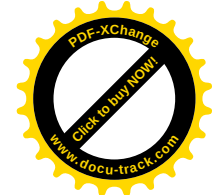
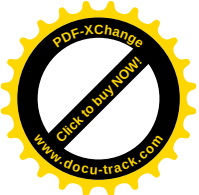
- v řád: Procaryotae
- v Oddělení: Firmicutes
- v Třída: Firmibacteria
- v Čeleď: Micrococcaceae
- v Rod: Staphylococcus.

V současné době je známo 47 druhů rodu *Staphylococcus*. Jejich výčet je uveden v příloze č.I. Oficiálně dnes existuje 36 druhů, 9 z nich má dva poddruhy, jeden má tři poddruhy.

Jméno *staphylococcus* je odvozeno z řeckého slova *staphylo* (hrozen vína) a *coccus* (obilí, bobule). Jako první objevil koky německý vědec von Recklinghausen v roce 1871 v ledvinách pacienta, který zemřel na otravu krve. Sir Alexander Ogston a Luis Pasteur shodně v roce 1880 poukázaly na jisté koky, které tvoří hnis. Ogston pozoroval dva druhy koků, z nichž jeden tvořil řetězce, které nazval streptokoky a druhý, který tvořil shuky buněk a ty nazval stafylokoky. Ogston je proto spojen s objevením stafylokoků a jejich pojmenováním. První druh *Staphylococcus aureus* identifikoval německý bakteriolog F. Rosenbach v roce 1884. Během let získal také řadu synonym než se zjistilo, že se jedná o stejnou bakterii. Správně se dnes taxonomicky jmenuje tento stafylokok *Staphylococcus aureus subsp. aureus* a ze všech druhů patří mezi nejdůležitější. (Petráš, P., 2004)

1.4.2. Vlastnosti

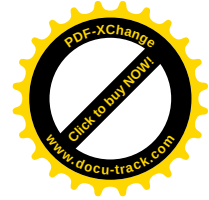
Jedná se o kulovité gram-positivní koky o velikosti buněk průměrně 0,5-1,5 μm , které se mohou vyskytovat v párech, samostatně, v krátkých řetězcích nebo nepravidelných shlucích až hrozníčcích. Jejich formace se utváří během růstu na pevných médiích a je dána počtem dělení buněk a schopností oddělení mateřské a dceřiné buňky. Jsou to nepohyblivé a nesporulující bakterie. Spory netvoří nikdy a obvykle netvoří ani pouzdra. Jejich barevná pigmentace se na neselektivním mediu může měnit od sněhově bílé až po žlutou až jasnou oranžovou. Kolonie jsou lesklé, vypouklé a mazlavé. Mají poměrně nízké nároky na kultivační prostředí. Rostou za širokého tepelného rozpětí 10 až 45°C, ikdyž optimální teplota se pohybuje mezi 30-37°C. Rozmnožovat se může i při obsahu 10%hm.NaCl v prostředí. Všechny druhy rodu *Staphylococcus* patří mezi aerobní nebo fakultativně



anaerobní mikroorganismy s fermentačními schopnostmi. Ze 47 dnes známých druhů jsou pouze dva anaerobní. Od ostatních mikroorganismů se liší hlavně schopností aerobního i anaerobního metabolismu. energii získávají rozkladem glukosy, karboxylových kyselin a fosfátů a mohou využívat jako substrát nejrozličnější množství sacharidů. K energii získané při metabolických procesech patří především ATP, který vzniká přímo při oxidaci uhlíkatých substrátů, a energie získaná při fosforylaci kofaktorů v dýchacím řetězci. V něm jsou oxidovány redukované kofaktory NADH, FMNH₂ a FADH₂. Dýchací řetězec i systém oxidační fosforylace je umístěn v cytoplazmatické membráně. V prvním stupni dýchacího řetězce se přenáší vodík, který se ukládá v koenzymu Q ve formě protonů. Při přechodu vodíku z molekuly NADH + H⁺ až k CoQ se uvolní tolik energie, že oxidační fosforylací ADP vzniká 1 molekula ATP.

Jednotlivé druhy stafylokoků se mohou klasifikovat také podle patogenity, produkce jejich fermentů a produkce enzymu koagulázy. Ten existuje buď volný nebo vázaný v buňkách. Každý má trochu jinou aktivitu a imunologické vlastnosti. Volná koaguláza je protein a v přírodě se vyskytuje ve dvou antigenových typech. Koaguláza - pozitivní stafylokoky mají schopnost tvořit z krevní plasmy sraženinu. Tento enzym produkuje většina nejvirulentnějších kmenů a je spojován se stafylokokovou patogenitou. V krevní plazmě se v rozpustné formě vyskytuje protein fibrinogen, který má schopnost působením příslušných látek se měnit v nerozpustný fibrin. Stafylokoková koaguláza má schopnost přeměnit fibrinogen ve fibrin. Nicméně koaguláza – negativní druhy mohou být také patogenní a proto přímá souvislost mezi tvorbou enzymu a patogenitou není až tak zřejmá. Přesto užití tohoto enzymu pro identifikaci stafylokoků je velmi rozšířený postup, protože je velice jednoduchý a poměrně spolehlivý. Buňky podezřelého mikroorganismu se smíchají s lidskou nebo králičí krevní plasmou s přidavkem kyseliny citronové, šťavelové kyseliny nebo kyseliny ethylendiamintetraoctové. Vzorek se nechá inkubovat při 37°C po dobu 1 až 3 hodiny. Pokud vznikne sraženina, pak se test hodnotí jako pozitivní. Pomocí aglutinace a precipitace se dají rozdělit do několika skupin podle různých kombinací antigenů. Stafylokoky obsahují 15 typově odlišných antigenů, tato metodika však není příliš rozšířená a lze ji provádět jen ve specializovaných laboratořích. Další možností rozlišení a daleko užívanější je fagotypizace, kdy pomocí specifických stafylokokových bakteriofágů rozlišujeme 5 skupin a v každé skupině několik dalších fágových typů.

(Martin, 1999)



1.4.3. Výskyt v potravinách a patogenita

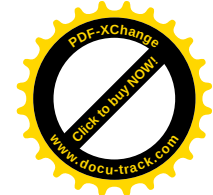
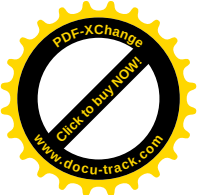
Mnoho potravin jako čerstvé a zpracované maso, mléčné produkty, některé mořské produkty a drůbež bývají často kontaminovány druhy rodu *Staphylococcus*. Stafylokoky jsou přirozenou mikroflórou člověka i některých živočichů. V potravinách je však jejich výskyt nežádoucí, jsou označovány za kontaminující mikroflóru. Při požití takových potravin pak může dojít k infekci člověka zažívacím traktem a vážným zdravotním problémům souvisejících s přirozenou patogenitou tohoto rodu. Stafylokoky jsou kromě člověka přirozeně patogenní také pro koně, krávy, ovce, ptáky a mouchy. Velmi často se vykytují na sliznici horních cest dýchacích a na kůži hostitele. Patogenita stafylokoků je dána produkcí fermentů a toxinů. Pokud potravina obsahuje vhodný substrát pro metabolismus těchto látek, pak může způsobit velice vážná onemocnění až smrtelné otravy. Jedná se totiž o látky bílkovinné povahy, které se ničí až dlouhodobým tepelným záhřevem, a proto je i největší nebezpečí otrav u tepelně neopracovaných výrobků.

Stafylokoky patří mezi mikroorganismy mající pro člověka i zvířata velký význam. Nepatogenní kmeny patří k normální mikroflóře kůže a sliznic člověka i zvířat. Patogenní kmeny vyvolávají u člověka nejrůznější hnisavá onemocnění, smrtelné sepse a často jsou příčinou potravinových intoxikací. *S. epidermis* může způsobovat záněty močového měchýře a infekce genitálního ústrojí. *S. saprophyticus* způsobuje infekce močového měchýře u mladých dívek. *S. chromogenes* je často izolován v mléce při zánětech mléčné žlázy.

(Martin, 1999)

1.4.4. *Staphylococcus aureus*

Mezi nejrozšířenější druhy rodu *Staphylococcus* patří *Staphylococcus aureus*. Přestože je schopný přežívat v anaerobním prostředí, patří mezi aerobní mikroorganismy. Pro svůj aerobní růst potřebuje zejména sacharidy, aminokyseliny a vitamíny, pro anaerobní růst pak ještě uracil a oxid uhličitý. Optimální teplota pro růst je 35-37°C, ale je schopný se množit při teplotách od 10°C do 45°C. Rozpětí pH pro růst a rozmnožování je mezi 4,5-9,3, optimální pH je mezi 7,0-7,5. Rozpětí pH se mění hlavně na růstových podmínkách prostředí. Ze sacharidů fermentuje především glukosu, sacharosu, maltosu, mannosu, laktosu, galaktosu, fruktosu a ribosu. Při fermentaci vytváří kyselinu L(+) i D(-) mléčnou. Jde o koaguláza-positivní stafylokok. Jeho schopnost tvořit tento enzym byla objevena již počátkem dvacátého století. Velikost kolonií se pohybuje od 0,5-1,5 μm, tvoří převážně nepravidelné shluky buněk



nebo osamocené či buňky v párech. Barva kolonií může být od krémově bílé až po žlutou až oranžovou, případně do zlaté barvy. Proto si také vysloužil přezdívku zlatý stafylokok. Kultivace tohoto mikroorganismu probíhá nejčastěji na mediích s přidavkem 10% NaCl.

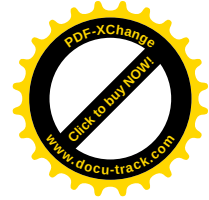
Je to velmi virulentní druh a běžně se vyskytuje na lidském těle. Můžeme jej odhalit v nose, dutině ústní, dýchacích cestách i v zažívacím traktu, kde tvoří běžnou součást mikroflóry člověka. Isolovat jej můžeme také z potravin či zvířat. Jedná se o podmíněně patogenní mikroorganismus, který produkcí toxinů bílkovinné povahy ve formě superantigenů může způsobit vážná zdravotní onemocnění. Ty se inaktivují až dlouhodobým varem. Je velice častým kontaminantem mléka i mléčných výrobků. Do mléka se může dostat hned při dojení z mléčné žlázy dojnice nebo sekundárně z rukou, tváře, dutiny ústní či nosní zaměstnanců přicházejících s mlékem do styku v různých fázích výroby. I do hotových potravin se může dostat kýcháním či kašláním. Mezi nejběžnější projevy stafylokokové otravy patří tvorba hnisu, slizu, trudovitost, mastitis, pneumonie, osteomyelitis, střevní enterotoxikosa. Toxiny a fermenty jsou produkovány všemi kmeny v různých kombinacích a množství. Mezi produkty stafylokokové fermentace patří:

Hemolysiny – nejdůležitější jsou alfa, beta a delta – lysiny. Alfa- a beta-hemolysin produkují především kmeny patogenní pro člověka, způsobují hemolýsu erytrocytů. Beta-lysin je typický pro kmeny patogenní pro zvířata, kde štěpí sfingomyelin v membráně erytrocytů.

Alfa-toxin – je identický s alfa-ghemolysinem, je to toxický produkt všech kmenů a má trojí účinek. In vitro lysuje erytrocyty a in vivo působí dermonekroticky a má letální účinek. Jedná se o bílkovinu narušující buněčné membrány. Lze jej přeměnit na anatoxin, který slouží k desenzibilaci chronických stafylokokových infekcí. Podobně jako alfa-toxin působí také beta a delta-toxin.

Enterotoxin - je produkován pouze některými kmeny *Staphylococcus aureus*. Vyvolává prudké střevní onemocnění. Je produkován zejména v potravinách obsahujících škrob. Je poměrně termostabilní. Enterotoxiny (SAEs) mají vlastnosti superantigenů, protože aktivují imunitní odpověď vazbou na TCR Vβ a vazba k molekulám MHC II tř. probíhá bez předkládání antigenu. Rozpoznávání T receptoru není MHC omezeno, protože superantigeny nejsou prezentovány v MHC peptid-antigen vazebné drážce. Superantigeny vyvolávají silnou primární T buněčnou odpověď, aktivují až 25 – 30 % cirkulujících T lymfocytů, na rozdíl od konvenčních peptidových antigenů, které mohou stimulovat pouze 0,1 – 0,0001 % T buněk.

Fibrinolysin – způsobuje srážení krve rozpouštěním fibrinu.



hyaluronidáza - enzym rozpouštějící kys. hyaluronovou, která je součástí mezibuněčného tmelu, usnadňuje pronikání infekce mezibuněčnými prostory.

Plasmakoaguláza – vyvolává srážení citrátové plasmy. Tato vlastnost je považována za zvláště směrodatného ukazatele patogenity. Sráží fibrinogen na fibrin, který kolem mikrobů tvoří ochranný obal a chrání je tak před fagocytosou a zvyšuje tak jejich patogenní účinek. (Bednář, M., Fraňková, V., 1999)

1.5. ENTEROCOCCUS

1.5.1. Taxonomie

Rod *Enterococcus* je současné označení pro dříve označované streptokoky skupiny D. Jako enterokoky označujeme skupinu streptokoků, které se od výše popsanych liší nápadnou odolností vůči vnějším podmínkám, čehož se využívá v diagnostice těchto mikroorganismů. Bakterie rodu *Enterococcus* jsou přirozenou mikroflórou trávicího traktu člověka i zvířat, často je také najdeme na zelenině, rostlinách a potravinách převážně živočišného původu. Jejich přirozené prostředí a jejich výskyt souvisí s hodnocením zdravotní nezávadnosti potravin a veřejného zdraví, byly navrženy jako indikátor fekálního znečištění. Hrají významnou roli i jako původci nozokomiálních infekcí močového a respiračního traktu, chirurgických ran a méně často infekcí krevního řečiště, zejména u pacientů dlouhodobě hospitalizovaných, s těžkým základním onemocněním a po předchozí terapii širokospektrými antibiotiky.

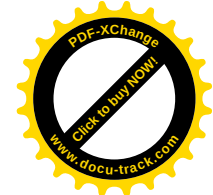
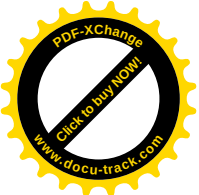
Jedná se o grampozitivní koky s následným taxonomickým zařazením:

v Oddělení Bacteria

v Třída : Firmicutes

v čeleď : Enterococcaceae - sekce Grampozitivní koky

(Holt, John G., 1993)

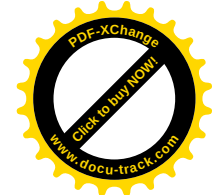
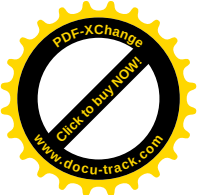


Bakterie rodu *enterococcus* byly poprvé popsány a identifikovány v roce 1899, kdy je Thiercelin izoloval ze střevní mikroflóry a nazval je „enterocogue“. Taxonomie tohoto rodu však byla vždy nejasná a vývoj genotypových metod a rozsáhlé studium mikrobiálních vztahů měl za následek značné změny v taxonomii. Rod *Streptococcus* byl během osmdesátých let minulého století rozdělen do tří druhů *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Streptococcus*. Následně pak byly *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus avium* a *Streptococcus gallinarum* přiřazeny k rodu *Enterococcus* a přejmenovány jako *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus avium* a *Enterococcus gallinarum*. Ve stejné době ostatní streptokokové druhy byly označeny jako úplně nové rody. Čas od času byly objeveny nové a některé byly přeřazeny do jiných rodů. Na základě srovnávací analýzy porovnávající 16S rRNA bylo v rámci rodu vytvořeno několik skupin. První skupinu nazvanou *faecium* tvoří *E. durans*, *E. faecium*, *E. hirae* a *E. mundtii*. Druhá *avium* skupina obsahuje *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus* a *E. pseudoavium*. *gallinarum* skupina obsahuje druhy *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* a *E. flavescens*. Některé další vystupují samostatně, neboť nebyly nikterak spojeny s předchozími skupinami. Příkladem je *E. faecalis*, *E. sulfureus*, *E. saccharolyticus* a *E. dispar*. Současní zástupci tohoto rodu jsou uvedeni v tabulce č.II.

(Bat,1999)

Tabulka č.II- Stav rodu *enterococcus* v roce 1997

Druh	Původ	Základní prostředí, ze kterého byly izolovány
<i>E. faecalis</i>		Střevní trakt člověka a zvířat
<i>E. faecium</i>		Střevní trakt člověka a zvířat včetně drůbeže
<i>E. avium</i>	Přeřazen	Střevní trakt savců a vzácně i drůbeže
<i>E. casseliflavusc</i>	Přeřazen	Tráva, rostliny, siláže, půda
<i>E. cecorume</i>	Přeřazen	Zvířata
<i>E. columbae</i>	Nový	Střevní trakt tučňáka
<i>E. dispar</i>	Nový	Člověk
<i>E. durans</i>	Přeřazen	Člověk
<i>E. fallox</i>	Nový	
<i>E. flavescensc</i>	Nový	Klinický materiál
<i>E. gallinarumd</i>	Přeřazen	Střevní trakt drůbeže
<i>E. hirae</i>	Nový	Střevní trakt zvířat
<i>E. mundtiic</i>	Nový	Tráva, rostliny, siláže, půda
<i>E. malodoratus</i>	Přeřazen	Sýr gouda
<i>E. pseudoavium</i>	Nový	Vemeno skotu
<i>E. raffinosus</i>	Nový	Srdeční nitroblána
<i>E. saccharolyticus</i>	Přeřazen	Stelivo a pokožka koček
<i>E. seriolicidaf</i>	Nový	
<i>E. solitariusg</i>	Nový	
<i>E. sulfureus</i>	Nový	Rostlinný materiál



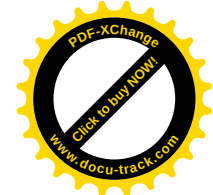
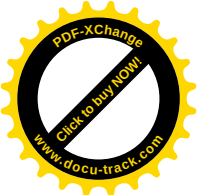
1.5.2. Vlastnosti

Se změnami taxonomie nových druhů do rodu *Enterococcus* nelze zcela přesně charakterizovat fyziologické a fenotypové vlastnosti tohoto rodu, protože jejich rozlišení proti ostatním gram pozitivním a kataláza-negativním kokům není tak snadné a rozmezí životních podmínek velmi široké. Podle Shermanova identifikačního schématu z roku 1937 enterokoky rostou při teplotě 10 až 45°C v přítomnosti 6,5% NaCl a při pH 9,6, přežívají při teplotním záhřevu 60°C po dobu 30min. Tyto identifikační znaky částečně převzal v roce 1984 Schleifer a Killper-Balz. Tyto kritéria však nesplňují všichni zástupci tohoto rodu. Např. *E. dispar* a *E. sulfureus* nerostou při 45°C, *E. cecorum* a *E. columbae* nerostou při teplotě 10°C ani při obsahu 6,5% NaCl v prostředí. Proto jako primární se pro identifikaci rodu jeví produkce pyroglutamylamino-peptidasy a aesculin hydrolázy. Další identifikační testy mohou velice přispět k jednoznačnějšímu odhalení, nicméně žádný z nich či jejich kombinace nemohou vytvořit komplexní jednotný systém detekce rodu *Enterococcus*. Základní charakteristika těchto mikroorganismů je tedy následující: gram pozitivní, katalasa-negativní koky, schopné růst při obsahu NaCl v mediu 6,5% nebo 0,04% azidu sodného, a schopné hydrolysy aesculinu v přítomnosti žluči.

Podmínky pro kultivaci musí odpovídat nárokům pro tento mikroorganismus. Selektivní media by obsahovat azid sodný, kanamycin nebo gentamycin, uhličitán sodný nebo citrát sodný, žlučové soli, krystalickou violet. pH by mělo být v rozmezí 6,0 – 6,2, inkubační teplota 42-45°C, nesmí však přesáhnout 45°C. Optimální teplota pro inkubaci je 37°C. Inkubační doba by neměla příliš přesahovat 24 hodin, protože na selektivních mediích mohou růst i ostatní mikroorganismy. Stupeň selektivity se odvíjí od většího či menšího množství selektivních prvků. Selektivní media umožňují růst dalších odlišných gram pozitivních koků a bakterií. Jejich růst je pomalý a kolonie malé.

Kolonie enterokoků jsou na krevním agaru vodnaté, šedozelené a vypouklé o velikosti 1-3mm, nejčastěji s alfa-hemolýzou. Na Slanetz and Bartley agaru tvoří drobné kulaté tmavě červené až fialově zbarvené kolonie o velikosti 0,6 až 2,5 µm. Tvarem a uspořádáním jsou nespořadující kokovité nebo oválné buňky v párech nebo v krátkých řetízích. Pro rozlišení jednotlivých druhů slouží především rozdíly v biochemické aktivitě jednotlivých druhů. Rozlišení některých zástupců rodu uvádí tabulka v příloze č. II.

(Bat, 1999)



1.5.3. Výskyt v potravinách a patogenita

Enterokoky mají velký význam v trávicím traktu lidí a zvířat. Např. *E. faecum* je široce rozšířen v střevech člověka i zvířat, *E. faecalis* je převážně zastoupen u lidského traktu. Oba jsou velice rozšířeny v prostředí a často se vyskytují na rostlinných materiálech. V zelenině se převážně vyskytují *E. mundtii* a *casseliflavus* a často i *E. faecalis* a *E. faecum*. Enterokoky můžeme nalézt v nejrůznějších potravinách, obzvláště v živočišných produktech. Ve vodě a v potravinách je jejich výskyt hodnocen jako důsledek špatné hygieny. Pro toto hodnocení je však důležité znát jejich ekologii. Jejich výskyt je limitován enviromentálními podmínkami jako jsou extrémní pH, teplota či obsah soli. Z toho plyne, že normálním podmínkám v potravinách mohou odolávat a přestože jsou v některých novodobých literaturách označovány za probiotickou kulturu, v případě nechtěné kontaminace mohou představovat biotechnologická i zdravotní rizika. Kromě typického výskytu v mléčných produktech, obzvláště v sušeném mléce nebo zakysaných produktech, a vodě závisí jejich výskyt na druhu přirozeného prostředí a technologii výroby. Hojně jsou enterokokové druhy využity při výrobě sýrů.

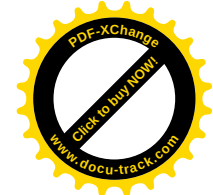
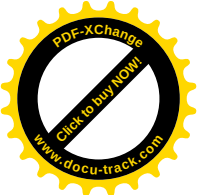
Ačkoliv jsou schopny odolávat vysokým teplotám, jejich výskyt v tepelně upravených potravinách je spíše důkazem rekontaminace. Díky schopnosti odolávat i nízkým hodnotám pH je můžeme nalézt v zakysaných mléčných produktech, také jako zakysávací kulturu.

Většina enterokokových infekcí z vody nebo potravin je způsobena druhem *Enterococcus faecalis*, případně *Enterococcus faecium*. Mohou způsobovat infekce močových cest, respirační choroby, infekce kůže nebo záněty srdeční nitroblány. Naproti tomu mají schopnost tvořit antibiotika a bakteriocíny, čehož lze v potravinářském průmyslu. Jejich metabolické produkty zabraňují růstu *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*.

(Bat, 1999)

1.5.4. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis se řadí mezi grampozitivní, chemoorganotrofní, fakultativně anaerobní mikroorganismy patřící do rodu *Enterococcus*. Ze všech jeho zástupců je rozšíření tohoto druhu největší a řadí se mezi nejdůležitější druhy tohoto rodu. Největší význam má



v intestinálním traktu člověka a zvířat, ve vodě a v potravinách působí jako indikátor fekálního znečištění, ale můžeme jej izolovat také z rostlinného materiálu, který nepřišel s fekáliemi do styku, takže je méně specifický než *Escherichia coli*.

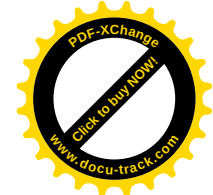
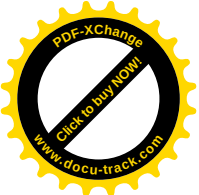
Enterococcus faecalis je nepohyblivý kok o velikosti kolonií 0,6-2,5 μm . Červené zbarvení je výsledkem redukce triphenyl tetrazolium chloridu, na krevním agaru také s β -hemolysou. Optimální teplota pro růst a kultivaci je 37°C. Roste při 6,5 % hm. NaCl, při pH 9,6, při 10°C i 45°C, při 40 % hm. žluči, v přítomnosti 0,04 % hm. telluritu. Roste v přítomnosti 0,01 % hm. triphenyl tetrazolium chloridu. Pro svůj růst a rozmnožování potřebuje převážně vitamíny a to biotin, nikotinovou a pantotenovou kyselinu, riboflavin, pyridoxin. (Bat,1999)

Hlavní diagnostické znaky jsou, že je katalasanegativní, sacharidy štěpí na L(+) kyselinu mléčnou, zkvašuje sorbitol, nezskvašuje L-arabinoxosu, zřídka redukuje nitráty, z argininu tvoří amoniak a v přítomnosti heminu produkuje cytochrom a je stimulována oxidační disimilace. (Holt, John G., 1993)

V potravinách se využívá jako doplňková kultura při zrání sýrů čedarového typu a při výrobě fermentovaných mléčných výrobků typu Biokult a Maconi. Jinak je jeho výskyt hodnocen jako indikátor fekálního znečištění a špatné sanitace sušených a mražených výrobků. Je také označován za významného patogena, který původcem vážných onemocnění jako endokarditida (zánět srdeční nitroblány), infekce močového měchýře, respirační choroby. Uplatňuje se jako původce cystitid, vaginitid apod. (Bednář, M., Fraňková, V.,1999)

2. STANOVENÍ CÍLŮ A METOD

Celá experimentální část práce se skládá ze dvou částí vypracovaných odlišnou metodikou a za použití jiného experimentálního materiálu. V první části je řešena problematika přežívání čistých mlékařských kultur, speciálně rodu *Lactobacillus*, ve vybraných zakysaných mléčných produktech v závislosti na době a teplotě skladování. Cílem je dokázat trvanlivost produktu a přítomnost deklarovaných bakterií, bez ztráty na kvalitě produktu. Výsledky pak slouží pro hodnocení schopnosti fermentovaných mléčných výrobků zajistit jejich údržnost prostřednictvím konkurenční mikroflóry.



Druhá experimentální část řeší problematiku přežívání relativně patogenních bakterií, které by se mohly, ať již v průběhu technologické přípravy produktu nebo úmyslným infikováním, dostat do potravin. Cílem je hodnotit jejich růstové a rozmnožovací tendence v porovnání s přirozenou mléčnou kulturou, jejich konkurenční podmínky během skladování produktu. Zároveň mají výsledky poukázat, zda využití těchto produktů pro záměrnou kontaminaci při případném bioterorismu může představovat hrozbu a její rozsah pro obyvatelstvo.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. PŘEŽÍVÁNÍ RODU LACTOBACILLUS

3.1.1. MATERIÁL

Vybrané produkty pro pokusy.

Výběr materiálu byl proveden tak, aby byl zajištěn široký výběr vzorků a různých výrobců. Po provedení pokusů byly vybrány následující mléčné produkty:

Jogurt Revital active bílý.

Jogurtový krém s probiotickou kulturou, vlákninou a sníženým obsahem tuku. Výrobce Olma a.s., Olomouc

- datum výroby a spotřeby: 6.1. 2003, spotřebovat do 6.2.2003

- složení: mléko, sušené odstředěné mléko, stabilizátor tapiokový škrob, rozpustná vláknina, jogurtová a probiotická kultura *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus rhamnosus*, obsah tuku max. 3%.

Průměrné nutriční hodnoty na 100g :energetické hodnoty 290 kJ, bílkoviny 4,4g, sacharidy 6,8g, tuk 2,7, rozpustná vláknina 0,5g.

0,1% lehký jogurt Borůvka.

Odtučněný jogurt bez přídavku cukru s probiotickou kulturou.

Výrobce mlékárna Kunín

- datum výroby a spotřeby: 6.1.2003, spotřebovat do 31.1.2003



- složení: odstředěné mléko, borůvková složka (borůvky, asparatam, aroma), sušené odstředěné mléko, želatina, živá jogurtová kultura, max. obsah tuku 2%, obsahuje fenylalanin.

Průměrné nutriční hodnoty na 100g: energie 170 kJ, bílkoviny 4,3g, sacharidy 5,1g, tuky 0,1g

Activia s vlákninou.

Kysaný mléčný výrobek s vlákninou.

Výrobce Danone Benešov.

- datum výroby a spotřeby: 15.12.2002, spotřebovat do 14.1.2003

- složení: mléko, ochucující složka (cukr, med, oligofruktóza, rozinky, jablko, pšeničné a ječné vločky, lískové a vlašské ořechy, mandle, přír. ident. aroma. látka), jogurtová a bifidogenní kultura *Bifidus essensis*.

Nutriční hodnoty ve 100g: energie 446 kJ, bílkoviny 3,5g, sacharidy 16,2. tuk 3,0g, vláknina 0,9g, vápník 125mg.

Lehký košík s aktivním bifidem.

Nízkotučný jogurt s kousky banánů.

Výrobce Yoplait Galas Slušovice

- datum výroby a spotřeby: 7.1.2003, spotřebovat do 4.2.2003

- složení: odtučněné mléko, ovocná složka (banány, cereálie, rozinky, oříšky), náhradní sladidla – asparatam, acetosulfan, barvivo E100, přírodní aromata, želatina, jogurtová a bifidogenní kultura

Nutriční hodnota ve 100g: energie 232 kJ, bílkoviny 4,2g, sacharidy 8,6g, tuk 0,4g, sušina 12%.

Diavita.

Jihočeský jogurt jahodový se sníženým obsahem tuku a bez přídavku cukru.

Výrobce Madeta České Budějovice

- datum spotřeby: 21.1.2003



-složení: mléko, 15% jahodové složky (jahody, fruktóza, jahodové aroma, náhradní sladidlo E 951 a E 950), sušené mléko, jogurtová kultura s bifidogenními organismy, sušina min. 14%, obsahuje fenylalanin.

Nutriční hodnoty ve 100g: energie 281 kJ, bílkoviny 4,0g, sacharidy 7,3g, tuk 2,4g.

Jogurt bílý selský.

Jogurt bílý s probiotickou kulturou bifi

Výrobce Hollandia Karlovy Vary.

-datum výroby a spotřeby: 29.12.2002, spotřebovat do 21.1.2003

Složení: mléko, mléčná bílkovina, jogurtová kultura s přídavkem probiotické kultury *Bifidobacterium* a *Lactobacillus acidophilus*

Nutriční hodnoty ve 100g: energie 280 kJ, bílkoviny 3,4g, sacharidy 3,5g, tuk 4,0g, vápník 125mg

3.1.2. PODMÍNKY PŘEŽÍVÁNÍ (SKLADOVÁNÍ)

Jednotlivé vzorky výrobků byly skladovány bez přístupu světla při teplotách 23°C, 5°C a –38°C, tj. při pokojové teplotě, teplotě chladicího zařízení a mrazicího zařízení. Mražené vzorky byly několik hodin před zpracováním rozmrazeny .

3.1.3. MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR

Za sterilních podmínek byly z popsanych vzorků provedeny kvantitativní odběry a ředěny běžným desítkovým postupem. Standardní objem (0,3ml) tohoto ředění byl zpracován metodou povrchové kultivace vždy v paralelním provedení.

Kultivace byla prováděna v anaerostatech při 45°C po dobu 5 dní. Po té prováděna mikroskopická a biochemické (vybrané testy) kontrola důkaz přítomnosti sledovaných mikroorganismů. Vedle laktobacilů se v nálezech objevovaly streptokoky se zřetelně odlišnou morfologií kolonií.

Sledování a hodnocení se provádělo v intervalu po 14 dnů po dobu 3 měsíců v období od 14.1. do 31.3. Vedle mikrobiologického sledování bylo rovněž měřeno pH (pH – metricky) jednotlivých vzorků.

3.1.4. POUŽITÉ PŮDY

Lactobacillus MRS Agar

Příprava: 67,2g půdy Lactobacillus MRS Agar je rozmíchána v 1000ml destilované vody, 10 ml glycerolu v 1000ml destilované vody. Půdu upravíme na požadované pH 6,3-6,7. Poté je sterilizována v autoklávu při 121°C po 15 minut. Po následném zchlazení ji rozlijeme půdu do připravených Petriho misek a necháme ztuhnout.

Výrobce: HiMedia, Bombai, Indie

3.2. PŘEŽÍVÁNÍ PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ

3.2.1. SLEDOVANÉ MIKROORGANISMY

Mikroorganismy byly vybrány podle četnosti výskytu v mléce, mlékárenském průmyslu, významu jejich přítomnosti v potravinách na technologii a zdravotní nezávadnost a podle možnosti stanovit model chování pro další mikrobiální druhy kontaminující mléčné produkty. Kultury byly dodány Českou sbírkou mikroorganismů v Brně. Pro experimentální část Přezívání patogenních mikroorganismů byly vybrány následující patogenní a podmíněně patogenní druhy mikroorganismů.

- a) Staphylococcus aureus CCM 3953 (analogický k ATCC 25923)
- b) Enterococcus faecalis CCM 1875 (analogický k ATCC 11700)
- c) Escherichia coli CCM 2024 (analogický k ATCC 9637)
- d) Listeria grayi CCM 4029 (analogický k ATCC 19120)

3.2.2. MATERIÁL

Vybrané produkty pro pokusy.

Výběr vzorků pro druhou část experimentu se řídil výsledky z první části. Pro porovnání byly vybrány dva druhy jogurtů se složením odlišných ušlechtilých kultur a zahuštěná nezakysaná směs pro výrobu zakysaných produktů. Po provedení pokusů byly vybrány následující mléčné produkty:



Jogurt Revital active bílý.

Jogurtový krém s probiotickou kulturou, vlákninou a sníženým obsahem tuku.
Výrobce Olma a.s., Olomouc

- složení: mléko, sušené odstředěné mléko, stabilizátor tapiokový škrob, rozpustná vláknina, jogurtová a probiotická kultura *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus rhamnosus*, obsah tuku max. 3%.

Průměrné nutriční hodnoty na 100g :energetické hodnoty 290 kJ, bílkoviny 4,4g, sacharidy 6,8g, tuk 2,7, rozpustná vláknina 0,5g.

Jogurt bílý Klasik

bílý jogurt se sníženým obsahem tuku

výrobce: Olma a.s., Olomouc

složení: mléko, sušené odstředěné mléko, Novation 3600, sušená syrovátka, želatina, živé jogurtové kultury *Lactobacillus bulgaricus* a *Lactococcus termophilus*

Polotovar pro výrobě Revitalu

-zahuštěná pasterovaná směs připravená pro zakysání

3.2.3. PODMÍNKY PŘEŽÍVÁNÍ (SKLADOVÁNÍ)

Vzorky byly cíleně kontaminovány vybranými mikroorganismy a skladovány v chladícím zařízení při teplotě 8°C bez přístupu světla. Doba skladování za těchto podmínek činila 0,1,7,14,30,44 dní.

3.2.4. MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR

Vzorky byly kontaminovány sterilním narušením obalu jehlou o průměru cca 0,1mm. Kontaminovány byly 0,5ml fyziologického roztoku s obsahem 10^5 mikroorganismů. Jejich koncentrace byla standardizována pomocí baryové stupnice dle Mc Farlanda. Narušený obal byl následně zalit parafínem. Pro docílení rovnoměrného rozmístění v produktu byly vzorky



protřepány 10 minut na třepačce. Vzorky byly uskladněny v chladícím zařízení při teplotě 8°C po dobu 0,1,7,14,30,44 dní.

Za sterilních podmínek byly z popsáných vzorků provedeny kvantitativní odběry a ředěny běžným desítkovým postupem. Standardní objem (0,3ml) tohoto ředění zpracován metodou povrchové kultivace vždy v paralelním provedení.

Po inkubaci 24hod při teplotě 37°C byly počítány kolonie v odpovídajícím ředění a po prodloužené inkubaci 48hodin provedena korekce počtu. Pro statistické hodnocení byl použit aritmetický průměr.

3.2.5. POUŽITÉ PŮDY

Escherichia coli: MacConkey Agar

Příprava: 55g agaru se smíchá s 1000ml destilované vody, steriluje se v autoklávu po dobu 15min. při 121°C. Výsledné pH se upraví na 7,4+/-0,2

Výrobce: HiMedia, Bombai, Indie

Listeria : Listeria selective Broth Base + Agar powder

Příprava: 38,5g se smíchá s 15g agarového prášku a 1000ml destilované vody, nejprve se důkladně povaří a poté steriluje v autoklávu po dobu 15min. při 121°C. Výsledné pH se upraví 7,3+/-0,2.

Výrobce: HiMedia, Bombai, Indie

Enterococcus: Slanetz and Bartley medium

Příprava: 46,5g se smíchá s 1000ml destilované vody a důkladně se vaří 15-20min. Výsledné pH se upraví na 7,2

Výrobce: HiMedia, Bombai, Indie

Staphylococcus aureus : Mannitol Salt Agar

Příprava: 111g se smíchá se 1000ml destilované vody, důkladně se povaří a poté steriluje v autoklávu po dobu 15min. při 121°C. Výsledný roztok se upraví na pH 7,4.

Výrobce: HiMedia, Bombai, Indie

4. VÝSLEDKY

4.1. METODIKA HODNOCENÍ

Uvedené výsledky představují aritmetický průměr 6 až 10 dílčích výsledků, které byly pro vyhodnocení vybrány po vyloučení nepřijatelných výsledků. Jako nepřijatelné pro hodnocení byly označeny Petriho misky s počtem kolonií < 10 a > 1000 . Přijatelné výsledky byly podle uvedeného vzorce přepočteny na počet mikroorganismu v 1g výrobku a zaznamenány do tabulky. Počet je vypočítán ze vzorce

$$\text{počet mikroorganismů v 1g} = \frac{\text{odečtený počet kolonií} \times \text{objem základního zředění}}{\text{pipetovaný objem} \times \text{zředění} \times \text{navážka}} \quad (1)$$

Aritmetický průměr takto získaných hodnot je zaznamenán v tabulkách a grafech v kapitolách 4.2. a 4.3.

4.2. VÝSLEDKY K EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI PŘEŽÍVÁNÍ RODU LACTOBACILLUS

Tabulka č.III- Počet bakterií rodu *Lactobacillus* v 1g výrobku skladovaných při teplotě 23°C

Pokožová teplota 23°C						
Datum	14.1.	28.1.	17.2.	3.3.	17.3.	31.3.
Olma	10^8	10^7	10^5	10^4	10^4	10^4
Kunín	10^6	10^4	10^5	10^5	10^4	10^4
Danone	10^6	10^5	10^4	10^4	10^4	10^4
Yoplait	10^5	10^5	10^4	10^4	kont. 10^2	kont. 10^2
Madeta	10^5	10^4	10^4	10^5	10^4	10^3
Hollandia	10^8	10^6	10^5	10^4	10^5	10^5

Tabulka č.IV - Počet bakterií rodu *Lactobacillus* v 1g výrobku skladovaných při teplotě 5°C

Chladicí zařízení 5°C						
Datum	14.1.	28.1.	17.2.	3.3.	17.3.	31.3.
Olma	-	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶
Kunín	-	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
Danone	-	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴
Yoplait	-	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
Madeta	-	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵
Hollandia	-	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵

Tabulka č.V-Počet bakterií rodu *Lactobacillus* v 1g výrobku skladovaných při teplotě -38°C

Mrazicí zařízení -38°C						
Datum	14.1.	28.1.	17.2.	3.3.	17.3.	31.3.
Olma	-	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁶	10 ³	10 ³
Kunín	-	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴
Danone	-	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴
Yoplait	-	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴
Madeta	-	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴
Hollandia	-	10 ⁴	10 ⁵	10 ³	10 ³	10 ³

Tabulka č.VI - pH jednotlivých výrobků skladovaných při teplotě 23°C

Teplota	23°C					
Datum	8..1	22.1.	11.2.	25.	11.III	25.III
Olma	4,71	4,61	4,56	4,58	4,55	4,54
Kunín	4,63	4,51	4,39	4,54	4,34	4,33
Danone	4,44	4,45	4,45	4,46	4,38	4,45
Yoplait	4,2	4,18	4,2	4,15	4,03	4,31
Madeta	4,29	4,12	3,96	3,97	3,88	4,09
Hollandia	4,52	4,49	4,45	4,42	4,14	4,02

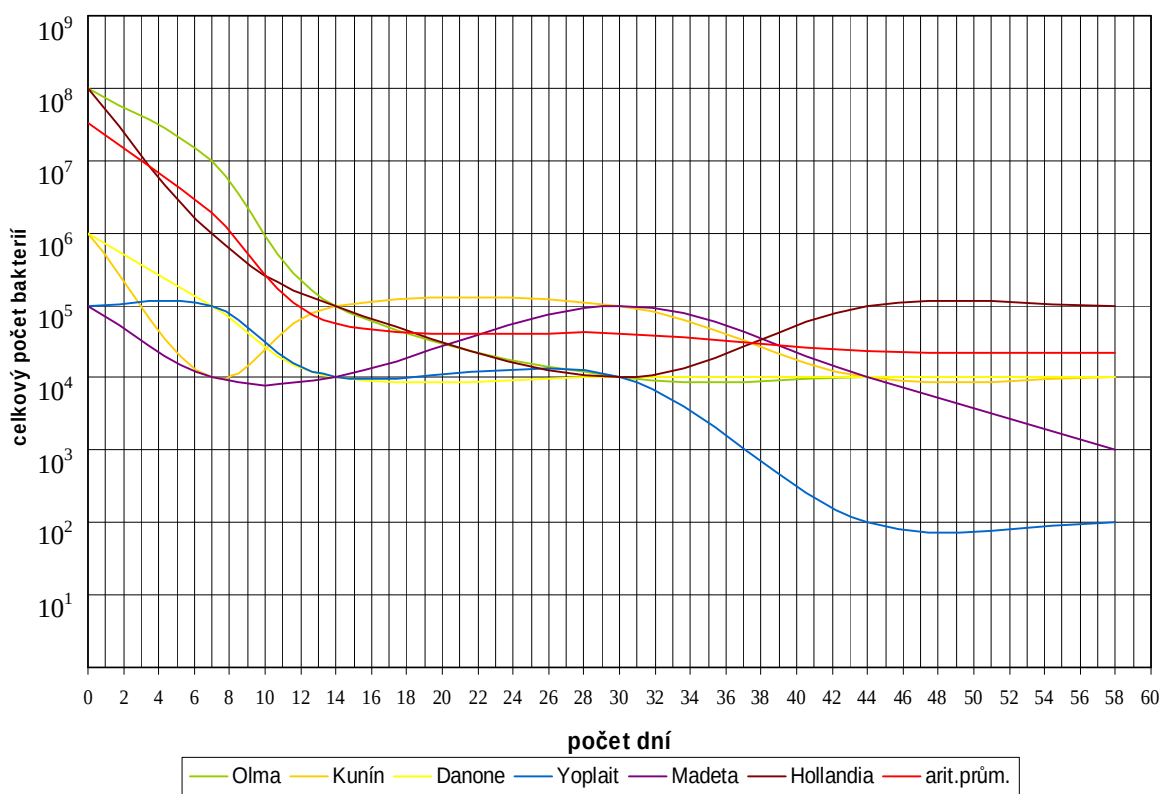
Tabulka č.VII - pH jednotlivých výrobků skladovaných při teplotě 5°C

Teplota	5°C					
Datum	8..1	22.I	11.II	25.II	11.III	25.III
Olma	x	6,62	4,63	4,62	4,62	4,7
Kunín	x	4,55	4,57	4,55	4,52	4,6
Danone	x	4,53	4,53	4,51	4,52	4,7
Yoplait	x	4,48	4,45	4,37	4,41	4,5
Madeta	x	4,34	4,34	4,33	4,26	4,39
Hollandia	x	4,3	4,28	4,39	4,33	4,13

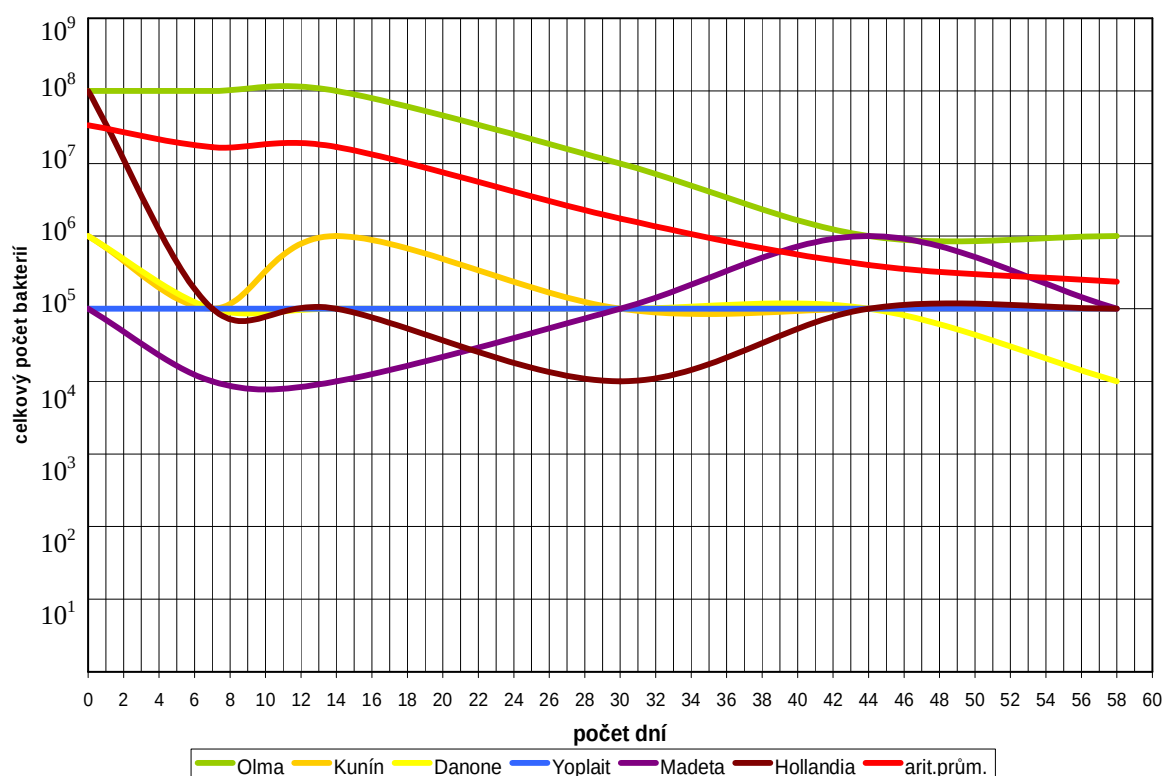
Tabulka č.VIII - pH jednotlivých výrobků skladovaných při teplotě -38°C

Teplota	-38°C					
Datum	8..I	22.I	11.II	25.II	11.III	25.III
Olma	x	4,65	4,63	4,63	4,62	4,69
Kunín	x	4,73	4,73	4,72	4,68	4,77
Danone	x	4,48	4,52	4,46	4,56	4,69
Yoplait	x	4,51	4,53	4,46	4,5	4,63
Madeta	x	4,4	4,39	4,32	4,32	4,48
Hollandia	x	4,48	4,5	4,46	4,48	4,61

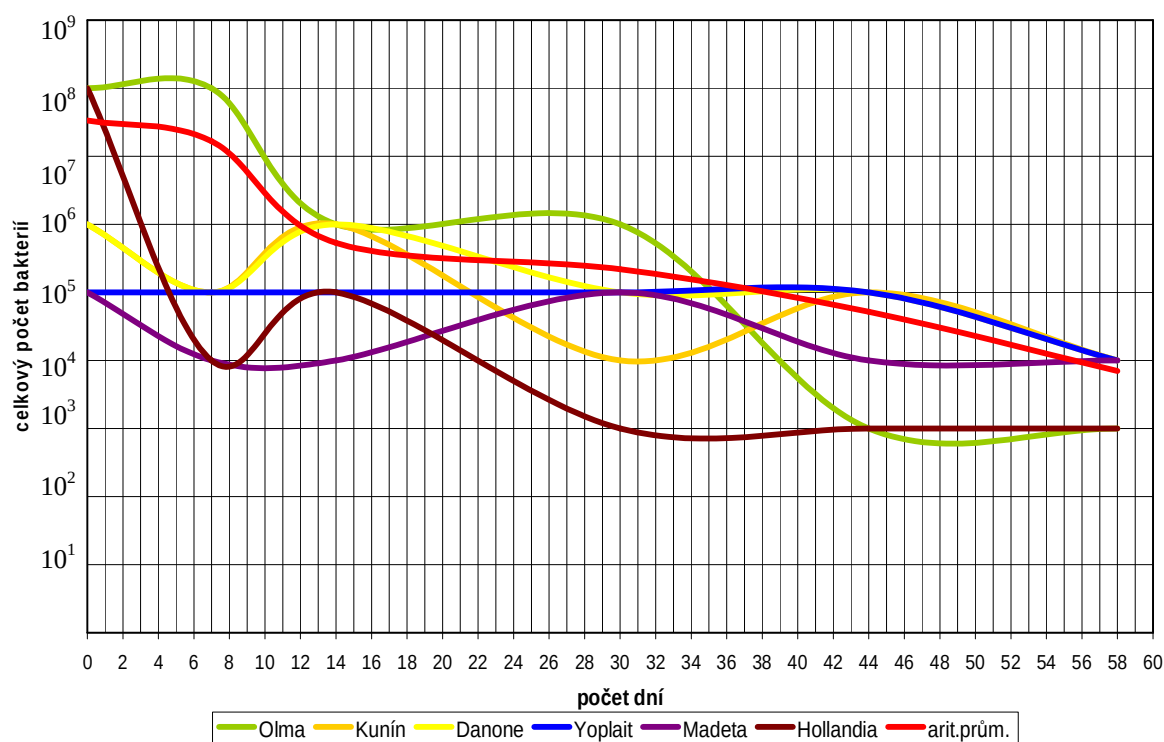
Graf č.1 – Počet bakterií rodu *Lactobacillus* v 1g výrobku skladovaných při teplotě 23°C

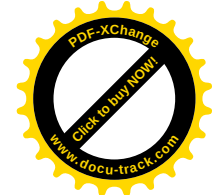
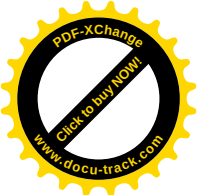


Graf č.2 - Počet bakterií rodu *Lactobacillus* v 1g výrobku skladovaných při teplotě 5°C



Graf č.3-Počet bakterií rodu *Lactobacillus* v 1g výrobku skladovaných při teplotě -38°C





Podle relativně konstantních hodnot pH výrobků lze dokázat, že přítomné bakterie jsou vyšlechtěné jako tzv. stop kultury. Mají tu schopnost, že v procesu mléčného kysání jsou schopny prokysat produkt do požadované kyselosti, dále v jogurtu přežívat, ale jeho kyselost výrazně nezvyšovat. Tím je dosaženo zvýšené trvanlivosti jogurtu.

Při teplotě 23°C je znatelný největší úbytek počtu bakterií ve zkoumaných vzorcích jogurtů. Ten je způsoben tím, že byly bakteriím vytvořeny relativně příznivé podmínky pro rozmnožování a růst. Jejich metabolismus se nezpomaloval a docházelo ke spotřebování živin až k jejich celkové spotřebě. Následkem pak byla fáze odumírání buněk a jejich prudký úbytek. U vzorku Lehký košík (Yoplait) navíc došlo po určité době ke kontaminaci vzorku.

Při teplotě 5°C je možno sledovat vyrovnanost růstu a odumírání mikroorganismů. Jejich počet je konstantní, popřípadě dochází k mírnému poklesu v počtu buněk. Při této teplotě došlo patrně ke zpomalení metabolismu a oslabení, popřípadě zastavení, růstu mikroorganismů a jejich aktivit. Z hlediska uchování bakterií v živé stavu a zachování jejich počtu má proto tento způsob skladování praktický význam. I sami výrobci uvádí teplotu uskladnění daných výrobků mezi 5 - 7°C.

Při teplotě -38°C dochází k nejvýraznějšímu poklesu počtu buněk. Na konci sledovaného období dosahuje jejich počet nejnižších hodnot při všech způsobech uskladnění. Tato teplota je pro růst a rozmnožování *Lactobacillus* bakterií velmi nepříznivá a proto dochází k jejich razantnímu úbytku. Z logického hlediska je skladování jogurtů v mrazících boxech nepřístupné, přesto však můžeme tyto výsledky použít pro porovnání z předchozími možnostmi.

4.3.VÝSLEDKY K EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI PŘEŽÍVÁNÍ PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ

Tabulka č.IX- Přežívání *Enterococcus faecalis* ve vybraných vzorcích

počet dní	klasik	revital	polotovar
0	$7,19 \cdot 10^5$	$3,55 \cdot 10^5$	$1,91 \cdot 10^6$
1	$4,3 \cdot 10^5$	$1,92 \cdot 10^5$	$9,16 \cdot 10^4$
7	$1,62 \cdot 10^3$	$1,46 \cdot 10^3$	$1,58 \cdot 10^3$
14	$1,07 \cdot 10^4$	$5,85 \cdot 10^3$	$5,97 \cdot 10^3$
30	$8,49 \cdot 10^3$	$3,55 \cdot 10^4$	$1,91 \cdot 10^5$
44	$9,45 \cdot 10^3$	$4,65 \cdot 10^4$	$1,36 \cdot 10^5$

Tabulka č.X- Přežívání *Listeria grayi* ve vybraných vzorcích

počet dní	klasik	revital	polotovar
0	$2,32 \cdot 10^6$	$8,46 \cdot 10^6$	$1,11 \cdot 10^6$
1	$1,66 \cdot 10^6$	$5,73 \cdot 10^5$	$3,47 \cdot 10^5$
7	$1,18 \cdot 10^6$	$5,83 \cdot 10^5$	$1,72 \cdot 10^6$
14	$6,41 \cdot 10^3$	$2,87 \cdot 10^3$	$3,61 \cdot 10^4$
30	$3,49 \cdot 10^1$	$6,66 \cdot 10^1$	$4,34 \cdot 10^5$
44	$2,37 \cdot 10^2$	$7,32 \cdot 10^1$	$4,61 \cdot 10^6$

Tabulka č.XI- Přežívání *Escherischia coli* ve vybraných vzorcích

Počet dní	Klasik	Revital	Polotovar
0	$3,43 \cdot 10^5$	$2,55 \cdot 10^5$	$5,34 \cdot 10^5$
1	$1,02 \cdot 10^6$	$4,35 \cdot 10^5$	$2,27 \cdot 10^5$
7	$4,33 \cdot 10^3$	$6,66 \cdot 10^3$	$1,23 \cdot 10^4$
14	$1,83 \cdot 10^2$	$2,33 \cdot 10^2$	$1,87 \cdot 10^2$
30	0	0	$1,21 \cdot 10^4$
44	0	0	$5,65 \cdot 10^3$

Tabulka č.XII- Přežívání *Staphylococcus aureus* ve vybraných vzorcích

počet dní	klasik	revital	polotovar
0	$7,08 \cdot 10^5$	$8,86 \cdot 10^5$	$1,12 \cdot 10^6$
1	$1,02 \cdot 10^5$	$4,72 \cdot 10^4$	$7,89 \cdot 10^5$
7	$3,32 \cdot 10^3$	$5,68 \cdot 10^4$	$1,95 \cdot 10^5$
14	$1,22 \cdot 10^4$	$7,35 \cdot 10^3$	$6,13 \cdot 10^4$
30	$8,92 \cdot 10^3$	$2,16 \cdot 10^4$	$1,88 \cdot 10^6$
44	$2,55 \cdot 10^1$	$7,33 \cdot 10^1$	$3,97 \cdot 10^5$

Tabulka č.XIII – Přežívání vybraných mikroorganismů ve vzorku Klasik

Hodnocení (dny)	Staphylococcus aureus	E.coli	enterococcus faecalis	listeria grayi
0	$7,08 \cdot 10^5$	$3,43 \cdot 10^5$	$7,19 \cdot 10^5$	$2,32 \cdot 10^6$
1	$1,02 \cdot 10^5$	$1,02 \cdot 10^6$	$4,3 \cdot 10^5$	$1,66 \cdot 10^6$
7	$3,32 \cdot 10^3$	$4,33 \cdot 10^3$	$1,62 \cdot 10^3$	$1,18 \cdot 10^6$
14	$1,22 \cdot 10^4$	$1,83 \cdot 10^2$	$1,07 \cdot 10^4$	$6,41 \cdot 10^3$
31	$8,92 \cdot 10^3$	0	$8,49 \cdot 10^3$	$3,49 \cdot 10^1$
44	$2,55 \cdot 10^1$	0	$9,45 \cdot 10^3$	$2,37 \cdot 10^2$

Tabulka č.XIV – Přežívání vybraných mikroorganismů ve vzorku Revital

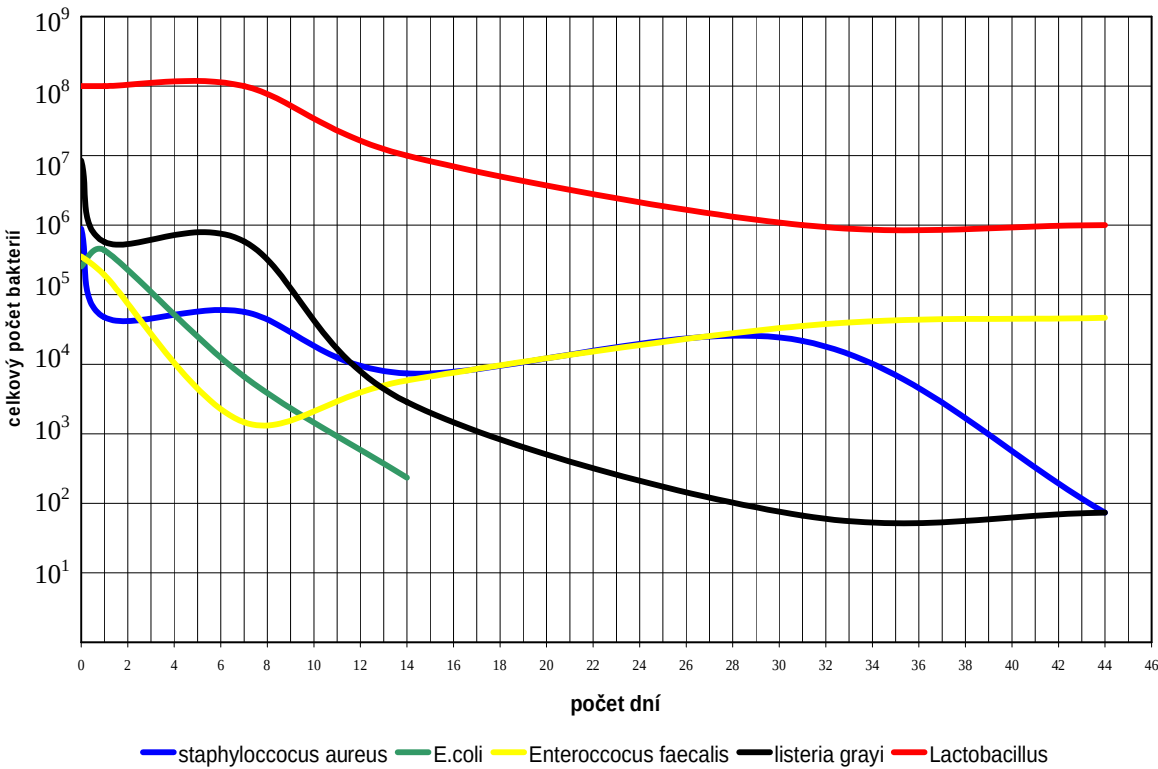
Hodnocení (dny)	staphylococcus aureus	E.coli	Enterococcus faecalis	listeria grayi
0	$8,86 \cdot 10^5$	$2,55 \cdot 10^5$	$3,55 \cdot 10^5$	$8,46 \cdot 10^6$
1	$4,72 \cdot 10^4$	$4,35 \cdot 10^5$	$1,92 \cdot 10^5$	$5,73 \cdot 10^5$
7	$5,68 \cdot 10^4$	$6,66 \cdot 10^3$	$1,46 \cdot 10^3$	$5,83 \cdot 10^5$
14	$7,35 \cdot 10^3$	$2,33 \cdot 10^2$	$5,85 \cdot 10^3$	$2,87 \cdot 10^3$
31	$2,16 \cdot 10^4$	0	$3,55 \cdot 10^4$	$6,66 \cdot 10^1$
44	$7,33 \cdot 10^1$	0	$4,65 \cdot 10^4$	$7,32 \cdot 10^1$

Tabulka č. XV- Přežívání vybraných mikroorganismů ve vzorku Polotovar při výrobě Revitalu

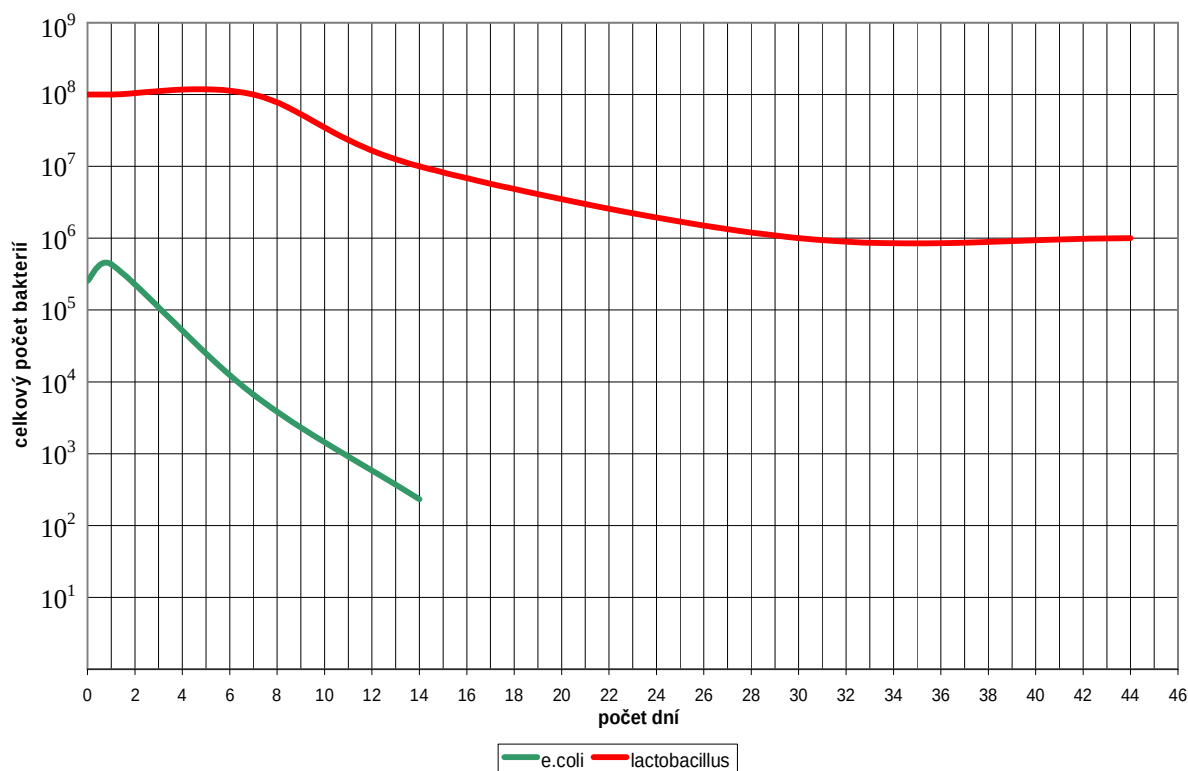
Hodnocení (dny)	Staphylococcus aureus	E.coli	Enterococcus faecalis	Listeria grayi
0	$1,12 \cdot 10^6$	$5,34 \cdot 10^5$	$1,91 \cdot 10^6$	$1,11 \cdot 10^6$
1	$7,89 \cdot 10^5$	$2,27 \cdot 10^5$	$9,16 \cdot 10^4$	$3,47 \cdot 10^5$
7	$1,95 \cdot 10^5$	$1,23 \cdot 10^4$	$1,58 \cdot 10^3$	$1,72 \cdot 10^6$
14	$6,13 \cdot 10^4$	$1,87 \cdot 10^2$	$5,97 \cdot 10^3$	$3,61 \cdot 10^4$
31	$1,88 \cdot 10^6$	$1,21 \cdot 10^4$	$1,91 \cdot 10^5$	$4,34 \cdot 10^5$
44	$3,97 \cdot 10^5$	$5,65 \cdot 10^3$	$1,36 \cdot 10^5$	$4,61 \cdot 10^6$

..

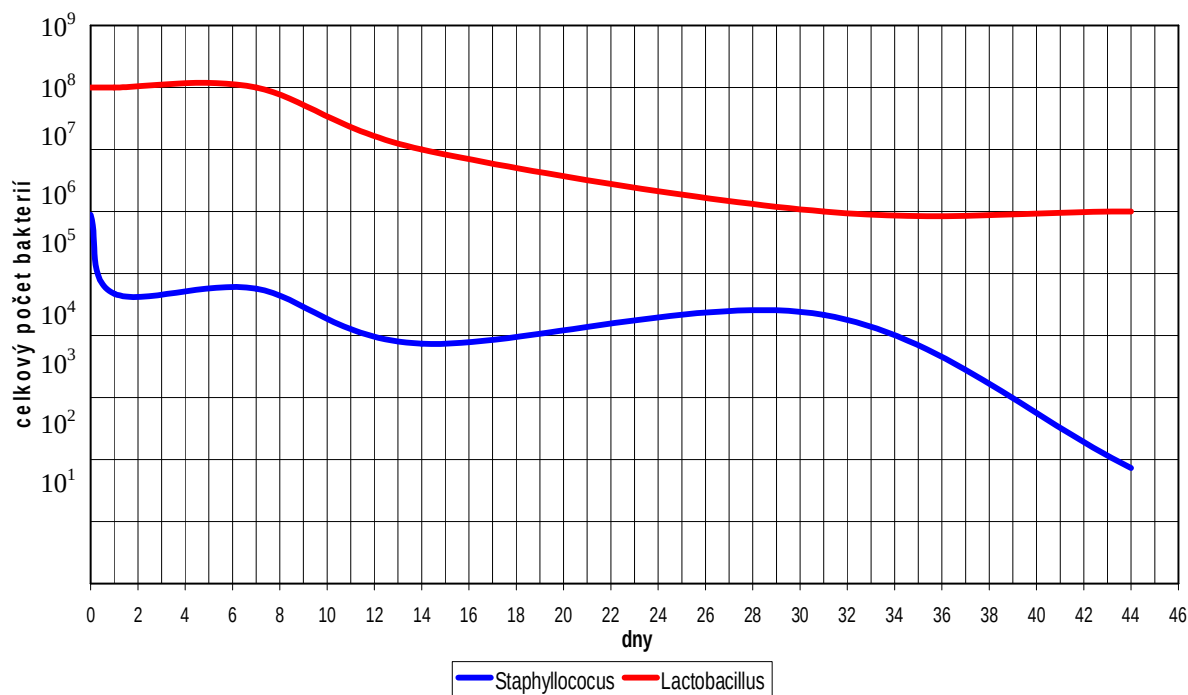
Graf č.4–Přežívání vybraných mikroorganismů ve vzorku Revital skladovaných při 8°C



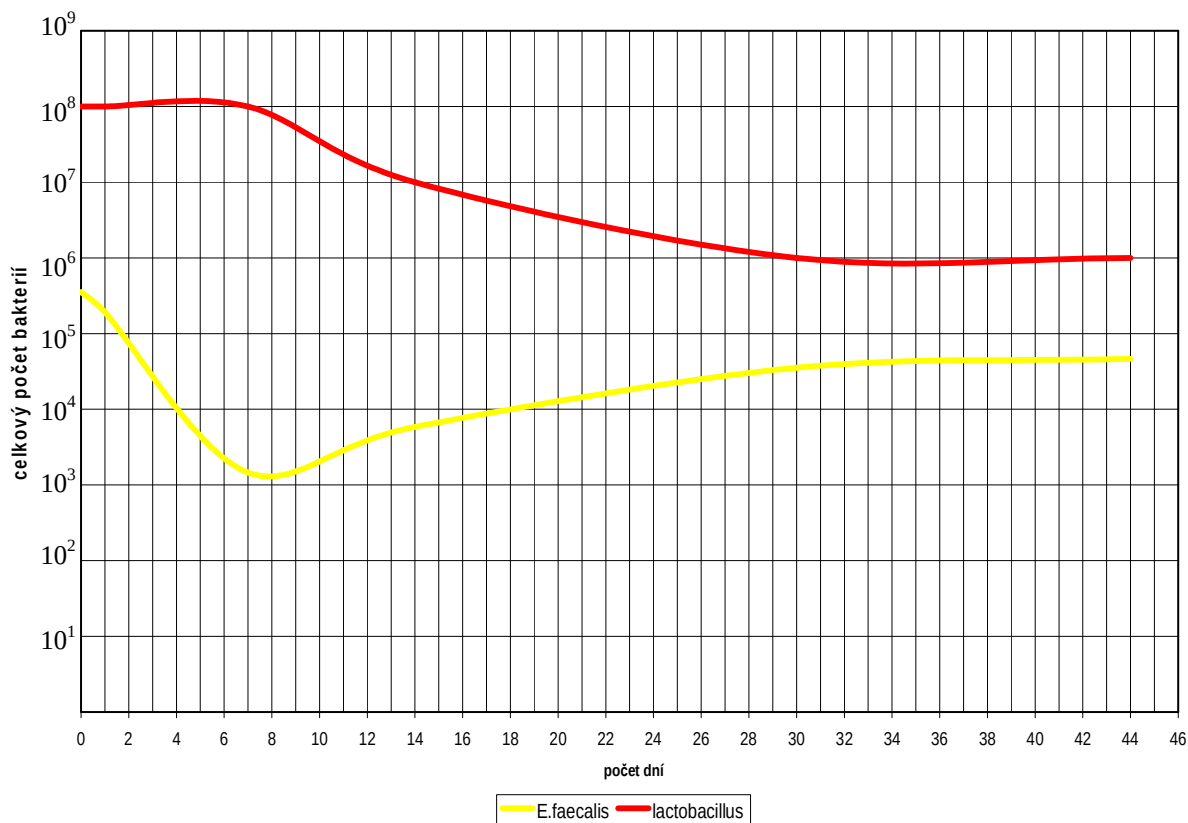
Graf č.5 – Přežívání *E.coli* a *Lactobacillus* ve vzorku Revital skladovaných při teplotě 8°C



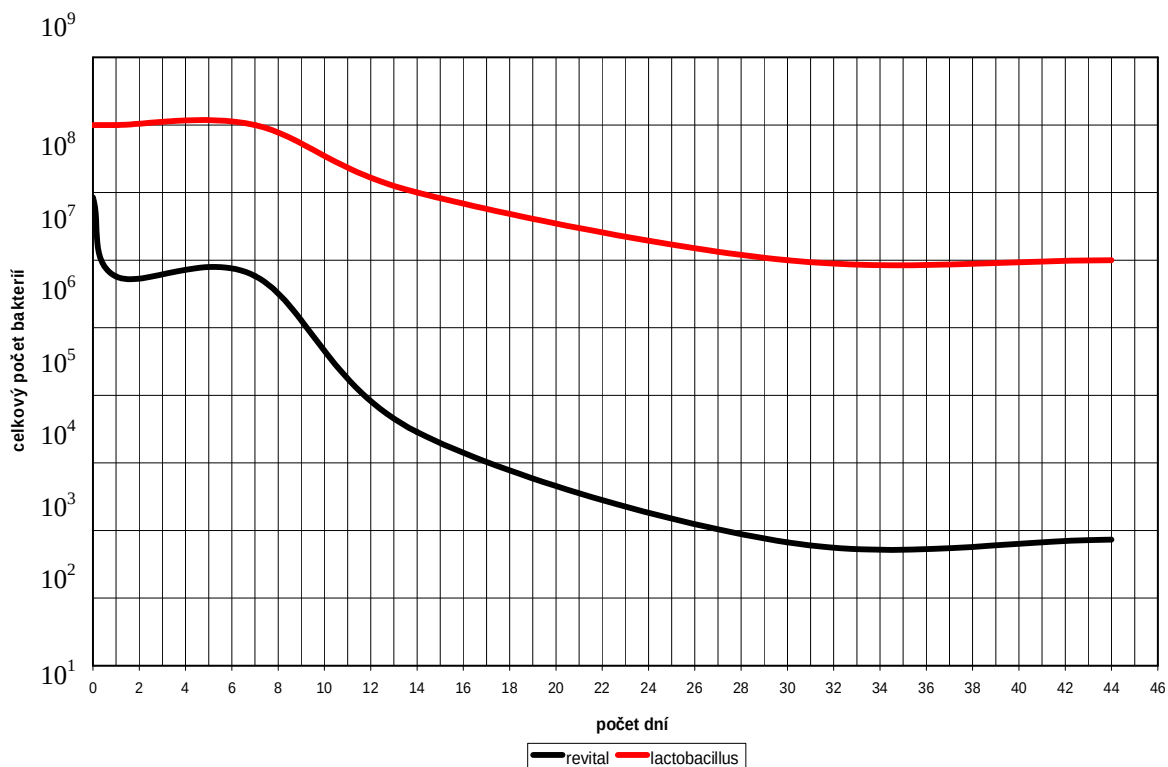
Graf č.6 – Přežívání *S.aureus* a *Lactobacillus* ve vzorku Revital skladovaných při teplotě 8°C



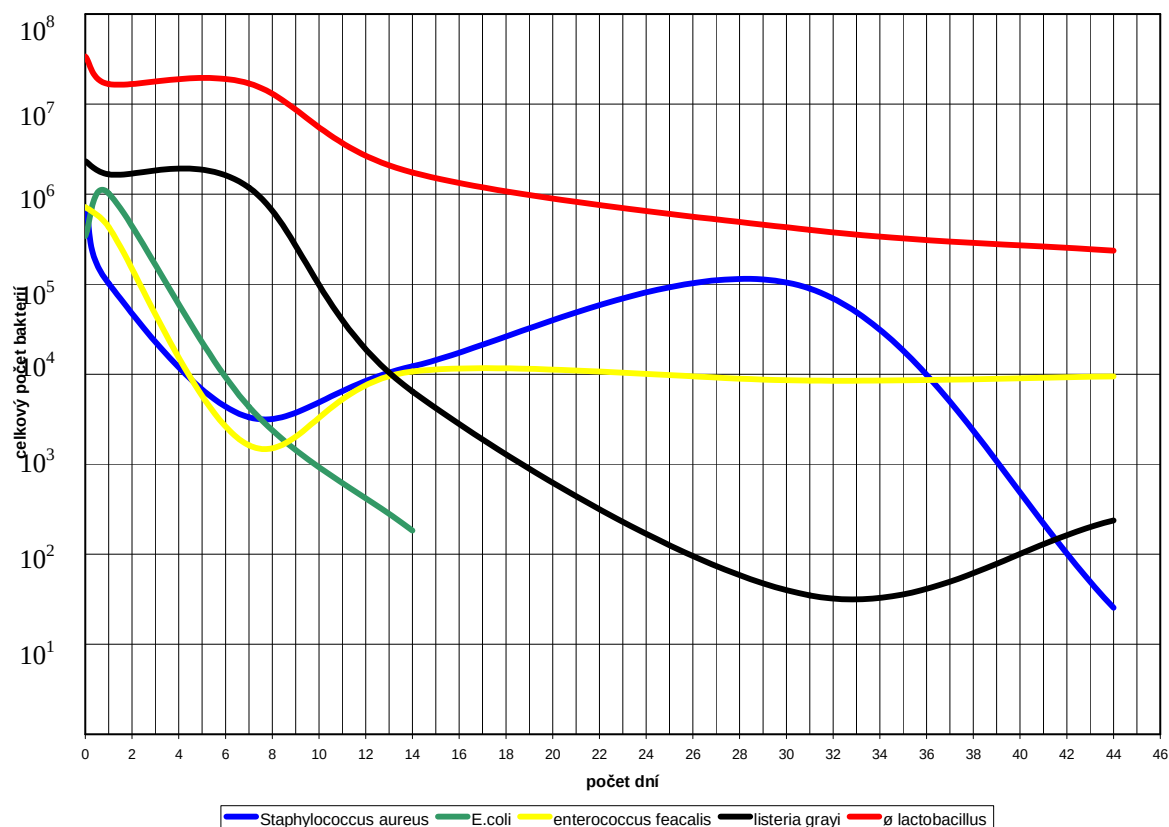
Graf č.7- Přežívání *E.faecalis* a *Lactobacillus* ve vzorku Revital skladovaných při teplotě 8°C



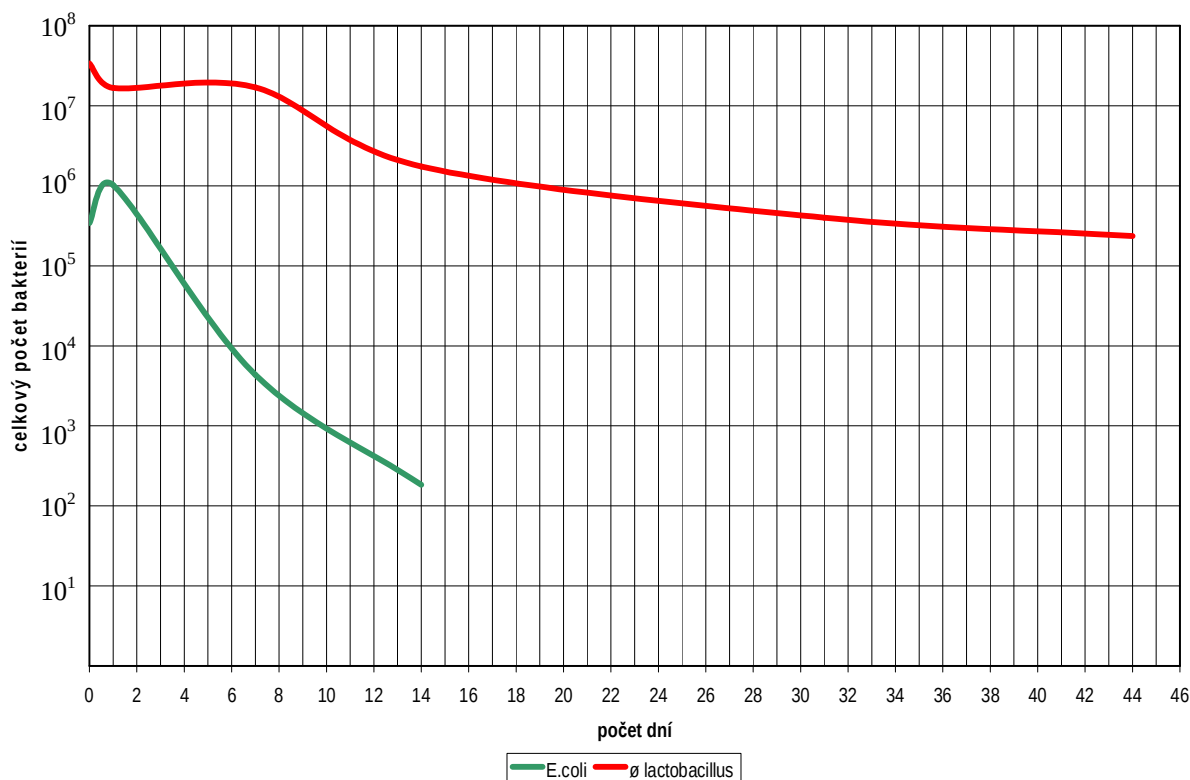
Graf č.8- Přežívání *L.grayi* a *Lactobacillus* ve vzorku Revital skladovaných při teplotě 8°C



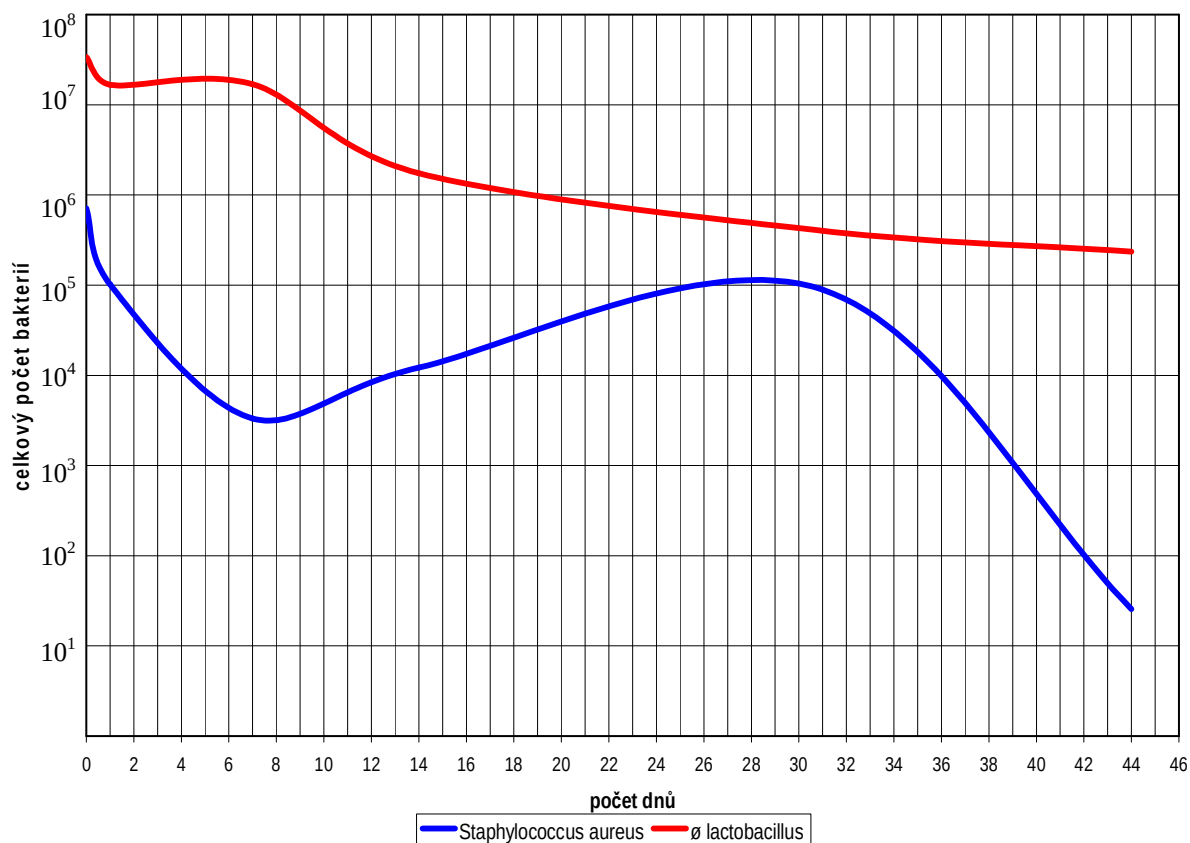
Graf. č.9- Přežívání vybraných mikroorganismů ve vzorku **Klasik** skladovaných při 8°C



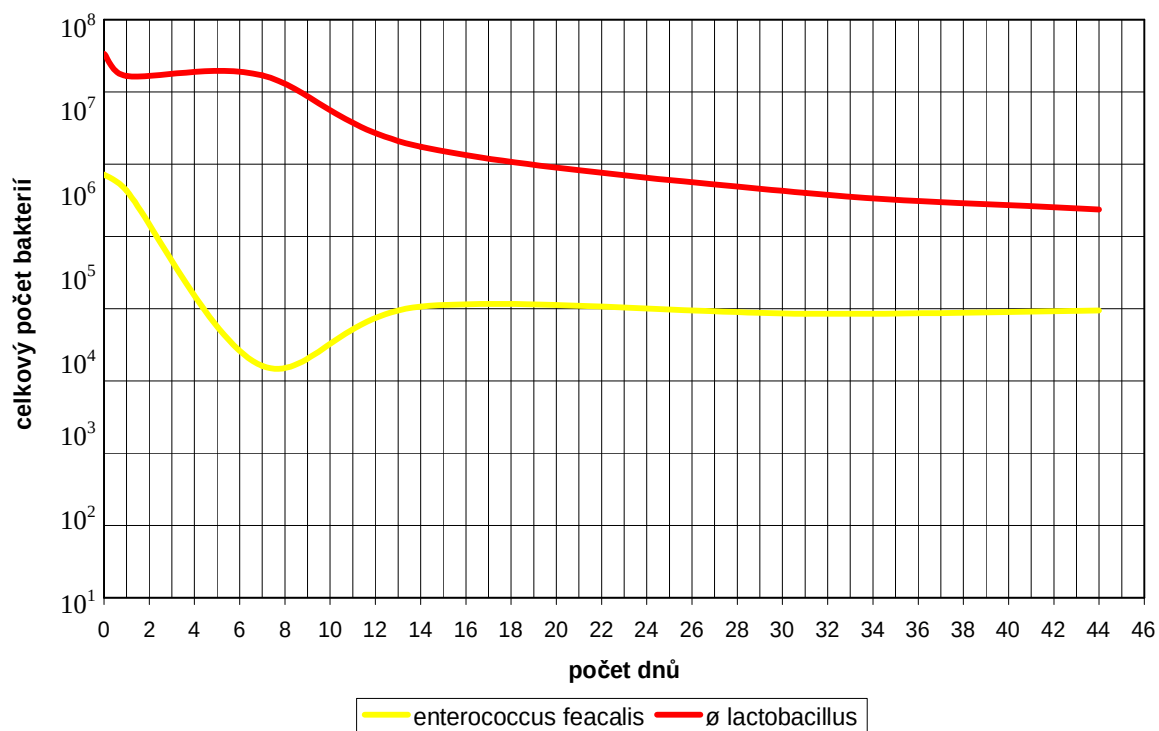
Graf č.10- Přežívání *E. coli* a *Lactobacillus* ve vzorku Klasik skladovaných při teplotě 8°C



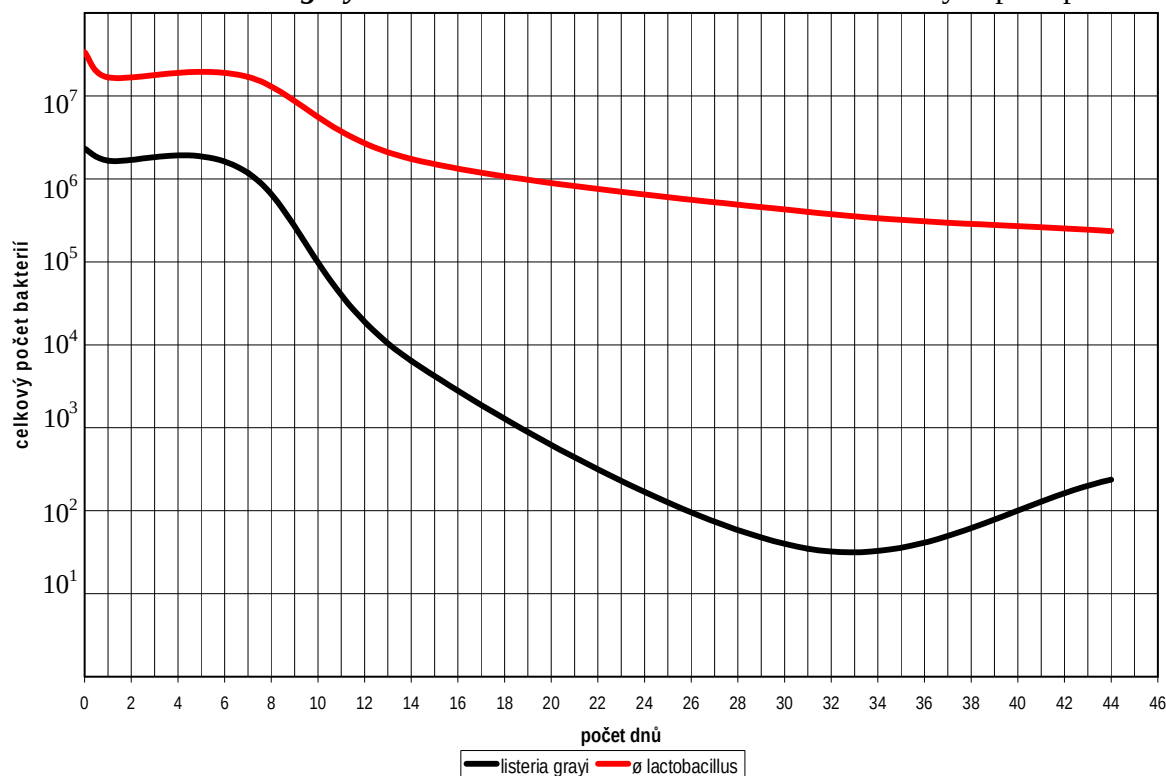
Graf č.11- Přežívání *S.aureus* a *Lactobacillus* ve vzorku Klasik skladovaných při teplotě 8°C



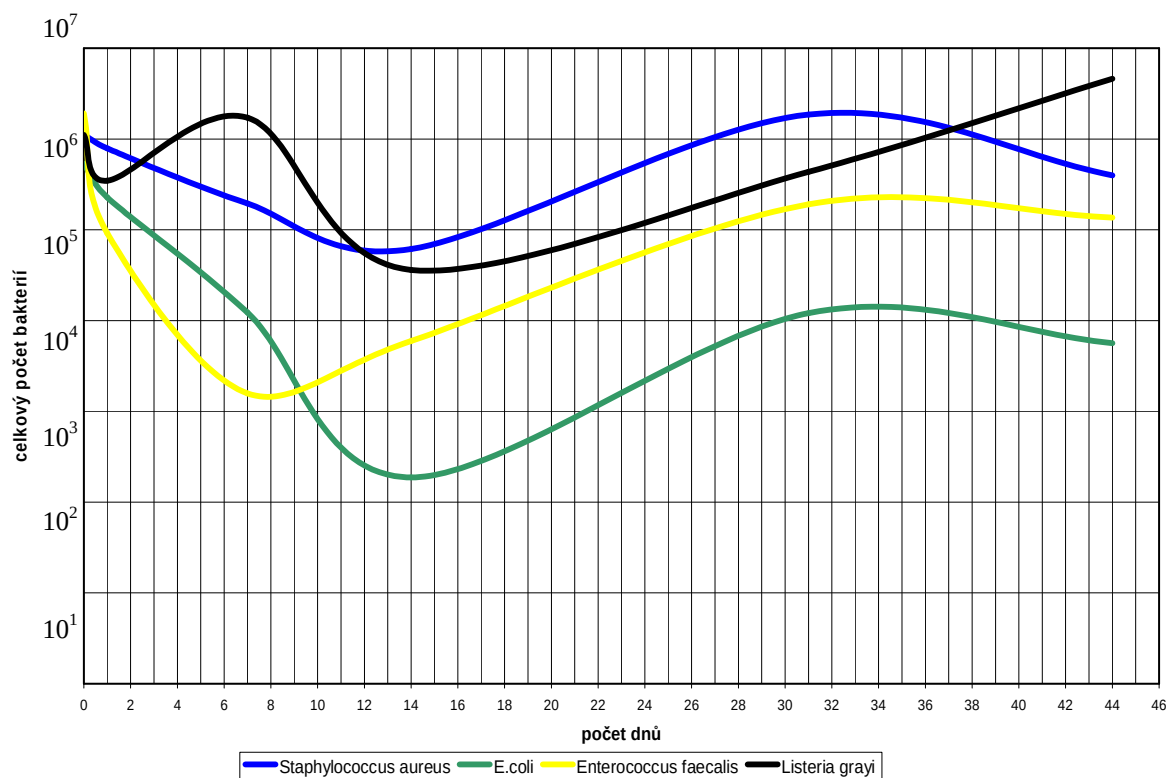
Graf č.12- Přežívání *E.faecalis* a *Lactobacillus* ve vzorku Klasik skladovaných při teplotě 8°C



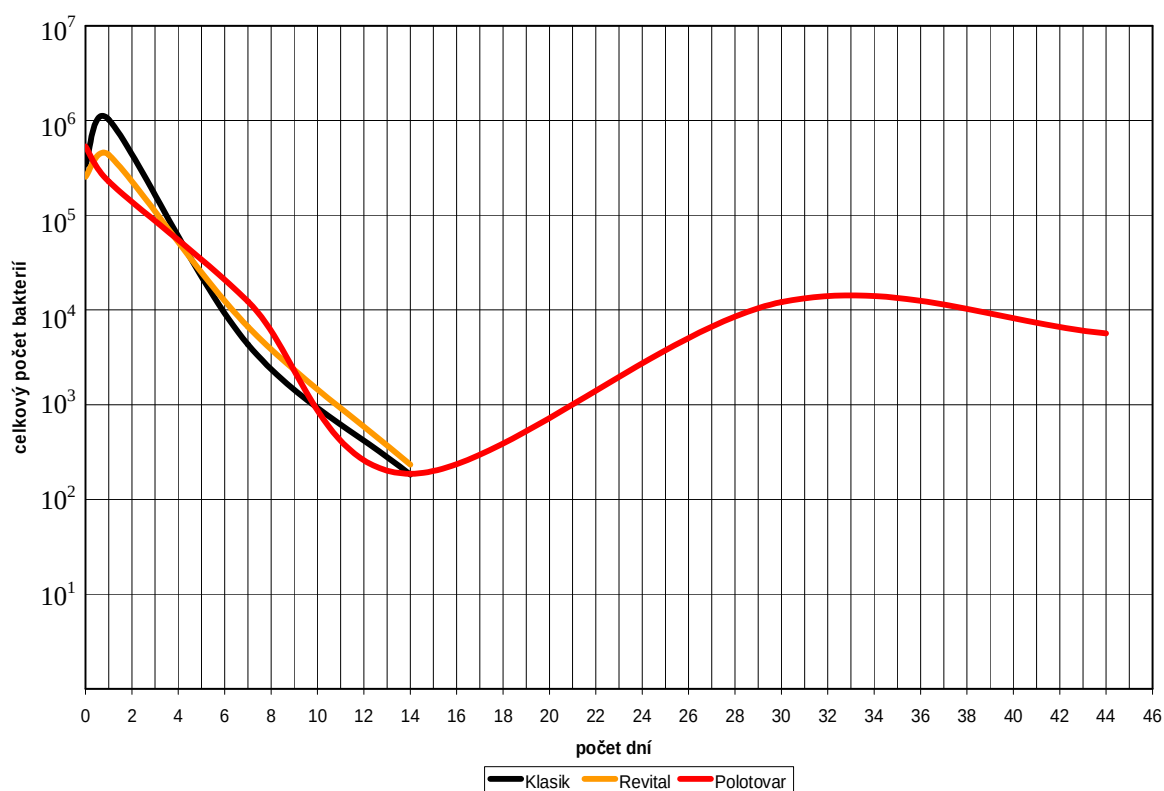
Graf.č.13- Přežívání *L.grayi* a *Lactobacillus* ve vzorku Klasik skladovaných při teplotě 8°C



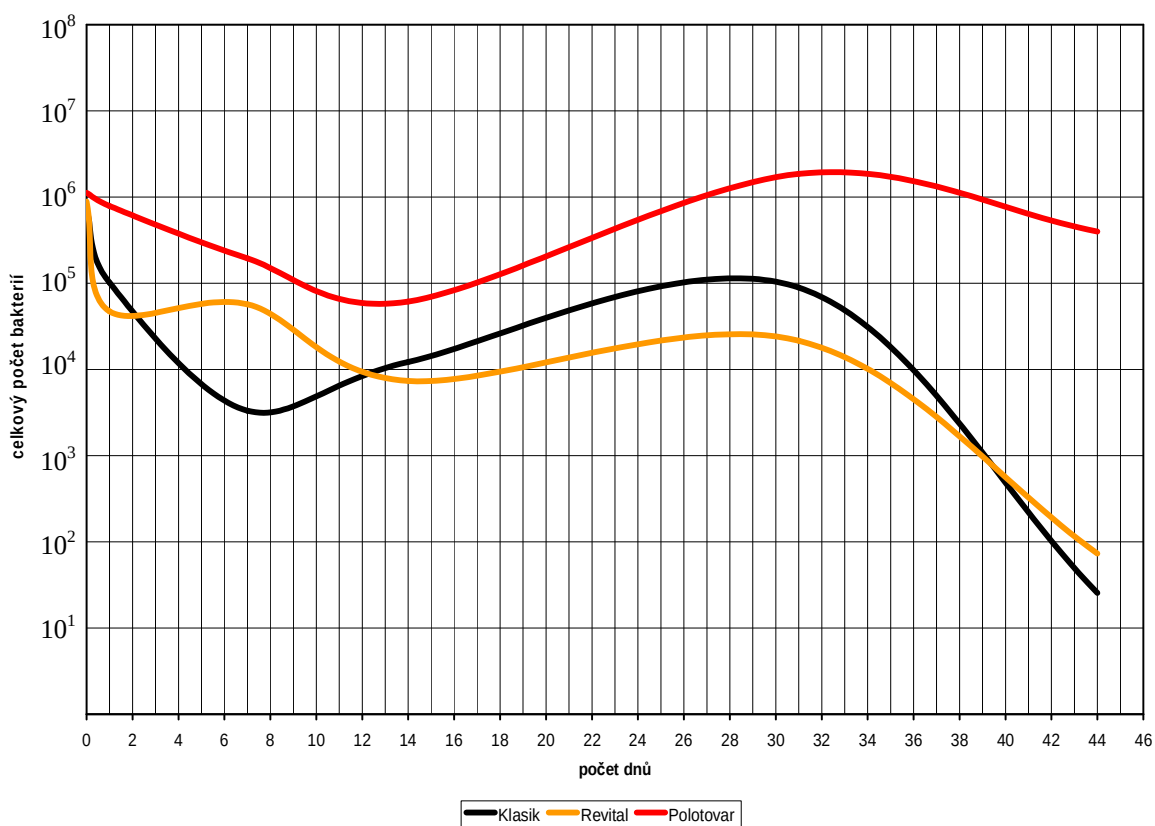
Graf.č.14- Přežívání vybraných mikroorganismů ve vzorku Polotovar skladovaných při 8°C



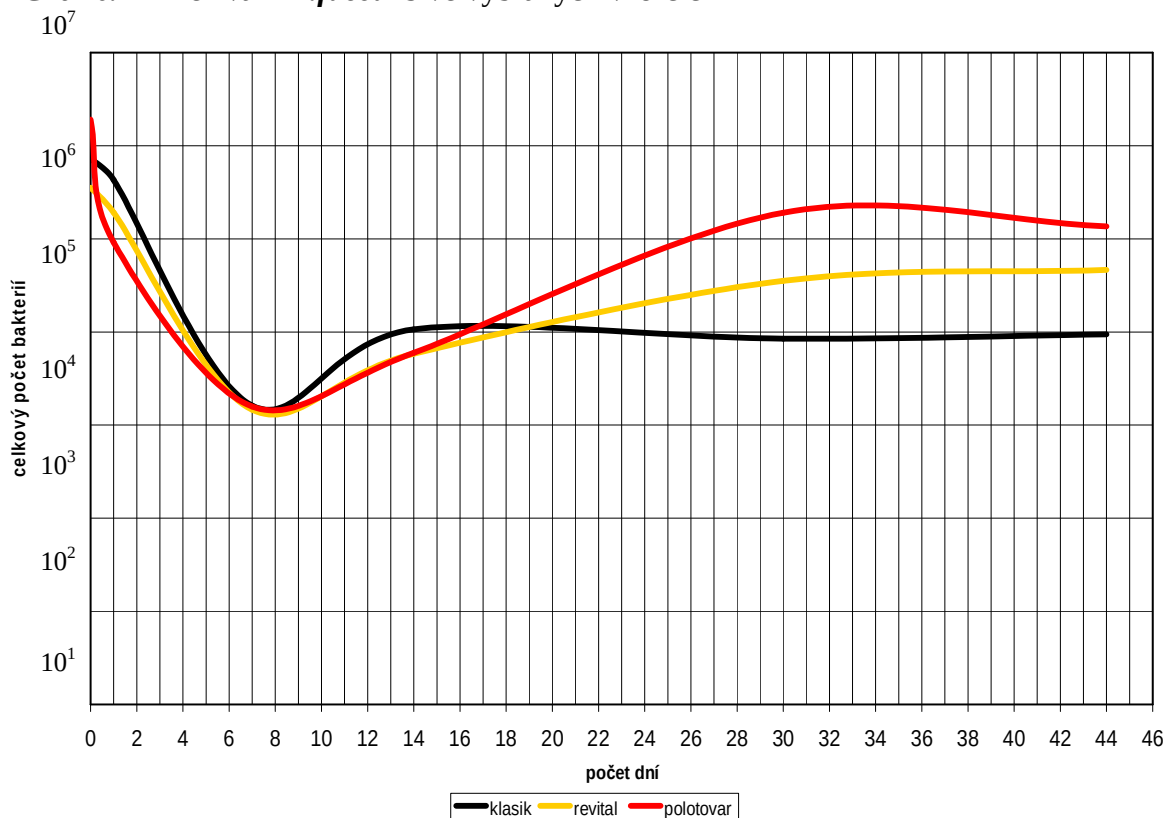
Graf.č.15-Přežívání *E.coli* ve vybraných vzorcích



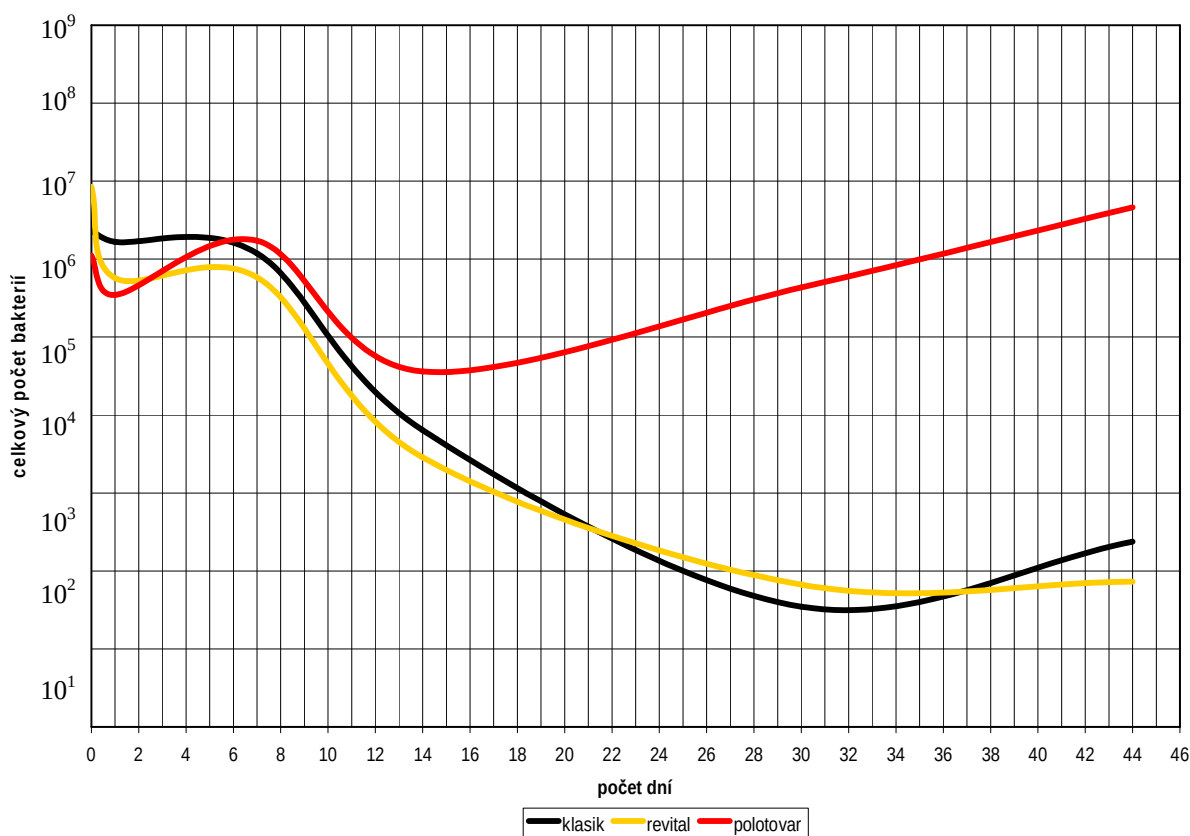
Graf č.16-Přežívání *S.aureus* ve vybraných vzorcích



Graf č.17-Přežívání *E.faecalis* ve vybraných vzorcích



Graf č.18-Přežívání *L.grayi* ve vybraných vzorcích





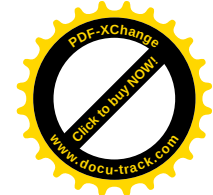
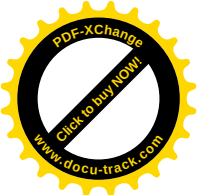
Výsledky jsou dále graficky zpracovány v příloze č.III,IV a V, kde jsou pro vyloučení odchylek měření zobrazeny spojnice trendů jednotlivých křivek. Součástí vyhodnocení výsledků bylo také subjektivní sledování senzorických změn (barva, vůně, celkový vzhled). Během měření však nebyly tyto změny prokázány a nejsou proto součástí kapitoly 4.

Problematika se soustředila na případné antagonistické vztahy mezi bakteriemi mléčného kysání a jinými druhy mikroorganismů těsně příbuzné bakteriím jako *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* a *Escherichia coli* O 157 , které jsou jednak rodově identické a druhově se nepatrně liší od vybraných sledovaných druhů použitých v pokusech k vůli větší bezpečnosti tj. *Listeria grayi* (*Listeria monocytogenes*) a *Escherichia coli* (*Escherichia coli* O 157 event. *Salmonella spp.*).

Pro prokázání účinku fermentovaných produktů byl pokus současně proveden na vzorku Polotovar při výrobě Revitalu, který nebyl infikován ušlechtilou mikroflórou a nedošlo tak u něj ke snížení pH.

Z výsledků měření uvedených v kapitole 4. a příloze III,IV,a V lze vyvodit následující zjištění. U všech vzorků se u zkoumaných mikroorganismů nejprve projevil prudký úbytek přítomných bakterií. Ten je patrně zapříčiněn adaptací zmíněných bakterií na prostředí a účinkem tzv. chladového šoku, kdy byly zkoumané mikroorganismy během krátké doby vystaveny skladovací teplotě 8°C. Teplota skladování fermentovaných mléčných výrobků není však dostatečně nízká, aby dokázala efektivně zamezit úhynu a růstu kontaminujících mikroorganismů. Kromě *Escherichia coli* docházelo během skladování k pomalému úbytku přítomných buněk a u vzorku **Polotovar při výrobě Revitalu** došlo zhruba po 14 dnech u všech k nárůstu počtu. Vzhledem k vlastnostem *E.coli* (kapitola 1.2.2.) je průběh přežívání této bakterie přisuzován jiným faktorům, převážně nízkému pH, než teplotě uskladnění.

Největší význam pro růst a biochemickou činnost zkoumaných bakterií má pH fermentovaných výrobků. Koncentrace vodíkových iontů má vliv potlačení hlavní metabolické činnosti a zastavení růstu. Tato skutečnost je patrná z průběhu přežívání u vzorku **Polotovar při výrobě Revitalu**, který nebyl fermentován a pH prostředí se nesnížilo fermentací laktosy na kyselinu mléčnou. U tohoto vzorku došlo po ukončení adaptační LAG fáze k pozvolnému rozmnožení mikroorganismů, které bylo zpomaleno nízkou teplotou během skladování. U ostatních vzorků se projevilo působení nízkého pH na zastavení rozmnožovacího a růstového cyklu. Ukazuje se, že pH fermentovaných mléčných výrobků se pohybuje na okraji minimálních hodnot pro růst zkoumaných bakterií, proto dochází spíše pozvolnému úbytku buněk. Jak bylo již podotknuto, výjimku tvoří *Escherichia coli*, u které došlo k razantnímu úbytku, kdy během 14 dnů došlo k totálnímu usmrcení infiltrovaných

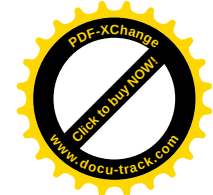
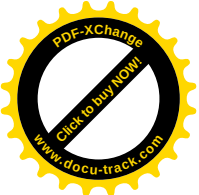


buněk. Tendence jednotlivých mikroorganismů vyrovnávat se vlivům prostředí je nejlépe vyjádřen grafickým znázorněním v kapitole 4. Podobný průběh přežívání se projevoval u všech druhů fermentovaných vzorků **Klasik** i **Revital**. Nejstabilněji se projevil *Enterococcus faecalis*. Ten po prvních 10 až 12 dnech úbytku buněk se dále projevoval relativně konstantním počtem po celou dobu skladování a na konci této doby byl počet jeho buněk oproti ostatním kontaminantům nejvyšší. *Staphylococcus aureus* projevoval během sledované doby výkyvy v počtu, nicméně můžeme sledovat vyrovnaný pokles počtu buněk v závislosti na době skladování.

Z výsledků této práce však není možné prokázat jednoznačné antagonistické vztahy mezi ušlechtilými a kontaminujícími kulturami. I při odlišném složení mléčných kultur u zkoumaných vzorků nebyly zaznamenány odlišnosti v charakteru růstových křivek. Jediným faktorem projevů antagonismu je tak tvorba kyseliny mléčné, neboť rychle vytvořená kyselina mléčná mění prostředí výrobku natolik, že se stává pro ostatní mikroorganismy nevhodným a dochází k jejich postupnému odumírání. Lze předpokládat, že pokud by dané kultury nebyly vyšlechtěny jako tzv. stop kultury a docházelo k dalšímu prokysání a snížení pH, byl by úbytek nevhodné mikroflóry výraznější. Současně by však docházelo ke změnám organoleptických i technologických vlastností výrobku. Ostatní vlastnosti mléčných bakterií nelze z výsledků této práce prokázat.

Součástí vyhodnocení výsledků bylo také subjektivní sledování sensorických změn (barva, vůně, celkový vzhled). Sledováním změn mělo být hodnoceno, zda je možné odhalit kontaminaci produktu vjemovými smysly a předejít tak jejich konzumaci. Hodnocení bylo prováděno subjektivním hodnocením dvou až tří osob. Během měření však nebyly pozorovány žádné změny ve sledovaných parametrech a nejsou proto uvedené v systému hodnocení.

Výsledky této práce mají zásadní charakter pro hodnocení bezpečnosti a zdravotní nezávadnosti fermentovaných mléčných výrobků. Rovněž poukazuje na možné důsledky špatné hygienické a výrobní praxe při jejich výrobě. Dojde-li ke kontaminaci hotového výrobku, mají schopnost tyto mikroorganismy se udržet v určitém počtu po celou dobu deklarovanou výrobcem jako doba spotřeby. Protože při jejich přítomnosti nedochází k výrazným sensorickým změnám, které by mohl spotřebitel odhalit, může jejich konzumace představovat vážné zdravotní riziko. Práce prokázala, že prostředí těchto výrobků oslabuje tvorbu produktů metabolismu, tím i tvorbu nebezpečných toxinů a dalších látek, a způsobuje odumírání kontaminující mikroflóry. Většina by tak nebyla schopna přežít průchod trávicím traktem a působením velmi nízkého pH žaludečních šťáv a alkalického pH žluči. Přesto tím



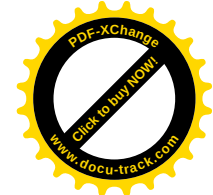
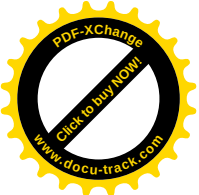
ale dochází k porušení zdravotní bezpečnosti potravin a vzniku zdravotních rizik. Přestože se fermentované mléčné výrobky považují za výrobky nepředstavující zdravotní rizika již z výše popsaných důvodů, při kontaminaci větším počtem patogenními či podmíněně patogenními mikroorganismy nedochází k rapidnímu omezení těchto rizik vlivem enviromentálních podmínek a přítomností delkarovaných kultur. V technologické praxi se můžeme setkat spíše s kontaminací fermentovaných výrobků kvasinkami, kdy kontaminujícím prvkem bývá spíše ovocná složka. Kontaminace bakteriemi však nesmí být podceněna a technologický postup by jí měl zabránit od počátku výroby až do finální spotřeby.

DISKUSE

Jogurty fermentované při 42 až 45 °C za 2,5 až 3,5 h s kyselostí 60 až 65 SH a s hodnotou pH < 4,5 jsou z mikrobiologického hlediska bezpečné produkty. Vysoká inkubační teplota, krátký inkubační čas a rychle vznikající kyselina mléčná nedovolují růst kontaminující mikroflóry, například koliformními bakteriemi. Mikroorganismy, které byly ve výchozím mléku, většinou přežívají, i když se nemnoží a nemetabolizují.

Míšené jogurty fermentované 16 až 18 h při 30 až 35 °C s pomalým kysáním už umožňují růst mezofilním i koliformním a jim podobným bakteriím. Jejich počet po dosažení maximální hodnoty působením nižších mastných kyselin, které vznikly v průběhu fermentace a jsou přítomné v málo ionizované formě, postupně klesá. Jejich obsah v jogurtech poukazuje na kontaminaci. Jejich nepřítomnost v starších jogurtech však není z výše uvedených důvodů důkazem že ke kontaminaci nedošlo. (Görner, F., Valík L', 2004).

Mezi základní enviromentální podmínky limitující růst mikroorganismů v potravinách patří obsah vody, obsah soli, pH, složení atmosféry, složení, teplota zpracování a skladování potravin. Aby byla zajištěna zdravotní nezávadnost, obchodní sterilita, upravují se potraviny tak, aby výsledné podmínky pro růst kontaminujících mikroorganismů byli nevhodné. U fermentovaných výrobků je zcela specifickou překážkou působení konkurenční mikroflóry. Snížením pH tvorbou kyselin, konkurencí při získávání živin, tvorbou peroxidů a bakteriocinů vytváří nepříznivé prostředí pro kontaminující mikroflóru a působí tak jako přirozený konzervant.(Šilhánková, 2002) Aby bylo možné sledovat tento faktor, bylo zapotřebí nejprve sledovat za jakých podmínek a po jakou dobu jsou tyto ušlechtilé mikroorganismy schopny udržet svým metabolismem a počtem přirozenou bariéru kontaminace a následně pak sledovat tyto faktory v závislosti na počtu a schopnostech přežívání kontaminujících činitelů. Proto



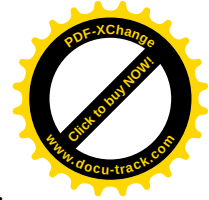
tato práce řeší nejprve problematiku přežívání rodu *Lactobacillus* v různých produktech připravených procesem mléčné fermentace a následně se zabývá schopnostmi *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* a *Listeria grayi* vydržet ve vybraných produktech, růst a rozmnožovat se za skladovacích podmínek určených výrobcí těchto produktů.

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou bakterie mléčné fermentace patřící do čeledi *Lactobacillaceae*. Pro schopnost fermentovat sacharidy, hlavně laktózu, na kyseliny a jiné produkty fermentace jsou hojně využívány v potravinářském průmyslu při technologickém zpracování a výrobě potravin. V mlékárenském průmyslu jsou nezbytnou součástí zakysaných mléčných výrobků jako jsou jogurtové výrobky, zakysaná mléka, zakysané smetany a ostatní, tak i při výrobě sýrů a dalších. (Březina, 2001) Jejich přítomnost je mnohdy dána i ze zákona (Vyhláška 77/2003 Sb.).

V současné době jsou tyto bakterie označovány za probiotické organismy, tj. že mají kromě senzorických a jakostních vlastností v potravinách také významný vliv na zdravotní stav lidského organismu a jsou zdraví prospěšné. Jejich schopnost uchytit se v lidském organismu v živém stavu je podmíněna požitím dostatečně velkého množství těchto bakterií. Jako minimální počet je uváděn 10^6 v 1ml výrobku. V hygienickém kontextu pak vytváří nepříznivé podmínky pro kontaminaci produktu. (Čurda, 2004)

V důsledku rozsáhlých preventivních opatření od chovu hospodářských zvířat, dojení, až po konečné technologické zpracování je ale kontaminace hygienicky nežádoucích mikroorganismů téměř eliminována. Přesto není možné zcela zabránit záměrné kontaminaci či kontaminaci samotným spotřebitelem nebo prodejcem při nedodržení hygienických či skladovacích podmínek. Mléko a mléčné výrobky jsou totiž bohatým zdrojem živin, tudíž ideálním prostředím pro rozmnožování mikroorganismů a možnosti vzniku alimentárních onemocnění, přinejmenším pro vznik technologických a senzorických vad. (Cupáková, 2001) V důsledku kontaminace mohou u fermentovaných výrobků vznikat bublinky plynu, trhlínky ve hmotě, táhlovitost, nečistá kvasničná až nahořklá chuť, ztráta aroma. Nejčastějšími a nejzávažnějšími kontaminanty mléka jako výchozí suroviny jsou *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*. U mléčných výrobků se pak přidávají také *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus* a *Citrobacter*. (Burdová 2001)

Práce ukázala, že environmentální podmínky fermentovaných mléčných výrobků jsou pro rozmnožování hygienicky nežádoucí mikroflóry opravdu nevhodné, protože dochází k trvalému úbytku buněk. Nejsou proto ani potravinou, která by se mohla stát předmětem



bioteroristických útoků nebo účelových kontaminací. Nicméně infekční mikroflóra je schopna se udržet v určitém počtu po celou dobu spotřeby, dokonce i déle. Tím vytváří rizika spojená hlavně se zdravotními důsledky při konzumaci těchto výrobků. Je proto velice důležité dodržení správné hygienické praxe při výrobě, distribuci i konzumaci těchto potravin. Nelze se tedy opírat o obecná tvrzení předpokládající jejich bezpečnost ani o limitní rozpětí faktorů ovlivňujících růst mikroorganismů, neboť se uvedené údaje u mnohých autorů liší.

Na tuto práci může navazovat studie prokazující biochemické změny v přítomnosti kontaminující mikroflóry nebo stejná studie zaměřená na další bakteriální či jiné druhy.

ZÁVĚR

Práce byla zaměřena na řešení problému přežívání bakterií v mléčných produktech připravených procesem mléčné fermentace a skladovaných za různých podmínek. Zjištěné skutečnosti měli ukázat:

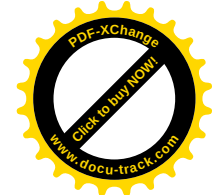
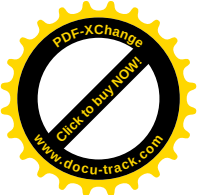
- a) trvanlivost produktu a přítomnost deklarovaných bakterií, obvykle s přívlastkem jejich léčebných schopností, bez ztráty na kvalitě produktu,
- b) v druhé fázi pokusu, pak přežívání relativně patogenních bakterií, které by se mohly, ať již v průběhu technologické přípravy produktu nebo úmyslným infikováním dostat do potravin.

Problematika se soustředila na případné antagonistické vztahy mezi bakteriemi mléčného kysání a jinými druhy mikroorganismů těsně příbuzné bakteriím jako *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* a *Escherichia coli* O 157, které jsou jednak rodově identické a druhově se nepatrně liší od vybraných sledovaných druhů použitých v pokusech k vůli větší bezpečnosti tj. *Listeria grayi* (*Listeria monocytogenes*) a *Escherichia coli* (*Escherichia coli* O 157 event. *Salmonella spp.*) a dále *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus*.

Vedle výše zmíněného cíle měla práce prokázat vliv prostředí – teploty (různé podmínky skladování) u fermentovaných mléčných produktů po případné, záměrné kontaminaci patogenní mikroflórou - zneužití výrobku biologickým terorismem.

Z výsledků a naměřených hodnot vyplývá, že uvedené mikroorganismy při kontaminaci a skladování za standardních podmínek mají v produktu schopnost udržet se v určitém počtu i po skončení doby spotřeby a představují tak pro spotřebitele zdravotní riziko.

U všech vzorků se u zkoumaných mikroorganismů nejprve projevil prudký úbytek přítomných bakterií. Ten je patrně zapříčiněn adaptací zmíněných bakterií na prostředí a účinkem tzv. chladového šoku, kdy byly zkoumané mikroorganismy během krátké doby



vystaveny skladovací teplotě 8°C. Kromě *Escherichia coli* docházelo během skladování k pomalému úbytku přítomných buněk a u vzorku **Polotovar při výrobě Revitalu** došlo zhruba po 14 dnech u všech k nárůstu počtu.

Působení nízkého pH mělo vliv na zastavení rozmnožovacího a růstového cyklu. Ukazuje se, že pH fermentovaných mléčných výrobků se pohybuje na okraji minimálních hodnot pro růst zkoumaných bakterií, proto dochází spíše pozvolnému úbytku buněk. Výjimku tvoří opět *Escherichia coli*, kdy během 14 dnů došlo k totálnímu usmrcení infiltrovaných buněk. Nejstabilněji se projevil *Enterococcus faecalis*. Ten po prvních 10 až 12 dnech úbytku buněk se dále projevoval relativně konstantním počtem po celou dobu skladování a na konci této doby byl počet jeho buněk oproti ostatním kontaminantům nejvyšší. *Staphylococcus aureus* projevoval během sledované doby výkyvy v počtu, nicméně můžeme sledovat vyrovnaný pokles počtu buněk v závislosti na době skladování.

Antagonistické vztahy v této práci nebylo možné prokázat u bakterií *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* a *Listeria grayi* mezi ušlechtilými a kontaminujícími kulturami. Prokazatelný rychlý úbytek kontaminovaného produktu byl možný pozorovat pouze u bakterie *Escherichia coli*.

Při vytváření pokusného modelu kontaminace je nutné zdůraznit, že tento byl vytvořen jako záměrný infekční, který by patrně při běžné kontaminaci vznikající v průběhu běžného technologického provozu nevznikl. Bylo by zajímavé pokus opakovat při záměrné infekci prahovými hodnotami (řádově 10 – 100 mikroorganismů), kde taková možnost infekce produktu je daleko reálnější. Také rozšíření výsledků o další mléčné kontaminanty by bylo přínosné pro výrobní, technologickou i vědeckou činnost.

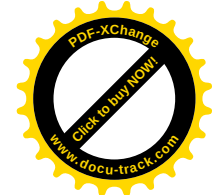
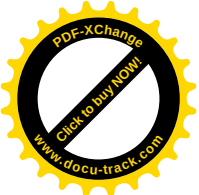


SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Alm L: Effect of fermentation on lactose, glucose and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. J Dairy Sci 1982; 65: str. 346-352
- [2] Aroutcheva A., Gariti D., Simon M., Shott S., Faro J., Simoes J.A., Gurguis A., Faro S.: Defense factors of vaginal lactobacilli. Am J Obstet Gynecol 2001;185:375-9
- [3] Bat, C., Escherichia coli, Department of Food Science, Cornell University, USA,1999
dostupný z <<http://www.apresslp.gvpi.net/apfromicro/lpext.dll/fmicro/a0530-lnk>>
[citace 2004-11-03]
- [4] Bat, C., Listeria, Department of Food Science, Cornell University, USA,1999
dostupný z <<http://www.apresslp.gvpi.net/apfromicro/lpext.dll/fmicro/a0940-lnk>>
[citace 2004-11-03]
- [5] Bat, C., Enterococcus, Department of Food Science, Cornell University, USA,1999
dostupný z <<http://www.w3.org/TR/REC.htm> > [citace 2004-11-12]
- [6] Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J., Lékařská mikrobiologie, Marvil, 1999 (dotisk 2004)
- [7] Breed, R. S. E., Murray, G. D., Smith, N. R., Bergey ´s Manual of determinative Bacteriology, Seventh edition: Baltimore, The Williams & Wilkins, 1957
- [8] Březina, P., Plocková, M., Návodů pro laboratorní cvičení z mikrobiologie mléka a tuků, 1. vyd. Praha: SNTL, 1986, 85-857-86
- [9] Březina,P., Komár,A.,Hrabě,J., Technologie,zbožíznalství a hygiena potravin II.část, Vyškov 2001, ISBN 80-7231-079-5
- [10] Burdová,O.,Lauková,A., Zdravotná neškodnost' mlieka a mliečných výrobkov. Mliekarstvo březen 2001, r. 32 č.1, s.22-24
- [11] Cupáková, Š., Jantošová, B., Navrátilová, P.,Necidová, L, Rizika konzumace syrového mléka. Veterinářství 51, 2001, str. 182-184
- [12] Čurda L.,Holubová J., Rudolfová J., Němečková I., Stabilita galaktooligosacharidů ve fermentovaných mléčných výrobcích a jejich vliv na probiotické kultury
dostupný z <<http://www.danone/institut.cz/files/2004.3>> [citace 2005-05-03]



- [13] Doležálek, J., Mikrobiologie mlékárenského a tukařského průmyslu, 1. vyd. Praha: SNTL, 1962, 04-828-62
- [14] Gajdůšek, S., Mlékařství II, 1.vyd.,Brno 1998, ISBN 80-7157-342-6
- [15] Görner, F., Valík L', Aplikovaná mikrobiológia požívateľín, Malé centrum, 2004
- [16] Grossmann, M., Mikrobiologie v hygieně, 1. vyd. Vyškov: VVS PV, 1999
- [17] Halamíčková, A., Obecná mikrobiologie, 1.vyd. Vyškov: VVS PV, 1992
- [18] Holt, John G., Bergey's Manual of determinative bacteriology, 9th ed., Baltimore, Maryland 21202 USA, 1993, ISBN 0-683-00603-7
- [19] Martin, S., Staphylococcus, Department of Food Science, University of Illinois, USA, 1999
dostupný z <<http://www.apresslp.gvpi.net/apfromicro/lpext.dll/fmicro/a01490-lnk>>
[citace 2004-11-03]
- [20] Pavelka, A., Mléčné výrobky pro vaše zdraví, 1. vyd. Brno: Littera, 1996, ISBN 80-85763-09-5
- [21] Petráš, P., Aktuality v taxonomii rodu Staphylococcus, Zprávy CEM(SZÚ), Praha, 2004, s. 297-300
- [22] Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont F., Jacquet, C., Piffaretti, J.C., Assignment of *Listeria garyi* and *Listeria murrayi* to a single species. International Journal of Systematic Bacteriology, 1992, 42, s.171-174
- [23] Šilhánková, L., Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology, 3.vyd., Praha 2002, ISBN 80-200-1024-6
- [24] Stránký, S., Vrese, de M., Sieber, R., Fermentované mléčné výrobky ve výživě osob s laktózovou intolerancí
dostupný z <<http://www.tigis.cz/dmev/DMEV100/09Strans2.htm>>
[citace 2003-03-05]
- [25] Štěpánková, M., Augustín, J., Baktérie mliečnej fermentácie. Súčasný stav a perspektívy využitia jako štarovacích kultur, Biologické listy, březen 2001, č. 66, s. 221-240
- [26] Vodrážka, Z., Biochemie, 1.vyd. soubor, Praha, 2002, ISBN 80-200-0438-6



- [27] Welschimer, H.J., Meredith, A., *Listeria murrayi* sp. n.: nitrate-reducing mannitol fermenting *Listeria*., International Journal of Systematic Bacteriology, 1971, 21, s.3-7
- [28] Wright, von A., Kneifel, W., Probiotic bacteria-detection and estimation in fermented and non-fermented dairy product, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Kurio, Finland 1999
dostupný z <<http://www.apresslp.gvpi.net/apfromicro/lpext.dll/fmicro/a01490-lnk>>
[citace 2004-11-03]
- [29] Žižka, B. , Mikrobiologie pro 3. ročník SPŠ mlékárenské, 2. vyd. Praha: SNTL, 1980 04-801-80
- [30] <http://www.activia.cz/mono_2.htm> [citace 2003-03-05], Střevní mikroflóra a její charakteristika.

necitované zdroje

- [31] <<http://www.czech-tv.cz/porady/pod-poklickou/potraviny/jogurty.htm>>
- [32] <<http://www.khsova.cz/ztisku/gen001.htm>>
- [33] <<http://www.danone-institut.cz/files/valentova.htm>>



SEZNAM TABULEK

Tabulka I Biochemické odlišnosti druhů rodu *Escherichia*

Tabulka č.II- Stav rodu *enterococcus* v roce 1997

Tabulka č.III- Počet bakterií rodu *Lactobacillus* v 1g výrobku skladovaných při teplotě 23°C

Tabulka č.IV - Počet bakterií rodu *Lactobacillus* v 1g výrobku skladovaných při teplotě 5°C

Tabulka č.V- Počet bakterií rodu *Lactobacillus* v 1g výrobku skladovaných při teplotě -38°C

Tabulka č.VI - pH jednotlivých výrobků skladovaných při teplotě 23°C

Tabulka č.VII - pH jednotlivých výrobků skladovaných při teplotě 5°C

Tabulka č.VIII - pH jednotlivých výrobků skladovaných při teplotě -38°C

Tabulka č.IX- Přežívání *Enterococcus faecalis* ve vybraných vzorcích

Tabulka č.X- Přežívání *Listeria grayi* ve vybraných vzorcích

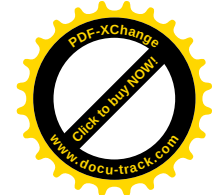
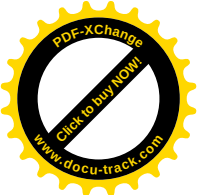
Tabulka č.XI- Přežívání *Escherischia coli* ve vybraných vzorcích

Tabulka č.XII- Přežívání *Staphylococcus aureus* ve vybraných vzorcích

Tabulka č.XIII – Přežívání vybraných mikroorganismů ve vzorku klasik

Tabulka č.XIV – Přežívání vybraných mikroorganismů ve vzorku Revital

Tabulka č. XV- Přežívání vybraných mikroorganismů ve vzorku Polotovar při výrobě Revitalu



SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č.I: Druhy rodu *Staphylococcus*

Příloha č.II: Odlišnosti *Enterococcus faecium* (*E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, and *E. mundtii*), *Enterococcus avium* (*E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. malodoratus* and *E. raffinosus*), *Enterococcus gallinarum* (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus* and *E. flavescens*) a *Enterococcus cecorum* (*E. cecorum* and *E. columbae*) (Devriese, 1993)

Příloha č.III- Spojnice trendů přežívání vybraných bakterií ve vzorku Klasik

Příloha č.IV- Spojnice trendů přežívání vybraných bakterií ve vzorku Revital

Příloha č.V- Spojnice trendů přežívání vybraných bakterií ve vzorku Polotovar

PŘÍLOHY

Příloha č.I: Druhy rodu *Staphylococcus*

STAPHYLOCOCCUS	KOA	HOSTITEL,ZDROJ		Popis	
S. aureus subsp. Aureus	K+	člověk	zvíře,prostředí	1884	Rosenbach
S.epidermis		člověk	zvíře,prostředí	1916	Evans
S.saprophyticus subsp.saprophytycus		člověk		1951	Shaw
S.capitis subsp.capitis		člověk		1975	Kloos
S.cohnii subsp.cohnii		člověk		1975	Schleifer
S.haemolyticus		člověk	zvíře,prostředí	1975	Schleifer
S.hominis subsp.hominis		člověk		1975	Kloos
S.simulans		člověk		1975	Kloos
S.warneri		člověk		1975	Kloos
S.xylosus		člověk	prostředí	1975	Schleifer
S.intermedius	K+	člověk	zvíře,prostředí	1976	Hájek
S.sciuri subsp.sciuri			zvíře,prostředí	1976	Kloos
S.hyiccus	K+		zvíře,potraviny	1978	Devriese
S.carnosus subsp.carnosus		člověk	uzenina	1982	Schleifer
S.aurilaris				1983	Kloos
S.caprae		člověk	kozí mléko	1983	Devriese
S.gallinarum		člověk	drůbež	1983	Devriese
S.lentus			zvíře	1983	Schleifer
S.saccharolyticus	an			1984	Klipper-Balz
S.aflettae			koza,drůbež	1985	Schleifer
S.equorum subsp.equorum			kůň	1985	Schleifer
S.kloosii			divoká zvířata	1985	Schleifer
S.aureus subsp.anaerobius	K+an		ovce	1985	DeLaFuente
S.chromogenes			zvíře,mléko	1987	Hájek
S.lugdunensis		člověk		1988	Freney
S.schleiferi subsp.schleiferi		člověk		1988	Freney
S.delphini	K+		delfín	1988	Varaldo

[Pokračování - Druhy rodu *Staphylococcus*]

STAPHYLOCOCCUS	KOA	HOSTITEL,ZDROJ		Popis	
<i>S.captis</i> subsp.urealyticus		člověk		1991	Bannerman
<i>S.cohnii</i> subsp.urealyticus		člověk	zvíře	1991	Kloos
<i>S.muscae</i>			moucha, vepř	1992	Hájek
<i>S.piscifementans</i>			marinované ryby	1992	Tanasupawat
<i>S.pasteuri</i>		člověk	zvíře, potraviny	1993	Chesneau
<i>S.vitulinus</i>		člověk	zvíře, potraviny	1994	Webster
<i>S.saprophyticus</i> subsp.bovis			zvíře	1996	Hájek
<i>S.sciuri</i> subsp.carnaticus			masné výrobky	1997	Kloos
<i>S.sciuri</i> subsp.rodentium			hlodavci	1997	Kloos
<i>S.lutrae</i>	K+		vydra	1997	Foster
<i>S.succinus</i> subsp.succinus			jantar	1998	Lambert
<i>S.condimenti</i>			sojová omáčka	1998	Probst
<i>S.carnosus</i> subsp.utilis			potraviny	1998	Probst
<i>S.hominis</i> subsp.novobiosepticus		člověk		1998	Kloos
<i>S.fleurettii</i>			sýr z kozího mléka	2000	Vernozy-Rozand
<i>S.succinus</i> subsp.casei			zrající sýr	2003	Place
<i>S.equorum</i> subsp.linens			zrající sýr	2003	Place
<i>S.nepalensis</i>			kozy v Himalájích	2003	Spergser
<i>S.felis</i>			kočka	1989	Igimi
<i>S.schleiferi</i> subsp. Coagulans	K+		pes	1990	Igimi

POZN.: K+ - koaguláza pozitivní
an- anaerobní

Příloha č.II: Odlišnosti *Enterococcus faecium* (*E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, and *E. mundtii*), *Enterococcus avium* (*E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. malodoratus* and *E. raffinosus*), *Enterococcus gallinarum* (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus* and *E. flavescens*) a *Enterococcus cecorum* (*E. cecorum* and *E. columbae*) (Devriese, 1993)

	<i>Enterococcus</i>							
<i>Test</i>	<i>faecalis</i>	<i>faecium</i>	<i>avium</i>	<i>gallinarum</i>	<i>cecorum</i>	<i>sulfureus</i>	<i>saccharolyticus</i>	<i>dispar</i>
Pohyblivost	–	–	–	+	–	–	–	–
D antigen	+	+	D+	+	–	–	–	–
APPA	–	–	+	–	–	?	?	?
PYRA	+	+	+	+	–	+	–	+
Alkaline phosphatase	–	–	–	–	D+	–	–	–
α-Galactosidase	–	D	D	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	+	+	–	+	–	–	–	+
Produkce kyselin z:								
<i>Adonitol</i>	–	–	+	–	–	–	–	–
<i>L-Arabinosa</i>	–	D	D+	+	D	–	–	–
<i>D-Arabitol</i>	–	–	+	–	D	–	+	–
<i>L-Arabitol</i>	–	–	D	–	–	–	–	–
<i>D-Cyclodextrin</i>	+	D+	D–	D	+	?	?	?
<i>Dulcitol</i>	–	–	D	–	–	–	–	–
<i>Gluconate</i>	D+	D	D+	D	+	+	–	–
<i>Glycerol</i>	+	– ^a	D	D	–	–	–	+
<i>Inulin</i>	–	–(D–?)	–	+(D?)	+	–	+	–
<i>2-Ketogluconate</i>	D	–	+	–	D	+	+	+
<i>D-Lyxosa</i>	–	–	D	–	–	–	–	–
<i>Mannitol</i>	+	D	+	+	D	–	+	–
<i>Melezitose</i>	D+	–	D	D–	D	+	+	–
<i>Melibiose</i>	–	D	D	+	D	?	+	–
α-Methyl-D- glucoside	–	–	+	+	D	+	+	+
<i>D-Raffinosa</i>	–	D	D+	D	+	?	+	+
<i>Sorbitol</i>	D+	D–	+	D–	D	–	+	–

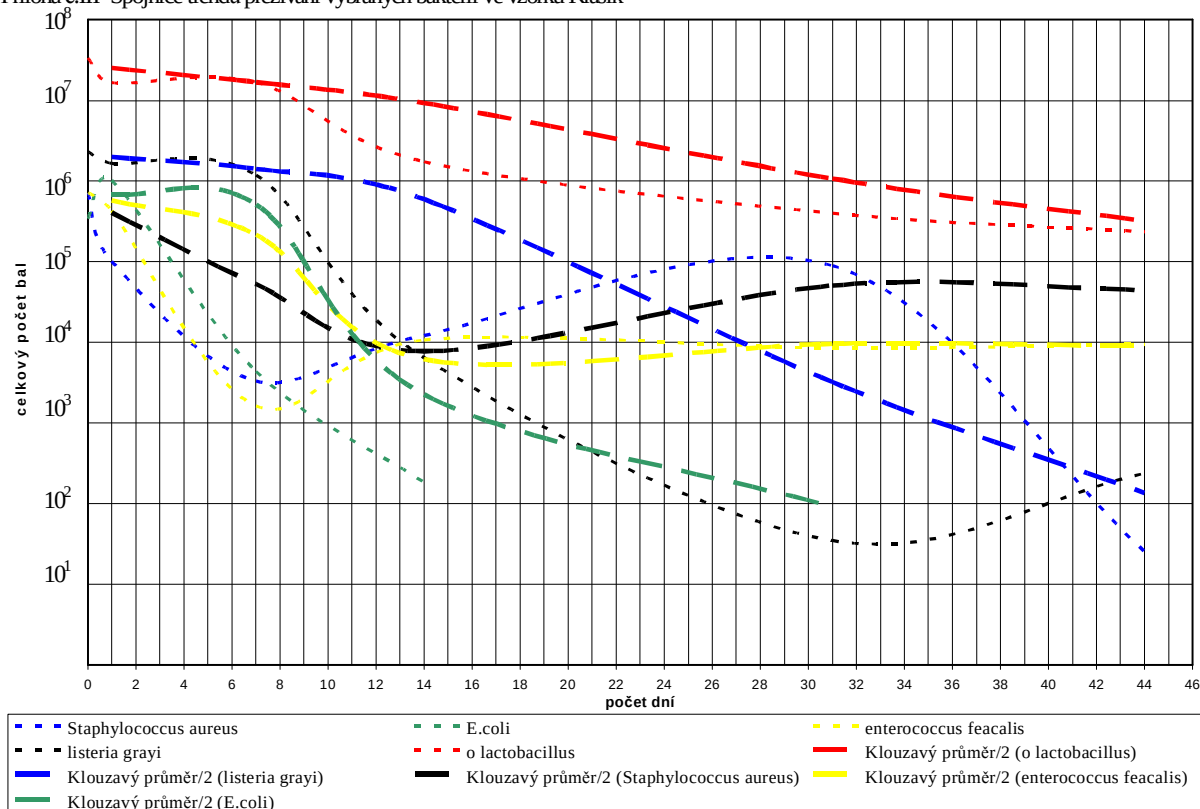


[Pokračování - Odlišnosti *Enterococcus faecium* (*E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, and *E. mundtii*), *Enterococcus avium* (*E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. malodoratus* and *E. raffinosus*), *Enterococcus gallinarum* (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus* and *E. flavescens*) a *Enterococcus cecorum* (*E. cecorum* and *E. columbae*) (Devriese, 1993)]

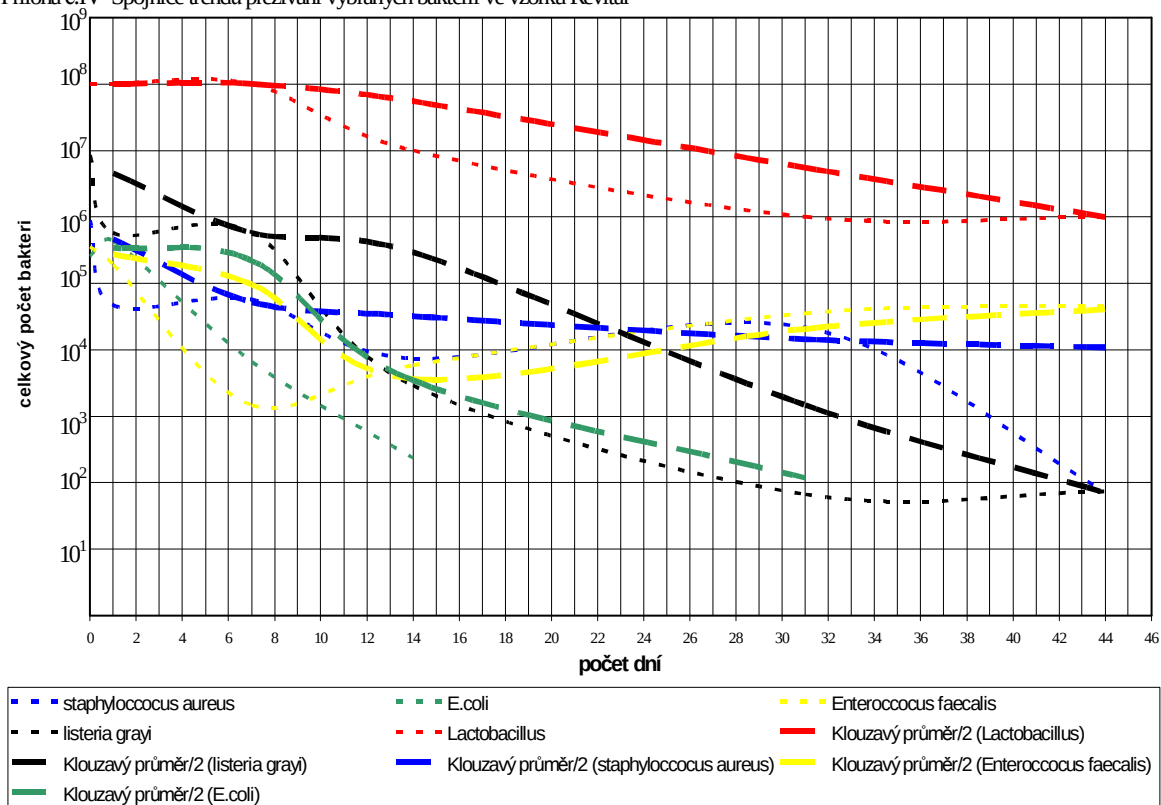
	<i>Enterococcus</i>							
Produkce kyselin z:	faecalis	faecium	avium	gallinarum	cecorum	sulfureus	saccharolyticus	dispar
L-Sorbosa	–	–	+	–	–	?	D–	–
Xylitol	–	–	D+	–	D–	–	–	–
D-Xylosa	D–	D	D–	+	D	–	–	–
Fermentace puryvátu	+	–	D	–	?	?	?	?

POZN.: D, variabilní; D+, obvykle pozitivní; D–, obvykle negativní; APPA, alanyl-phenylalanyl-prolinarylamidasa, PYRA, pyrolidonylarylamidasa.

Příloha č.III- Spojnice trendů přežívání vybraných bakterií ve vzorku Klasik



Příloha č.IV- Spojnice trendů přežívání vybraných bakterií ve vzorku Revital



Příloha č.IV- Spojnice trendů přežívání vybraných bakterií ve vzorku Revital

