

Mikrobiální jakost hermeticky uzavřených dlouhodobě skladovaných tavených sýrů

Pavel Pleva Dis.

Bakalářská práce
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Pavel PLEVA**

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

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Mikrobiologická jakost hermeticky uzavřených
dlouhodobě skladovaných tavených sýrů**

Zásady pro vypracování:

1. V teoretické části zpracujte literární rešerši týkající se charakteristiky tavených sýrů.
2. Popište výskyt mikroorganismů v tavených sýrech. Zaměřte se na mikroorganismy, které mohou delší dobu přežívat v hermeticky uzavřených obalech.
3. V praktické části proveďte stanovení počtů vybraných skupin mikroorganismů v hermeticky uzavřených tavených sýrech. Dostupnými metodami se pokuste tyto mikroorganismy blíže charakterizovat, popř. identifikovat.
4. Na základě teoretické části a výsledků praktické části formulujte závěry o mikroorganizmech izolovaných z hermeticky uzavřených, dlouhodobě skladovaných tavených sýrech.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

GÖRNER F. a VALÍK L.: Aplikovaná mikrobiologie požívání, Malé centrum 2004.

ICMSF: Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities, 2nd ed., Springer, 2005.

HARRIGAN W.F., Laboratory Methods in Food Microbiology. 3rd ed., Academic Press Ltd., London, 1998.

Schär W. and Bosset J.O. Chemical and physico-chemical changes in processed cheese and ready-made fondue during storage. A review. *Lebensm. Wiss. Technol.* 35: 15-20. 2002.

Muir D.D., Tamime A.Y., Shenana M.E. and Dawood A.H. Processed cheese analogues incorporating fat-substitutes. 1. Composition, microbiological quality and flavour changes during storage at 5°C. *Lebensm. Wiss. Technol.* 32: 41-49. 1999.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

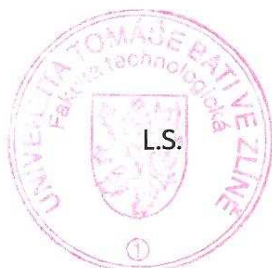
19. listopadu 2007

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2008

Ve Zlíně dne 12. května 2008

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Ve své práci jsem se zaměřil na sledování mikrobiální jakosti vybraných tavených sýrů. Vzorokly tavených sýrů byly hermeticky uzavřeny a dlouhodobě skladovány při různých teplotách. Ve vzorcích tavených sýrů byly sledovány zejména celkové počty mikroorganismů, sporulující mikroorganismy, potenciálně patogenní mikroorganismy a mikroorganismy, které mohou měnit technologické vlastnosti tavených sýrů. Stanovení byla provedena kulturačními metodami, specifickými pro dané skupiny mikroorganismů. Dále byly použity identifikační testy a metody pro vybrané druhy mikroorganismů se specifickými vlastnostmi.

ABSTRACT

The aim of my work is focused on a microbiology quality of model samples of processed cheese. The samples of processed cheese were long-time stored at different temperatures. All samples were hermetical. The microbiology analysis comprised determination of total number of microorganisms, spore-forming microorganisms, pathogenic microorganisms changing technological properties of processed cheese. The determinations were realised by cultivation methods, identification tests and by methods which are specific for characteristic microorganisms.

Sterilized processed cheese - Tavené sterilované sýry

Total number of misroorganisms - CPM - Celkové počty mikroorganismů

Poděkování

Děkuji tímto Mgr. Leoně Buňkové Ph.D. za trpělivost při vedení mé bakalářské práce a za to, že mi umožnila pracovat v mikrobiologické laboratoři Technologické fakulty.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci Mikrobiální jakost hermeticky uzavřených dlouhodobě skladovaných tavených sýrů, vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Leony Buňkové Ph.D., a uvedl v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje.

Pavel Pleva

.....

OBSAH

1	MIKROBIOLOGICKÉ ZKOUŠENÍ POŽIVATIN	9
1.1.1	Zásady odebrání vzorků	9
1.2	KULTIVAČNÍ VYŠETŘENÍ.....	9
1.2.1	Obecné zásady kultivace a vyjadřování výsledků	9
1.3	INAKTIVACE MIKROORGANISMŮ	10
1.4	KULTIVACE ZA ANAEROBNÍCH PODMÍNEK	10
1.5	JAKOSTNÍ ROZBOR	10
1.5.1	Cílený jakostní rozbor	10
1.5.2	Zjišťování počtu <i>Escherichia coli</i> a ostatních gram negativních tyčinek	11
1.5.3	Stanovení počtu enterokoků	11
1.5.4	Stanovení bakterií rodu <i>Proteus</i>	12
1.6	STANOVENÍ AEROBNÍCH SPOROTVORNÝCH MIKROORGANISMŮ	12
2	VZÁJEMNÉ BIOLOGICKÉ VZTAHY NĚKTERÝCH MIKROORGANISMŮ DŮLEŽITÝCH V MLÉKAŘSTVÍ	13
3	TAVENÉ SÝRY	14
3.1	PŘÍPRAVA SUROVINY PRO VÝROBU TAVENÝCH SÝRŮ	14
3.1.1	Fyzikálně – chemické principy výroby tavených sýrů.....	15
3.2	VÝROBA TAVENÝCH SÝRŮ.....	15
3.2.1	Příprava směsi pro tavení	15
3.2.2	Proces tavení	16
3.2.3	Chlazení a balení	16
3.2.4	Kontrola finálního výrobku	16
3.3	MIKROBIOLOGIE TAVENÝCH SÝRŮ.....	16
3.3.1	Sekundární vlivy na mikrobiologickou kvalitu tavených sýrů.....	17
4	CÍL PRÁCE	20
5	PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY	21
6	CHEMIKÁLIE A POMOCNÉ LÁTKY	22
7	CHARAKTERISTIKA ANALYZOVANÝCH VZORKŮ	23
8	KULTIVAČNÍ PŮDY A ŘEDÍCÍ ROZTOK	24
8.1	ODBĚR VZORKŮ.....	24
8.2	ŘEDĚNÍ.....	24
8.2.1	Postup při zpracování vzorku.....	25

8.3	TERMOSTATOVÁ ZKOUŠKA	25
8.4	STANOVENÍ CELKOVÉHO POČTU MIKROORGANISMŮ	26
8.5	STANOVENÍ POČTU KVASINEK A PLÍSNÍ	26
8.6	STANOVENÍ KOLIFORMNÍCH BAKTERIÍ	27
8.7	STANOVENÍ STAFYLOKOKŮ	28
8.8	STANOVENÍ ANAEROBNÍCH SPORULUJÍCÍCH BAKTERIÍ	28
8.9	FYZIOLOGICKÝ ROZTOK	29
8.10	SKUPINY ZJIŠŤOVANÝCH MIKROORGANISMŮ	29
9	OČKOVÁNÍ A KULTIVACE	30
9.1	STANOVENÍ CFU	30
9.2	IDENTIFIKACE IZOLOVANÝCH KOLONIÍ	30
9.2.1	Gramovo barvení	30
	Princip barvení podle Grama	30
	Postup barvení podle Grama	30
	Hodnocení barvení podle Grama	31
9.2.2	KOH test	31
9.2.3	Oxidázový test	31
9.2.4	Oxidačně–fermentační test (OF test)	31
	Postup přípravy OF testu	32
	Hodnocení OF testu	32
9.2.5	ENTERO test	33
10	VÝSLEDKY A DISKUSE	34
11	ZÁVĚR	37
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	38
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	40
	SEZNAM PŘÍLOH	41

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MIKROBIOLOGICKÉ ZKOUŠENÍ POŽIVATIN

Mikrobiologické zkoušení potravin se provádí stanovením dle normy ČSN 560100. „Tato norma stanoví způsoby vzorkování a metody mikrobiologického zkoušení“ [11].

Touto normou se řídíme při hodnocení mikrobiologické kvality tavených sýrů, mikrobiologické kvality prostředí při výrobě, provozních zařízení. Norma obsahuje ustanovení společná pro vzorkování k mikrobiologickému vyšetření a mikrobiologickému zkoušení [11].

1.1.1 Zásady odebírání vzorků

„Počet vzorků musí vystihovat složení celé vyšetřované partie tak, aby bylo možno posoudit nejen povahu, ale i stupeň a rozsah mikrobiálního znečištění“ [11]. Vzorky musí řádně značeny, aby nedocházelo k záměně. Při odběru vzorků se zohledňuje povaha vyšetřované potraviny, způsob výrobního procesu, plnění a balení a způsob přepravování a uchovávání [11,13].

Při vyšetřování partie z kontinuálních výrobních linek, musí být vyloučena možnost sekundární kontaminace výrobků. Vzorek se odebírá bez ohledu na počet vyráběných jednotek nejméně po dvou kusech [11].

1.2 Kultivační vyšetření

1.2.1 Obecné zásady kultivace a vyjadřování výsledků

Detekce patogenních mikroorganismů musí být prováděna tak, aby jejich přítomnost byla spolehlivě vyloučena. Proto je důležité vzorky co nejdokonaleji homogenizovat. Kromě přímé kultivace na selektivně diagnostické půdy se vzorky musí pomnožit v neselektivní půdě a rozizolovat křížovým roztěrem na vhodnou pevnou půdu. Při zjištění přítomnosti podmíněně patogenních mikroorganismů, nebo mikroorganismů které indikují změny hygienických vlastností potravin, je nutné stanovovat jejich počty v CFU/ml. Proto se vždy kultivuje přesně odvážené nebo odměřené množství vzorku a vzorek se vždy dokonale zhomogenizuje [11,12].

1.3 Inaktivace mikroorganismů

Při inaktivaci vyšší teplotou musíme mít na zřeteli, že se neničí jen nesporulující mikroorganismy, ale také vegetativní formy sporulujících mikroorganismů. Při kultivaci inaktivovaných vzorků se zjišťuje počet spor. Zahřátí vzorků 80°C po dobu 15 min snižuje podstatně záchytnost většiny sporotvorných mikroorganismů. Odolnost vegetativních buněk i spor vůči teplotě je ovlivňována povahou a složením prostředí. Vysoký účinek ochrany vykazují bílkoviny a některé ionty a tedy zvyšují termorezistenci mikroorganismů. Inaktivuje se zásadně nejnižší ředění dobře homogenizovaného vzorku, které se očkuje na předpokládaný počet zjišťovaných mikroorganismů [11].

Při nedostatečné homogenizaci se mikroorganismy nacházející se uvnitř potraviny úspěšně vyhnou inaktivaci a přežívají delší dobu vyšší teploty [11].

1.4 Kultivace za anaerobních podmínek

Identifikace mikroorganismů, pro něž je kyslík toxický, probíhá kultivací na agarových plotnách. Petriho misky se vloží do anaerostatu, ve kterém se vzduch nahradí směsí plynu CO₂ a N₂. Tento plyn vytlačí z prostředí kyslík [11].

1.5 Jakostní rozbor

Vyšetření jakosti umožňuje posouzení z hlediska mikrobiálního i jakostního, skladovatelnosti, dodržení technologických postupů, dodržení zásad hygieny a sanitace při výrobě. Celkový počet mikroorganismů na neselektivních živných půdách MPA a PCA při 30°C u potravin s dlouhou dobou skladovatelnosti se zjišťuje zastoupení funkčních skupin, které jsou schopny měnit smyslové a jakostní vlastnosti výrobků. Dále se určuje počet kvasinek, plísní, počet koliformních mikroorganismů a *Escherichia coli* [11].

1.5.1 Cílený jakostní rozbor

Cíleným jakostním rozbohem se sleduje výskyt patogenních mikroorganismů, výskyt určitého mikrobiálního druhu a také se zjišťuje příslušný ukazatel nebo funkční skupina, jejíž přítomnost v potravine není přípustná. Sleduje se technologický postup z hlediska hygienické úrovně provozu [11].

1.5.2 Zjišťování počtu *Escherichia coli* a ostatních gram negativních tyčinek

Pokud zjišťujeme přítomnost gramnegativních tyčinek, tak se vzorek kultivuje na selektivně diagnostických půdách s laktózou a indikátorem. Identifikace kolonií probíhá dle znaků, a v případě potřeby se dále určují biochemicky. Tato metoda se používá k rozlišení zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*. Jako identifikované *Escherichia coli* se považují všechny kolonie o velikosti 2 – 3 mm okrouhlé s rovným okrajem, ploché s vroubkovaným okrajem, zrnité nebo matné. Kolonie *Escherichia coli*, které štěpí laktózu, jsou celé červené bez ohledu na to, zda mají kovový lesk. Podle typu půdy mohou kolonie štěpící laktózu mít i vzhled růžový s červeným centrem [11].

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* rostou v koloniích větších, okrouhlých s pravidelným okrajem, silně vypouklých, hladkých, velmi lesklých, hlenovitých a méně intenzivně červených [11].

Bakterie rodu *Klebsiella* vytvářejí velké, sklovité, bezbarvé až růžové, vazké kolonie. *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, kmeny *Proteus* které při 37°C netvoří povlaky jako i laktózu opožděně štěpící kmeny *Escherichia coli*, vytváří bezbarvé kolonie. Většina kmenů proteů vytváří při kultivaci 37°C průsvitné, plazivé kolonie. Kmeny rodu *Pseudomonas*, vytvářejí kolonie velké kolem 5 mm, s vroubkovaným nepravidelným okrajem, šedé s perleťovým leskem. Půdu ve svém okolí odbarvují do žlutozelené barvy. Zástupci rodu *Pseudomonas* se nejčastěji kultivují na krevním agaru. Půdy se inkubují při 37°C 24 hodin [11,17,18].

1.5.3 Stanovení počtu enterokoků

Metoda se používá pro zjištění potencionální možnost kontaminace střevního původu a k mikrobiologické kontrole technologických postupů. Pro toto stanovení jsou využívány především živné půdy M-Enterococcus agar, nebo agar podle Slanetz-Bartleyové. Naočkované živné půdy se kultivují při 37°C, 48 hodin. Enterokoky vytvářejí 2mm, růžové až hnědočervené kolonie, nejčastěji hladké, okrouhlé a lesklé. Tato půda je selektivní a jsou jí potlačovány streptokoky, mikrokoky i aerobní sporuláty. Některé málo zastoupené kmeny enterokoků na této půdě také nevyrostají a je tedy nutné počítat spíše s vyššími počty, než s těmi zjištěnými kultivací [11,18].

1.5.4 Stanovení bakterií rodu *Proteus*

Tento rod se často kultivuje na krevním agaru. Půda je inkubována při 22 – 24°C až 48 hodin. Všechny kmeny rodu *Proteus* za těchto podmínek vytvářejí velké, plazivé, bezbarvé kolonie. Tyto kolonie velice rychle porůstají celý agar. U tohoto rodu můžeme potlačit plazivý růst do ohraničených kolonií: zvýšením obsahu agaru o 5 %, Přelitím půdy 96 % ethanolem, který se nechá odpařit, přidáním 0,5 % sodné soli, nebo přidáním 1% chloralhydrátu [11].

1.6 Stanovení aerobních sporotvorných mikroorganismů

Aerobní sporotvorné bakterie se kultivují v aerobních podmínkách na PCA, MPA (což jsou pevné, neselektivní živné půdy), po usmrcení nesporelujících mikroorganismů zahřátím. Inaktivace probíhá při 70°C, 15 minut. Teplota kultivace je 33°C, doba kultivace je 40-48 hodin. Při stanovení termofilních aerobních sporulátů vzorek inaktivujeme při 95°C 15 minut. Doba trvání inkubace je 72 hodin, při teplotě 55°C. Toto stanovení poukazuje na stupeň kontaminace suroviny z vnějšího prostředí, dodržování hygienických standardů při výrobě. Metoda neprokazuje počet veškerých aerobních sporotvorných bakterií, neboť z tepelně opracovaných výrobků vyklíčí jen část živých spor a to úměrně intenzitou ošetření blízké letálním hodnotám pro spory. Tato metoda poměrně spolehlivě zachycuje rod *Bacillus* [11,12].

2 VZÁJEMNÉ BIOLOGICKÉ VZTAHY NĚKTERÝCH MIKROORGANISMŮ DŮLEŽITÝCH V MLÉKAŘSTVÍ

Mikroorganismy významné v mlékárenském průmyslu mohou žít ve vzájemných vztazích. Tyto vztahy můžeme rozdělit mezi symbiotické, antagonistické a sukcesivní. Výrazným symbiotickým vztahem ve skupině bakterií mléčného kvašení je symbióza bakterií ze skupiny streptokoků s tyčinkami mléčného kvašení (laktobacily). Uvnitř skupin bakterií mléčného kvašení existují také antagonistické vztahy. Například existují kmeny laktokoků mléčného kvašení, které dokáží vytvářet antibiotické látky. Doposud prakticky všechny inhibující kmeny byly identifikovány jako *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Antibiotické vlastnosti byly dokázány u kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Tyto kmeny produkují antibiotikum zvané nisin [1].

Ve vztazích bakterií mléčného kvašení k jiným mikroorganismům byly také zaznamenány četné případy symbiózy a antagonismu. Při výrobě ementálů, které je možno využít i na výrobu tavených sýrů, se využívá *Lactobacillus fermentum* a kvasinky *Candida kru-sei*, která prodlužuje trvanlivost tekutých kultur. Peptonizující bakterie dokáží svým proteolytickým účinkem zpřístupnit bakteriím mléčného kvašení dusíkatou výživu. Existují antagonistické vztahy některých bakterií se streptokoky a tyčinkami mléčného kvašení, na které působí filtrabilní a termostabilní látky, které byly produkovány bakteriemi máselného kvašení. Sukcesivní vztahy existují mezi bakteriemi mléčného kvašení a bakteriemi propionovými, torulami a plísněmi. Bakterie mléčného kvašení vytvářejí kyselinu mléčnou, která je ve formě laktátu zdrojem energie pro mikroorganismy, které jsou využívány při zrání některých tvrdých sýrů, a to pro propionové bakterie. Laktobacily svou slabě proteolytickou činností podporují rozvoj laktokoků, kterým poskytují snadno přístupné volné aminokyseliny. Některé streptokoky podporují rozvoj laktobacilů tím, že jejich proteolytické endoenzymy jsou uvolňovány z odumřelých buněk a zpřístupňují tak laktobacilům zdroje dusíkaté výživy. Podobný vztah je u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, které svou slabou proteolytickou aktivitou vytvářejí příznivé podmínky pro růst a množení *Leuconostoc dextranicum* a *Leuconostoc citrovorum* [1,2].

3 TAVENÉ SÝRY

Tavené sýry jsou vyráběny zahříváním různých směsí přírodních sýrů, s různým stupněm prozrání, s použitím tavicích solí, a to při změněném tlaku za stálého míchání. Cílem je dosáhnout homogenní hmoty o standardizovaných vlastnostech. V podmínkách České republiky definuje tavený sýr vyhláška Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb. v platném znění, (Vyhláška ze dne 6. 3. 2003, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky) [5].

3.1 Příprava suroviny pro výrobu tavených sýrů

Základná surovinou pro výrobu tavených sýrů jsou všechny druhy přírodních sýrů, především tvrdých, měkkých, bílých a tvarohu (který zvyšuje obsah tuku prosté sušiny). Ke standardizaci tuku tavených sýrů se používá máslo, smetana (která může výrobek vhodně a příjemně sensoricky zjemnit) různé tučnosti, případně zahuštěné plnotučné mléko. V současné době se velmi často nahrazuje základní surovina různými mléčnými koncentráty, např. sušenou syrovátkou, sušeným odstředěným mlékem, kaseinem a kaseináty. V České republice se pro výrobu tavených sýrů využívá Eidamská cihla, Eidamský blok, Moravská blok a Primátor. Nositelem výrazné chuti a vyrovnaného sýrového aroma jsou dobře vyžralé přírodní sýry [4]. Dále se přidává pitná voda, zejména pro úpravu obsahu sušiny a ochuzující přísady (uzená šunka, uzené hovězí maso, houby, zelenina, koření apod.). Nezbytnou součástí výroby tavených sýrů jsou tavicí soli. Ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti tavených sýrů [3].

Surovina pro tavené sýry se přijímá na základě hodnocení jakosti, na základě fyzikálně-chemických hodnot a sensorického posouzení. Připravené sýry pro výrobu tavených sýrů se skladují nejvhodněji při teplotách okolo 12°C, aby nedocházelo k zhoršení mikrobiologických, fyzikálně-chemických a sensorických vlastností. Všechny použité suroviny a přísady musí být zdravotně nezávadné a musí odpovídat příslušným jakostním normám. Důležitým ukazatelem kvality a skladby surovin je stupeň prozrání sýrů a jejich pH [4].

Tavené sýry dělíme z celé řady hledisek, ovšem nejdůležitějším hlediskem je obsah tuku v sušině. Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 77/2003Sb. (v platném znění) rozděluje tavené sýry na vysokotučné s 60% tuku v sušině a nízkotučné tavené sýry s 30% tuku v

sušině. V odborné literatuře lze najít dělení plnotučných tavených sýrů s 45 – 60 % tuku v sušině a polotučných sýrů s 30 – 45 % tuku v sušině [5].

U výrobků označených jako tavené sýry vyhláška omezuje obsah laktózy, sacharidů se sladícím účinkem a ostatních zdravotně nezávadných surovin a stanovuje jejich přípustné limity. Vyhláška definuje také tzv. tavené sýrové výrobky s 51 % hmotnosti sušiny získané původem ze sýru [5].

3.1.1 Fyzikálně – chemické principy výroby tavených sýrů

Největší podíl v přírodních sýrech tvoří proteiny, mléčný tuk, voda, soli, kyseliny, zbytky laktózy. Pro dosažení jemné a homogenní struktury bez separace vody, tuku a proteinů je nutná přítomnost látek s emulgující schopností. Tyto látky se při výrobě tavených sýrů přidávají ve formě tzv. tavicích solí, jejichž základní vlastností je schopnost odštěpit vápník navázaný na kasein. Vápník se po přidání tavicích solí vymění za sodík [19].

Jako tavicí soli se v praxi používají soli s vícesytnými anionty (především fosfáty, polyfosfáty, v menší míře citráty) s monovalentními alkalickými kovy (zejména sodíkem) [3]. Ve skutečnosti to jsou zejména povrchově aktivní látky [19].

3.2 Výroba tavených sýrů

Výroba tavených sýrů probíhá nejčastěji diskontinuálně nebo kontinuálně, přičemž u nás je stále nejvíce rozšířen diskontinuální způsob výroby [3].

3.2.1 Příprava směsi pro tavení

Složení tavicích směsí záleží především na požadavcích na výsledný produkt. Důležitou roli zde hraje především obsah sušiny a tuku v sušině. Základní surovinou pro tavení jsou tvrdé sýry (očistěné, upravené podle hygienických, technických nebo technologických požadavků). K surovině se přidá máslo, tvaroh, přísady a přesně navážené množství tavicích solí. Směs tavicích solí tvoří obvykle 2 – 3 % hmotnosti suroviny. Množství závisí především na stupni prozrání suroviny, na druhu suroviny a jejím pH. Při špatném dávkování fosfátových tavicích solí může dojít k hořknutí sýrů [3].

3.2.2 Proces tavení

Tavení probíhá u diskontinuálního způsobu v tavicím kotli. Ohřev je prováděn přímým vstříkem páry do tavené směsi. Množství páry činí 5 až 10 %. Nejvyšší dávka citrátových a fosfátových solí smí činit 3,5 %, přičemž přídavek polyfosfátových solí smí činit nejvýše 3 % ve finálním výrobku. Příslušnou dávku určuje jakostní norma výrobku. Ohřev se provádí při 0,05 až 0,04 MPa. Při dosažení teploty 85 - 95°C se zastaví přívod páry a tavenina se promíchává. Celková doba tavení se pohybuje v rozmezí 10 – 15 minut [4].

K vysokotepelemu tavení dochází při teplotách 100 - 120°C. Během tavení je sledována křivka teploty v závislosti na čase. Hotová tavenina musí být hladká, lesklá, nesmí uvolňovat tuk, nesmí být písčítá, nesmí se trhat na míchadle a odlupovat od stěny kotle. Pro dosažení konzistence je možno přidat k surovině 1 – 12 % předchozí vyrobené taveniny. Po utavení se stanovuje sušina, obsah tuku v sušině, pH a na základě zjištěných výsledků se upraví technologie výroby a dávka tavicích solí. [4]

3.2.3 Chlazení a balení

Při přepravě taveniny je nutné zamezit její reinfekci. Teplota při formování a balení taveniny nemá klesnout pod 65 – 70°C. Tavené sýry se formují a balí do hliníkové fólie, z vnitřní strany lakované, do kelímků nebo kutizinových střev. Chlazení může probíhat třístupňově, v tunelu (vzduch, voda, solanka nebo přímý odpar). Zabalený tavený sýr se skladuje při 4 až 8°C. [4]

3.2.4 Kontrola finálního výrobku

U finálního výrobku se provede stanovení sušiny, tuku, titrační kyselost (SH) nebo pH, smyslové (senzorické) posouzení. Provede se termostatová zkouška při 37°C po dobu 72 hodin [4]. Tato zkouška zjišťuje přítomnost nežádoucí sporulujících mikroorganismů. Fyzikální vlastnosti se posuzují na základě konzistence a struktury. Použitím sterilačního režimu se zvyšuje tuhost výrobku, u takto ošetřených sýrů by nemělo docházet k mikrobiálním změnám během skladování [4].

3.3 Mikrobiologie tavených sýrů

Tavený sýr je výrobek získaný zahříváním jednotlivých druhů sýrů nebo směsí přírodních sýrů v tavicí soupravě s přísadou tavicích solí (emulgátorů). Tavení probíhá při sniže-

ném tlaku a se záhřevem přibližně 85°C asi 5 minut, to znamená že tavení je možno brát jako jistý druh pasterace sýra. Teplota záhřevu se řídí vlastnostmi sýra. Tavené sýry mohou být tuhé, aby se daly dobře krájet, nebo roztíratelné. Trvanlivost a jakost tavených sýrů závisí z hygienického hlediska převážně na mikrobiologické hodnotě použité suroviny, na mikrobiologické čistotě během výroby, a na jakosti obalů a způsobu skladování. Z hlediska mikrobiologického je největším nebezpečím tavených sýrů přítomnost patogenních mikroorganismů, a hlavně nebezpečí sporulujících tyčinek rodů *Bacillus* a *Clostridium* [1].

Některé technologie výroby se snaží omezit vliv sporulujících mikroorganismů v tavených sýrech přidávkem bakterií mléčného kvašení tvořících antibiotika. Příkladem mohou být bakterie produkující nisin, potlačující růst bakterií rodu *Clostridium*. Výsledky však prozatím nejsou vždy uspokojivé. Lepších výsledků se dá dosáhnout přidáním nisinu přímo k surovině. Surovina použitá k výrobě tavených sýrů bývá velice často z mikrobiologického hlediska nevyhovující, může mít vysoký obsah sporulujících mikroorganismů a bakterií rodu *Escherichia*. Bakterie skupiny *Escherichia* tavící teplota 85°C ničí, kdežto zástupci čeledi *Bacillus* záhřev mohou přežívat [1].

Zvláště nebezpečné jsou sporulující mikroorganismy druhů *Clostridium butyricum*, *C. tyrobutyricum*, které jsou původci nadouvání sýrů, *C. sporogenes* a *C. lentoputrescens*, které způsobují bílou hnilobu sýrů. *Bacillus subtilis*, *B. brevis* a *B. cereus* var *mycoides* jsou nebezpečné hlavně tvorbou hořké chuti u tvrdých sýrů, která se projeví nahořklou chutí i u sýrů tavených [1].

Při tavení sýrů se zničí velká část vegetativních forem mikroorganismů. Sporulující mikroorganismy tavící teploty přežívají, často však bývají oslabeny. Růst mikroorganismů závisí také na formě vody v tavených sýrech. Při dobře provedené emulgaci vznikají nepříznivé podmínky pro růst mikroorganismů [1].

3.3.1 Sekundární vlivy na mikrobiologickou kvalitu tavených sýrů

Tavené sýry jsou náchylné ke kontaminaci plísněmi, které mohou růst i při chladírenských teplotách v prostředí s atmosférou obsahující nižší koncentrace kyslíku. Na kažení se podílejí nejčastěji zástupci rodu *Penicillium* (*Penicillium commune*, *Penicillium roqueforti* aj.). Z tavených sýrů bývají také často izoláty kvasinky a kvasinkám podobné mikroorganismy. Tyto mikroorganismy mohou v tavených sýrech vytvářet různé skvrny a vady, působením lipolytických a proteolytických enzymů pak mohou vytvářet látky které způsobují

nepříjemný zápach. Z tavených sýrů mohou být příležitostně izolovány i tepelně rezistentní plísně, např. *Byssochamys fulva* a další zástupci tepelně rezistentních mikroorganismů [20,22].

Kromě plísní se sporadicky mohou tavených sýrech vyskytovat i další mikroorganismy, které přežily tavící teplotu nebo které se do tavených sýrů dostaly jako sekundární kontaminace, popř. jsou odolné vůči vnějším podmínkám. Příklady takových bakterií, které mohou kontaminovat suroviny pro výrobu sýrů a tavených sýrů, mohou být např. *Staphylococcus aureus* [21], *Listeria monocytogenes* [15,16], a další bakterie. Nežádoucí kontaminaci lze zabránit např. aplikací nisinu do hotových výrobků [16], nebo přidáním kmenů produkujících antimikrobní látky ke startovacím kulturám [23].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo stanovit mikrobiální jakost vybraných, hermeticky uzavřených tavených sýrů, na různých typech pevných půd pro kultivaci mikroorganismů, dále pak mikrobiologická identifikace vybraných izolovaných bakterií pomocí biochemických testů.

5 PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY

Autokláv

Automatické pipety

Biologický termostat

Chladnička

Laboratorní sklo

Lednička

Mikrovlnná trouba

Očkovací box – Biohazard

Plynový kahan

Homogenizátor, (stomacher)

Váhy

Vodní lázeň

6 CHEMIKÁLIE A POMOCNÉ LÁTKY

Bromtymolová modř

Glukóza

Krystalová violet

Lugolův roztok

Kyselý etanol

Karbofuchsin

Imerzní olej

Chlorid sodný

2% hydroxid sodný

2% peroxid vodíku

7 CHARAKTERISTIKA ANALYZOVANÝCH VZORKŮ

Mikrobiologická jakost byla sledována u hermeticky uzavřených, dlouhodobě skladovaných tavených sýrů. Byly sledovány sterilované tavené sýry (40% w/w sušina, 45 % w/w tuku v sušině), vždy dvě šarže téhož sýru (označení I a II). Obě šarže byly vyrobeny v Madeta a.s. Pro výrobu byla použita směs přírodních sýrů, máslo, voda, tavicí soli a sušená syrovátka (0,5 % w/w). Tavicí teplota byla 92°C a tavenina byla plněna do hliníkových vaniček (75 g) s přivařitelným víčkem [14].

Nesterilované vzorky (N) byly skladovány při teplotě 6 ± 2 °C. Takto byly vzorky skladovány 18 (vzorky NI a NII) a 10 měsíců (NIII) a poté byla provedena mikrobiologická analýza, a to vždy u dvou vzorků (označení 1 a 2), třetí vzorek (3) byl nejprve podroben termostatové zkoušce a poté byla provedena mikrobiologická analýza [14].

Příklad označení vzorků sýrů:

NII – vzorek šarže I skladovaný 18 měsíců, první vzorek (1)

NI3T - vzorek šarže I skladovaný 18 měsíců, třetí vzorek (3) po termostatové zkoušce

8 KULTIVAČNÍ PŮDY A ŘEDÍCÍ ROZTOK

8.1 Odběr vzorků

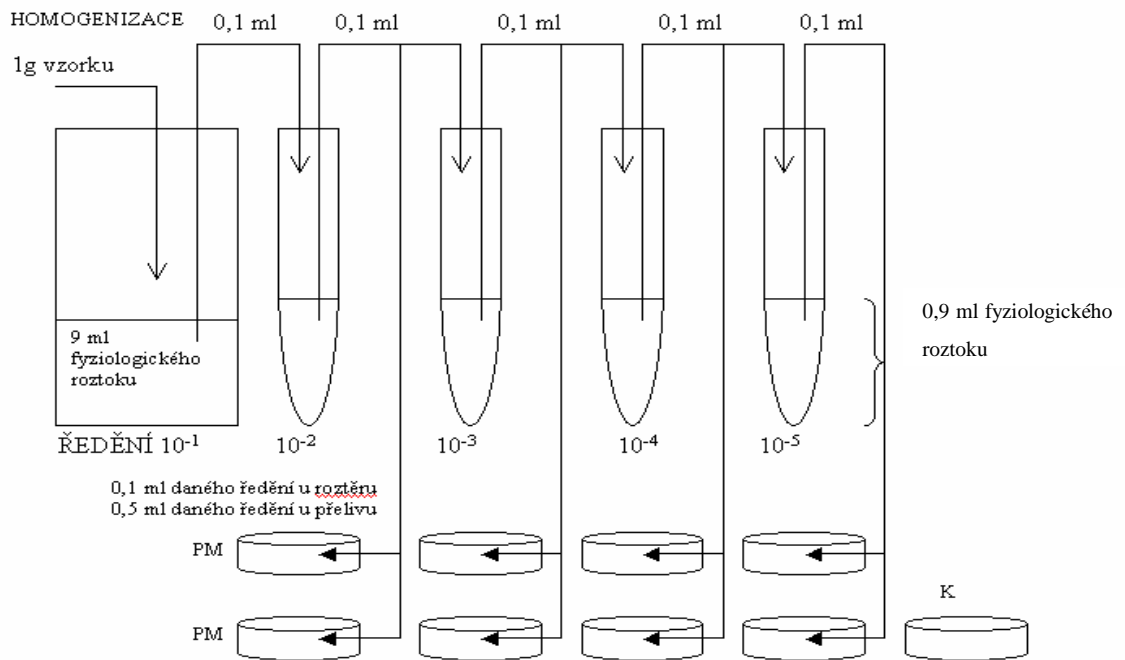
Odběr vzorků byl proveden vždy sterilními odběrovými lžícemi do sterilních sáčků. Obsah sáčku byl homogenizován s fyziologickým roztokem v poměru 1:9, ve stomacheru po dobu 5 –ti minut. Homogenizací se rozumí rovnoměrné rozptýlení mikroorganismů do celého objemu zkoušeného vzorku, který je naředěný desítkovým ředěním. Homogenizací se zabrání překážení velkých částic při dalším stanovení. Způsob homogenizace vzorku závisí na druhu vzorku, jeho konzistenci, rozpustnosti ve vodě, obsahu tuku a podobně. Jako ředící roztok byl použit fyziologický roztok o pH 7,1. Nesprávná a nedostatečná homogenizace může způsobit nestejně rozptýlení mikroorganismů ve vzorku.

8.2 Ředění

Účelem ředění je dosáhnout takové koncentrace mikroorganismů ve vzorku, aby se vzájemně narostené kolonie v naočkovaných půdách nedotýkaly nebo se vzájemně neinhibovaly, a zároveň byly počitatelné. Odhadnutí špatného ředění může mít za následek nepřesné celkové stanovení. Ředění se provádí v přesném poměru, aby bylo možné zjistit skutečný počet mikroorganismů v původním neředěném vzorku.

8.2.1 Postup při zpracování vzorku

Názorné schéma postupu kultivačního vyšetření celkového počtu životaschopných buněk, kdy předpokládáme že z jedné životaschopné buňky vyroste jedna kolonie, ukazuje obr.1. Všechny kroky znázorněné na schématu byly provedeny ve sterilním prostředí se sterilními pomůckami.



Obrázek 1. Schéma pracovního postupu při zpracování vzorků

8.3 Termostatová zkouška

Principem termostatové zkoušky, nebo-li také zkoušky obchodní sterility, je uzavřený vzorek v originálním balení otestovat na přítomnost životaschopných organismů, které by se mohly za podmínek oběhu množit. V uzavřených obalech dojde po 7 až 10 dnech inkubace, při 35°C k většímu zvýšení počtu mikroorganismů. Zkouška byla provedena tak, že testované sýry byly po dobu jednoho týdne uloženy do termostatu při 37°C . Po uplynutí této doby byly vyhodnoceny výsledky.

8.4 Stanovení celkového počtu mikroorganismů

Stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM) bylo provedeno dle normy EN ISO 4833:2003 [8].

Tato norma specifikuje horizontální metodu stanovení počtu mikroorganismů počítáním kolonií vyrostlých na pevné půdě po aerobní inkubaci. Naočkované plotny se inkubují aerobně při teplotě 30°C po dobu 72 hodin [8].

PCA (Plate Count agar)

LÁTKA	MNOŽSTVÍ (g/l)
Hydrolyzát kaseinu	5,0 g
Kvasničný extrakt	2,5 g
Glukóza bezvodá	1,0 g
Agar	9 až 18 g
Voda	1000 ml

pH bylo upraveno na 7,0. Živná půda se rozpustí ve vodě za občasného míchání. Sterilizace probíhá v autoklávu 121°C 15min. Kultivace 30°C 72 hodin.

8.5 Stanovení počtu kvasinek a plísní

Při stanovení kvasinek a plísní se očkuje určený objem zkušební vzorku nebo výchozí suspenze. Používají se dehydratované kultivační půdy. Použité chemikálie a destilovaná voda musí být podobné jako u dalších stanovení, pouze o deklarované analytické kvalitě, bez inhibičních látek, které by mohly kvasinky a plísně inaktivovat. Pro zjištění přítomnosti kvasinek a plísní byl použit agar s chloramfenikolem, který inhibuje růst bakterií [6].

Složení:

LÁTKA	MNOŽSTVÍ (g/l)
Kvasničný extrakt	5,0 g
Glukóza	20,0 g
Chloramfenikol	0,1 g

Agar	15 g
Voda	1000 ml

Složky se rozpustí ve vodě za varu. V případě potřeby se pH upraví tak, aby po sterilaci jeho hodnota činila 6,6. Sterilizuje se 15 min při 121 °C. Na plotnu s živnou půdou se očkuje roztěrem, nebo se použije přeliv, kdy se vzorek zalije vytemperovanou živnou půdou. Inkubace probíhá 2 - 5 dní při 25°C [6].

8.6 Stanovení koliformních bakterií

Půda pro koliformní mikroorganismy obsahuje žlučové soli a krystalovou violet. Tyto látky působí jako inhibitory na většinu mikroorganismů, kromě zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* [7].

Dehydrovaná kompaktní hmota se důkladně smísí s vodou a ponechá se stát několik minut. Upraví se pH na 7,4 a živná půda se autoklávuje. Je třeba se vyhnout přehřátí půdy, zahřívání po příliš dlouhou dobu nebo opakované zahřívání. Inokulace se provádí na sterilní Petriho misky. Pro stanovení koliformních bakterií byla použita Endova půda, na které lze rozlišit bakterie štěpící a neštěpící laktózu [7].

Složení Endo agaru:

LÁTKA	MNOŽSTVÍ (g/l)
Pepton	7 g
Kvasničný extrakt	3 g
Laktóza	10 g
Chlorid sodný	5 g
Žlučové soli	1,5 g
Neutrální červeň	0,03 g
Krystalová violet	0,002 g
Agar	15 g
Voda	1000 ml

8.7 Stanovení stafylokoků

Patogenní stafylokoky se stanovují na agaru s manitolem a vyšší koncentrací solí (MSA)

Složení MSA:

LÁTKA	MNOŽSTVÍ (g/l)
Pepton	10 g
Hovězí bujón	1 g
Chlorid sodný	75 g
D – manitol	10 g
Fenolová červen	0,025 g
Agar	15 g
Voda	1000 ml

Konečné pH se upraví na hodnotu 7,4 při 25 °C, živná půda se za občasného promíchání standardizována, poté je autoklávována při 121°C 15 min. Kultivace probíhá při 37°C 24 hodin.

8.8 Stanovení anaerobních sporulujících bakterií

Anaerobní sporulující bakterie byly kultivovány na půdě RCA Reinforced clostridial agar.

Složení RCA: Reinforced clostridial agar

LÁTKA	MNOŽSTVÍ (g/l)
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	10 g
Hovězí extrakt	10 g
Kvasničný extrakt	3 g
Dextrosa	5 g
Chlorid sodný	5 g
Octan sodný	3 g
Škrob	1 g

L – cystein hydrochlorid	0,5 g
Agar	13,5 g
Voda	1000 ml

Použití pro kultivaci a stanovení počtů *Clostridium spp.* a dalších anaerobních bakterií. Živná půda se rozpustí v destilované vodě a sterilizuje se v autoklávu při teplotě 121°C - 15 minut. Do čerstvě připraveného živného média (vychlazeného na teplotu cca 40°C) naočkujeme vypočítané ředění o objemu 0,1 ml, a po přelití suspenze živným médiem kultivujeme anaerobně při teplotě 30°C 48 hodin.

8.9 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok se připraví následovně: 8,5 g chloridu sodného se rozpustí ve 1000 ml destilované vody. Takto připravený roztok se steriluje při 121°C po dobu 15 minut.

8.10 Skupiny zjišťovaných mikroorganismů

V tabulce 1 jsou uvedeny skupiny mikroorganismů, které byly v rámci naší studie sledovány. Zároveň tabulka uvádí selektivní kultivační půdy, na kterých byly tyto mikroorganismy kultivovány.

Tabulka.1. Sledované skupiny mikroorganismů.

SKUPINA MIKROORGANISMŮ	KULTIVAČNÍ MÉDIUM
Celkový počet mikroorganismů	PCA (Plate count agar)
Koliformní mikroorganismy	ENDO agar
Anaerobní mikroorganismy	RCA
Kvasinky a plísně	GKCHA
Stafylokoky	MSA

9 OČKOVÁNÍ A KULTIVACE

9.1 Stanovení CFU

Po příslušné době kultivace byly spočítány kolonie vyrostlé na miskách. Celkové počty mikroorganismů na 1 g sýra byly vypočteny z následujícího vztahu:

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1n_2) \cdot d} \Rightarrow [CFU / g]$$

c ... počet narostlých kolonií (součet)

n_1, n_2 ...počet misek příslušného ředění

d ...první ředění zvolené k počítání

9.2 Identifikace izolovaných kolonií

9.2.1 Gramovo barvení

Princip barvení podle Grama

Barvení podle Grama je jednou s nejdůležitějších diagnostických metod při určování rodů bakterií. Jedná se odfarvení fixovaného preparátu a následné moření buněk roztokem jódu. Vzniká barvivo – jód – složky buněčné stěny, které lze z buněk některých rodů nebo druhů mikroorganismů vyplavit etanolem nebo acetonem. Tyto druhy jsou označovány jako gramnegativní (G-), jejich buněčné stěny jsou dobarvovány karbolfuchsinem nebo safraninem. Mikroorganismy v jejichž buněčných stěnách zůstává komplex zachycen, označujeme jako grampozitivní (G+).

Postup barvení podle Grama

K provedení Gramova testu je zapotřebí maximálně 24 hodin stará kultura mikroorganismů. Dále k barvení potřebujeme tyto roztoky: krystalová violet', Lugolův roztok, karbolfuchsin nebo safranin, etanol nebo aceton.

Na podložní sklo se nanese kapka sterilní vody a vyžíhanou kličkou se do ní přenesou malé množství kultury z Petriho misky. Po rozmíchání suspenze se vytvoří tenký nátěr, který se nechá zaschnout. Proveďte se fixace preparátu nad plamenem, preparát se převrství

krystalovou violetí po dobu 60 sekund a po opláchnutí vodou se převrství Lugolovým roztokem, čas převrstvení je 30 sekund. Následuje odbarvování preparátu acetonem 15 sekund. Preparát se dobarví karbolfuchsinem 30-60 sekund. Sklo se opláchně vodou a osuší. Takto připravený preparát se mikroskopuje za použití imerzního oleje a imerzního objektivu.

Hodnocení barvení podle Grama

Grampozitivní organismy jsou zbarveny fialově až modře, gramnegativní bakterie jsou červené nebo růžové.

9.2.2 KOH test

U jednotlivých bakterií je možno ověřit Gramovu reakci pomocí rychlého testu KOH, založeného na rozdílném složení buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií. Na podložní sklo se kápne 2% roztok hydroxidu draselného a do něho se pomocí kličky rozetře část bakteriální kolonie z Petriho misky. U gramnegativních bakterií se tvoří táhnoucí viskózní hmota. U grampozitivních bakterií se tato hmota netvoří, protože silná peptidoglykanová vrstva jejich buněčné stěny je k účinkům louhu odolná.

9.2.3 Oxidázový test

Cytochromoxidáza je enzym, který se podílí na oxidativních procesech v buňce. Je přítomen u všech aerofilních bakterií s respiračním metabolismem. Podstatou testu je reakce derivátů p-fenylendiaminu se železem obsaženým v cytochromových respiračních komplexech. Přítomnost cytochromoxidázy je detekována barevnými reakcemi pomocí příslušných činidel.

24 hodinová kultura se nanese sterilní kličkou na proužek papíru, který byl nasycen činidlem. Je-li test pozitivní, vznikne během 10ti sekund tmavě fialové zbarvení (Wursterová modř).

9.2.4 Oxidačně–fermentační test (OF test)

Cílem testu je zjistit zkvašování glukózy. V případě pozitivního testu vzniklé organické kyseliny způsobí změnu acidobazického indikátoru – reakční směs zežloutne. Reakce

jsou vedeny ve zkumavkách ve dvou řadách s parafínem (jako fermentační) a bez parafínu (oxidační).

Složení média pro OF test:

LÁTKA	MNOŽSTVÍ (g/l)
Pepton	10 g
Chlorid sodný	5 g
Glukosa	10 g
Bromtymolová modř	0,02 g
Agar	15 g
Voda	1000 ml
Konečné pH (při 25°C) $7,2 \pm 0,2$	

Postup přípravy OF testu

Do infúzní láhve se naváží jednotlivé složky média a poté je láhev doplněna destilovanou vodou na daný objem. Rozpuštěný agar se rozplní po cca 5 ml do zkumavek, zavíčkují kovovými zátkami a autoklávuje po dobu 15 min. Testovaná kultura se vpichem zavede do dvou zkumavek s médiem pro fermentaci cukrů. Jedna zkumavka se zakápně parafínem, nebo parafinovým olejem, pro vytvoření anaerobního prostředí.

Hodnocení OF testu

Varianty, které mohou nastat při hodnocení OF testu jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2. Hodnotící tabulka pro OF test

Zkumavka bez parafínu	Zkumavka s parafínem	Výsledek
Barva média se nemění	Barva se nemění	Nerozkládá glukózu
Barva média se nemění	Médium zežloutne	Anaerobní oxidace
Médium zežloutne	Barva se nemění	Aerobní oxidace
Médium zežloutne	Médium zežloutne	Fermentace i oxidace
Médium zmodrá	Barva se nemění	Alkalizuje – nerozkládá glu.
Médium potrhané, zežloutlé.	Médium potrhané, zežloutlé.	Fermentace za vzniku plynu

9.2.5 ENTERO test

ENTEROtest se využívá pro základní identifikaci mikroorganismů. ENTEROtesty jsou plastové destičky, každá pro 6 izolátů. Pro každý izolát je určeno 16 jamek. Jamky obsahují vysušené médium pro jednotlivé biochemické testy. Do jamek se automatickou pipetou dávkuje 0,1 ml suspenze vyšetřovaného kmene. Suspenze se připraví z 24 hodinové kultury rozptýlením kolonie ve 3 ml sterilního fyziologického roztoku. Další úpravy jako převrstvení parafínovým olejem a přidavek činidla po inkubaci se dělají dle pokynů přiložených v ENTEROtestu. Hodnocení výsledků po 18 – 24 hodinové inkubaci při 37°C, se dělá dle originální tabulky, nebo pomocí softwarového programu TNW Pro 6.5.

10 VÝSLEDKY A DISKUSE

Na základě kultivačních metod bylo zjištěno početní zastoupení všech bakterií (celkový počet bakterií), kvasinek a plísní ve vybraných tavených sýrech. Výsledky byly zaznamenány do tabulek. Tyto tabulky jsou uvedeny v příloze I.

Z uvedených výsledků v tabulce 4, která je uvedena v příloze I, vyplývá, že celkové počty mikroorganismů se u studovaných vzorků tavených sýrů skladovaných 18 a 10 měsíců pohybovaly v počtech řádově desítek a stovek tisíců na 1 g výrobku. Zároveň bylo zjištěno, že nejméně mikroorganismů bylo přítomno u vzorků NII., nejvíce mikroorganismů u vzorků NIII, které byly vyrobeny o rok později. K podobným výsledkům jsme dospěli i při analýze provedené o 4 měsíce později, jak uvádí tabulka 5, která je uveden v příloze I.

Výsledky byly porovnány s nařízením komise ES č. 2073/2005. Z tohoto porovnání vyplývá že tyto tavené sýry nejsou vhodné pro konzumaci. Protože v tomto nařízení jsou uvedeny pouze počty patogenních mikroorganismů (zejména *Salmonella* a *Listeria*) a nejsou zohledňovány mikroorganismy kazící potraviny a potenciálně patogenní mikroorganismy, bylo přistoupeno k hodnocení mikrobiální jakosti tavených sýrů i dle v současnosti již neplatné vyhlášky 132/2004 Sb, která uvádí přísnější kritéria (tabulka 3) Následující tabulka ukazuje maximální přípustné hodnoty obsahu vybraných mikroorganismů v tavených sýrech a v ostatních potravinách.

Tabulka 3. Maximální přípustné hodnoty vybraných mikroorganismů v potravinách. Některé příklady v této tabulce jsou převzaty z neplatné vyhlášky 132/2004 Sb*.

MIKROORANISMUS	MAX. HODNOTY V POTRAVINĚ
CPM	10^5 *
<i>Enterobacteriaceae</i>	10^*
<i>Bacillus cereus</i>	10^4 *
<i>Clostridium perfringens</i>	10^4 *
Satfylokoky koagulázopozitivní	10^2 *
<i>Listeria, Salmonella</i> spp.	0 negativní v 50 g

U výrobků bylo zjištěno množství mikroorganismů přesahující přípustné počty. Bylo zároveň zjištěno značné množství koliformních bakterií a stafylokoků. Zástupci těchto bakterií, podobně jako kmeny sporulujících bakterií, mohou být potenciálně patogenní. Proto tyto výrobky nelze doporučit ke konzumaci.

Z tabulek 4 a 5 vyplývá že mikrobiologická jakost sledovaných hermeticky uzavřených, dlouhodobě skladovaných tavených sýrů se ani po 12 –ti i 18 –ti výrazně nemění. Tato identifikace a hodnocení proběhlo dne 5.11.2007.

Z tabulek 6 a 7 vyplývá, že z tavených sýrů byly izolovány více grampozitivní bakterie než bakterie gramnegativní, což lze vysvětlit tím, že grampozitivní bakterie jsou obecně odolnější než grampozitivní bakterie a mohou tak přežít i tavicí teploty. Ze 44 izolovaných kmenů mikroorganismů 28 kmenů rozkládalo peroxid vodíku, oxidačně fermentativní metabolismus vykazovala většina izolovaných bakterií, u 7 kmenů byla detekována i produkce plynu.

Z tabulky 8 vyplývá že se v dlouhodobě skladovaných tavených sýrech vyskytují psychrotrofní mikroorganismy a halofilní mikroorganismy a mikroorganismy které jsou schopny růst za zvýšených koncentracích solí.

U gramnegativních tyčinek, které byly oxidáza negativní a měly oxidačně fermentační metabolismus, byl proveden ENTEROtest. Výsledky nejsou v tabulce uvedeny, bylo však zjištěno, že ze vzorků sýrů byly izolovány převážně bakterie *Escherichia coli* a zástupci rodu *Hafnia*. Tyto bakterie bývají běžně izolovány z potravin, vod a prostředí [17].

Kromě bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* byly ve vzorcích zachyceny oxidáza pozitivní gramnegativní tyčinky, pravděpodobně zástupci rodu *Pseudomonas*. Grampozitivní aerobní tyčinky větších rozměrů detekované po inaktivaci vegetativních forem vyšší teplotou jsou pravděpodobně zástupci rodu *Bacillus* a grampozitivní anaerobní tyčinky detekované po inaktivaci vegetativních forem vyšší teplotou jsou pravděpodobně zástupci rodu *Clostridium*. Bližší identifikace těchto mikroorganismů bude předmětem dalších experimentů.

Tavené sýry jsou výrobky, které jsou částečně ošetřeny proti růstu mikroorganismů již během výrobního procesu. Nelze však říci, že dojde k usmrcení všech forem mikroorganismů, proto mají tyto výrobky omezenou dobu použitelnosti, zvláště jsou-li skladovány při pokojové teplotě. Tyto výsledky potvrdili i Schär a Bosset [9], kteří provedli experi-

ment se sledováním tavených sýru a fondue při pokojové teplotě. Jejich závěry jsou podobné s našimi výsledky. I přesto, že tavené sýry těchto autorů byly ošetřeny proti množení a růstu mikroorganismů, tak po 10 měsících došlo k jejich kažení.

Studiem mikrobiální jakosti analogů tavených sýrů se zabýval také Muir a kol., kteří vzorky analogů tavených sýrů ošetřovali nisinem. V těchto vzorcích byly detekovány nízké počty mikroorganismů bez vlivu na složení těchto výrobků. Tyto nízké počty mikroorganismů byly pravděpodobně dány ošetřením tavených sýrů a jejich analogů nisinem, který má antibakteriální účinky. [10]

11 ZÁVĚR

V této práci bylo kultivačními metodami zjišťována přítomnost mikroorganismů v dlouhodobě skladovaných, hermeticky uzavřených tavených sýrech. Protože sýry nebyly před uzavřením ani po uzavření do obalů ošetřeny proti růstu mikroorganismů, byl u nich zjištěn značný nárůst mikroorganismů, přesahující tisíce buněk na 1 g výrobku. Z izolovaných mikroorganismů převládaly grampozitivní bakterie, zejména sporulující aerobní a anaerobní tyčinky. Z tohoto důvodu nelze uvedené výrobky doporučit ke konzumaci.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Doležálek J., Mikrobiologie mlékárenského a tukařského průmyslu, Praha 1962, 545 stran.
- [2] Görner F., Valík L., Aplikovaná mikrobiológia požívatin, Malé Centrum Bratislava 2004, 528 stran.
- [3] Buňka F., Hrabě J., Tavené sýry, Potravinářská revue 4, s. 13 – 16, 2006.
- [4] Mlékárenský průmysl koncern Praha Směrný technologický postup výroby, TOMOS Praha 1987
- [5] Vyhláška Ministerstva zemědělství č.77/2003Sb. (v platném znění). Stanovení požadků pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy, jedlé tuky a oleje.
- [6] ČSN ISO 7954 Všeobecné pokyny stanovení počtu kvasinek a plísní. Český normalizační institut.
- [7] ČSN ISO 4832 Všeobecné pokyny stanovení koliformních bakterií. Český normalizační institut.
- [8] ČSN ISO 4833 Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů. Český normalizační institut.
- [9] Muir D.D., Tamime A.Y, Shenana M.E. and Dawood A.H., Processed Cheese Analogues Incorporating Fat-Substitutes 1. Composition, microbiological quality and flavour changes during storage at 5°C. Lebensm. Wiss. Technol. 32: s.41-49. 1999
- [10] Schär W. and Bosset J. O., Chemical and physico-chemical Changes in Processed Cheese and Ready-made Fondue During Storage, A review: Lebensm. Wiss. Technol 35, 2002, s.15 – 20.
- [11] ČSN 56 0100 Mikrobiologické zkoušení požívatin, a prostředí potravinářských provozů. Český normalizační institut.
- [12] Harrigan W. F., Laboratory Methods in Food Microbiology, AP 1998, 532 stran.
- [13] Lukášová J. a kol., Mikrobiologie potravin (praktická cvičení). VFU Brno, 1997, 55 s.
- [14] Vlčková O., Studium změn jakosti sterilovaných tavených sýrů během skladování. Diplomová práce, UTB ve Zlíně, 2007.

- [15] Manfreda G., Cesare A., Stella S., Cozzi M, Cantoni C., Occurrence and ribotypes of *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheeses., *Int. J. Food Microbiol.* 102, 2005, s. 287 – 293.
- [16] Samelis J., Kakouri A., Rogga K.J., Savvaidis I.N., Kontaminas M.G., Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4°C in vacuum packages., *Food Microbiol.* 20, 2003, s.661-669.
- [17] Sedláček I., *Taxonomie prokaryot*, MU Brno, 2007, 270 stran.
- [18] MERCK, *Microbiology Manual*, 12 ed., MERCK, Darmstadt, 688 stran.
- [19] Molins R. A., *Phosphates in food*. Boca Raton: CRC Press, 1991, 261 stran.
- [20] Kure C.F., Skaar I., Holst-Jensen A., Abeln E.C.A., The use of AFLP to relate cheese-contaminating *Penicillium* strains to specific points in the production plants *Int. J. Food Microbiol* 83, 2003, s. 195-204.
- [21] Vautor E., Abadie G., Guibert J.M., Haurd C., Pépin M., Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis, *Vet. Microbiol.* 96, 2003, s. 69-79.
- [22] Kure C.F., Skaar I., Holst-Jensen A., Abeln E.C.A., Mould contamination in production of semi-hard cheese, *Int. J. Food Microbiol.* 93, 2004, s. 41-49.
- [23] Moreno M.R.F., Rea M.C., Cogan T.M., De Vuyst L., Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture, *Int. J. Food Microbiol.* 81, 2003, s. 73-84.
- [24] Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 ze 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny
- [25] Sbírka zákonů, vyhláška 132/2004 o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CPM	Celkový počet mikroorganismů
GKCHA	Chloramfenicol yeast glukose agar
PCA	Plate Count agar
RCA	Reinforced Clostridial Agar
MSA	Mannitol Salt Agar Base
G -	Gramnegativní bakterie
OF	Médium pro fermentaci cukrů
G +	Grampozitivní bakterie
KOH	Hydroxid draselný
CFU	Kolonie tvořící jednotky

SEZNAM PŘÍLOH

Obrázek 1. Ukázka nárůstu mikroorganismů dle druhu vzorku na různých médiích.

Obrázek 2. Ukázka rozdílu růstu stejných mikroorganismů (fakultativně anaerobních) při různých podmínkách kultivace.

Tabulka 4. Počty mikroorganismů ve vzorcích tavených sýrů skladovaných 10 a 18 měsíců.

Tabulka 5. Počty mikroorganismů ve vzorcích tavených sýrů skladovaných 14 a 22 měsíců.

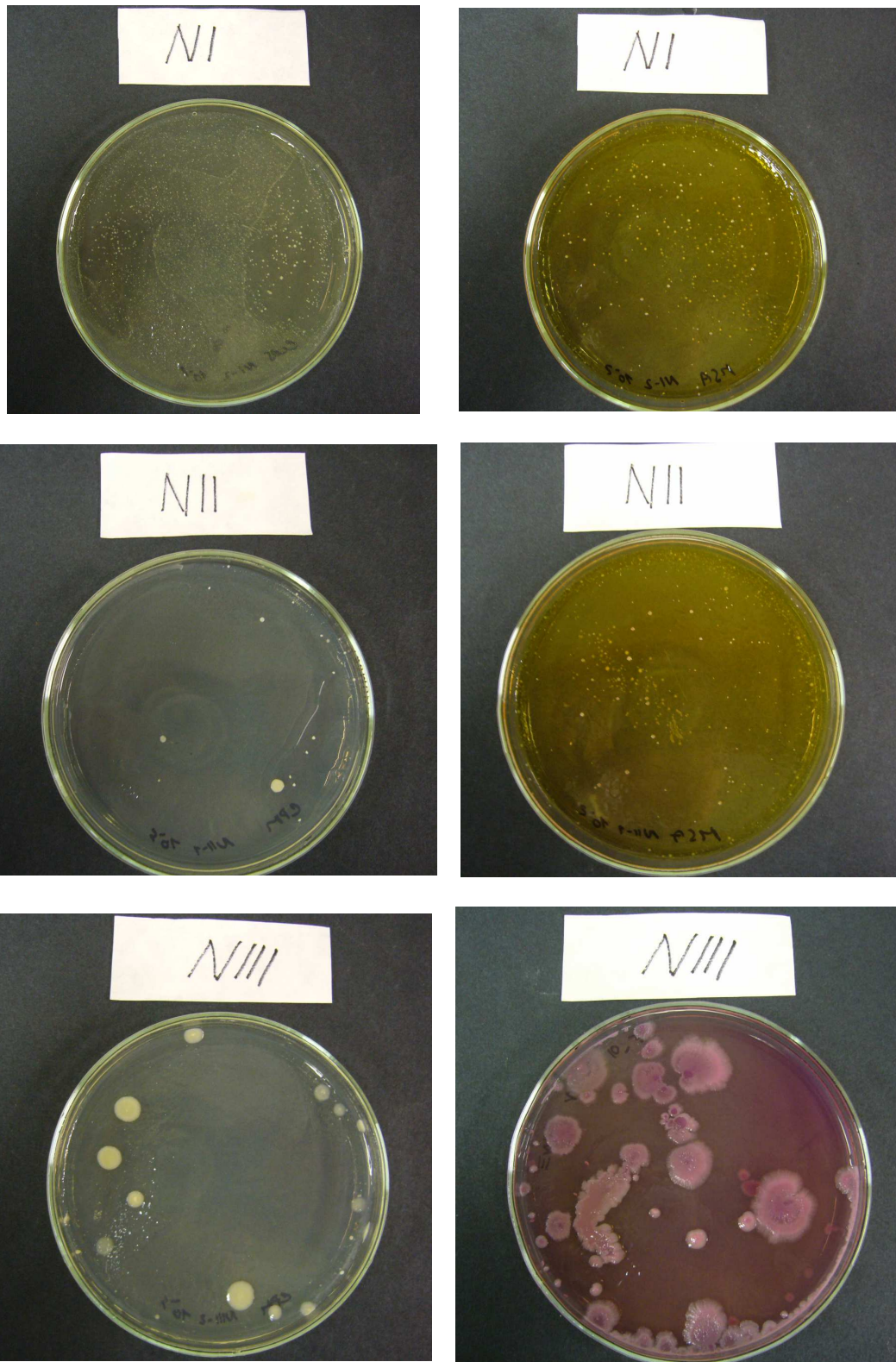
Tabulka 6. Identifikace mikroorganismů získaných s vybraných vzorků tavených sýrů skladovaných 10 a 18 měsíců.

Tabulka 7. Výsledky identifikace mikroorganismů zpracované o ve 12 a 20 měsíci skladování a vyhodnocení jejich vlastností.

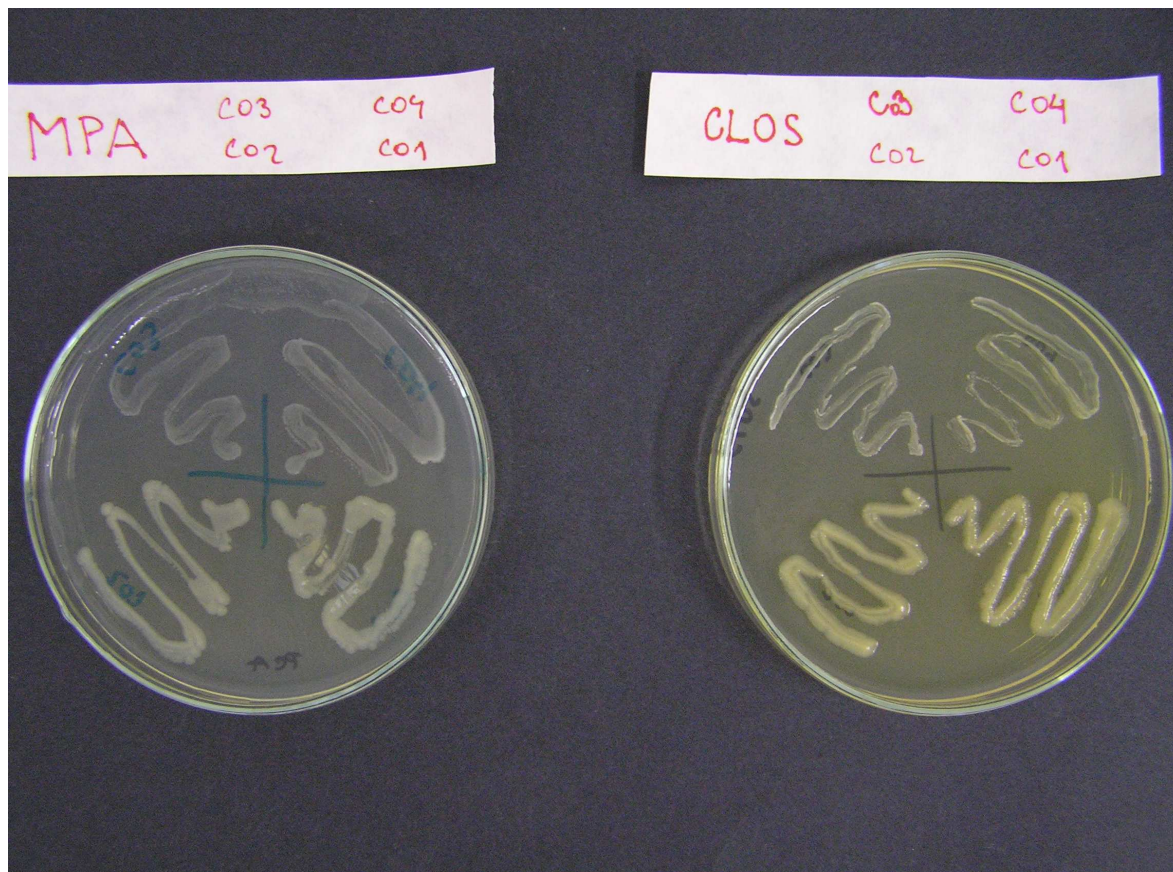
Tabulka 8. Identifikace mikroorganismů získaných s vybraných vzorků tavených sýrů skladovaných 14 a 22 měsíců.

PŘÍLOHA I

Obrázek 1. Ukázka nárůstu mikroorganismů dle druhu vzorku na různých médiích.



Obrázek 2. Ukázka rozdílu růstu stejných mikroorganismů (fakultativně anaerobních) při různých podmínkách kultivace. Na obrázku je znázorněna kultivace vlevo při aerobních podmínkách a vpravo při anaerobních podmínkách.



Tabulka 4. Počty mikroorganismů ve vzorcích tavených sýrů skladovaných 10 a 18 měsíců.

VZOREK	CPM	Koliformní	Stafylokoky	Sporuláty	Sporuláty	Kvasinky a
	CFU / g	CFU / g	CFU / g	aerobní CFU / g	anaerobní CFU / g	plísně CFU / g
NI1	$1,86 \cdot 10^5$	$1,63 \cdot 10^3$	$1,02 \cdot 10^3$	$1,56 \cdot 10^3$	$4,00 \cdot 10^1$	0
NI2	$3,35 \cdot 10^5$	$3,80 \cdot 10^3$	$5,00 \cdot 10^3$	$1,03 \cdot 10^4$	$4,50 \cdot 10^1$	0
NI3T	$6,17 \cdot 10^5$	$6,35 \cdot 10^3$	$5,70 \cdot 10^3$	$3,17 \cdot 10^4$	$2,00 \cdot 10^1$	$5,50 \cdot 10^1$
NI11	$3,15 \cdot 10^4$	0	$1,22 \cdot 10^3$	$1,00 \cdot 10^3$	$3,00 \cdot 10^1$	0
NI12	$4,58 \cdot 10^4$	0	$4,88 \cdot 10^3$	0	$1,35 \cdot 10^2$	0
NI13T	$1,28 \cdot 10^6$	0	$3,10 \cdot 10^3$	0	$3,50 \cdot 10^1$	5
NI111	$4,88 \cdot 10^5$	$8,20 \cdot 10^3$	$5,10 \cdot 10^3$	$2,00 \cdot 10^1$	$1,10 \cdot 10^2$	$1,02 \cdot 10^3$
NI112	$6,00 \cdot 10^5$	$6,76 \cdot 10^3$	$4,10 \cdot 10^3$	$5,00 \cdot 10^1$	$2,00 \cdot 10^1$	$1,56 \cdot 10^3$
NI113T	$6,97 \cdot 10^5$	$6,51 \cdot 10^3$	$6,36 \cdot 10^3$	$3,50 \cdot 10^3$	$2,02 \cdot 10^3$	$6,90 \cdot 10^2$

Tabulka 5. Počty mikroorganismů ve vzorcích tavených sýrů skladovaných 14 a 22 měsíců.

VZOREK	CPM	Koliform- ní	Stafylokoky	Sporuláty	Sporuláty	Kvasinky a
	CFU / g	CFU / g	CFU / g	aerobní CFU / g	anaerobní CFU / g	plísně CFU / g
NI1	$2,27 \cdot 10^5$	0	$6,95 \cdot 10^3$	$6,30 \cdot 10^1$	$1,50 \cdot 10^4$	$4,00 \cdot 10^1$
NI2	$6,82 \cdot 10^5$	0	$3,64 \cdot 10^4$	9,0	$1,26 \cdot 10^4$	0
NI11	$7,27 \cdot 10^4$	0	$1,59 \cdot 10^4$	$1,82 \cdot 10^1$	$1,56 \cdot 10^4$	0
NI112	$1,55 \cdot 10^5$	0	$9,30 \cdot 10^3$	$5,45 \cdot 10^1$	$1,28 \cdot 10^4$	0
NI111	$4,82 \cdot 10^5$	$8,50 \cdot 10^4$	$2,85 \cdot 10^4$	$6,36 \cdot 10^1$	$1,31 \cdot 10^4$	$4,58 \cdot 10^3$
NI112	$2,09 \cdot 10^5$	$8,25 \cdot 10^4$	$4,70 \cdot 10^3$	$7,27 \cdot 10^1$	$7,50 \cdot 10^3$	$7,11 \cdot 10^3$

Tabulka 6. Identifikace mikroorganismů získaných s vybraných vzorků tavených sýrů. skladovaných 10 a 18 měsíců.

VZOREK	GRAM	KOH	H2O2	OF test				OXI TEST
				ae- aerobní plyn	robní anaerobní	anaerobní plyn		
CA NI113Tsp	G+ KOK	G+	+	+	-	+	-	
CB NI113Tsp	G+ KOK	G+	-	+	-	+	-	
CC NI113Tsp	G+ KOK	G+	-	+	-	+	-	
CD NI113Tsp	G+ KOK	G+	-	+	-	+	-	
CF NI111	G- TYC	G+ -	+	+	-	+	-	+
CH NI112 sp	G+ TYC	G+ -	+	+	-	+	-	+
CI NI112sp	G+ TYC	G+ -	+	+	-	+	-	-

VZOREK	GRAM	KOH	H2O2	OF test				OXI TEST
				ae- aerobní plyn	rob- ní	anaerobní	anaerobní plyn	
CJ NIII3T	G+ KOK	-	-	+	-	+	-	
CK NIII3T	G+ TYC	-	+	+	-	+	-	
CL NI2	G+ TYC	-	+	+	-	+	-	
CM NI2	G+ TYC	-	+	+	-	+	-	
CN NI2 sp	G+ TYC	-	+	+	-	+	-	
CO NI2 sp	G- TYC	+	+	+	-	+	-	+
CP NI2 sp	G- TYC	+	+	+	-	+	-	+
GA NIII2	PLISEN			+	-	+	-	
EC NIII2	G- KOK T	+	-	+	-	+	-	
EB NIII2	G- KOK T	+	+	+	-	+	-	-
SE NI2	G+ KOK	-	+	+	-	+	-	
SA NIII2	G+ TYC	+	+	+	-	+	-	-
SB NIII1	G+ KOK	-	+	+	-	+	-	
SC NIII1	G+ KOK	-	+	+	-	+	-	
SD NI2	G+ KOK	-	-	+	-	+	-	
SF NIII2	G+ KOK	-	-	+	-	+	-	
EA2 NIII2	G-+ KOK T	+	+	+	+	+	+	-
EA1 NIII3T	G-+ KOK T	+	+	+	+	+	+	-
ED NI2	G+ KOK	-	-	+	-	+	-	
EF NI2	G+ KOK	-	-	+	-	+	-	
EE NIT3	G+ KOK	-	-	+	-	+	-	
EG NIT3	G+ KOK	-	-	-	-	-	-	
AB NIII1	G+ KOK	-	+	+	+	+	+	
AA NIII3T	G+ TYC SP	-	+	+	-	+	-	
AC NIII2	G+ KOK	-	+	+	+	+	-	
AD NI2	G+ KOK	-	-	+	-	+	-	
AE 12 NI2	G+ TYC SP	-	+	+	+	+	-	
AF NI2	G+ TYC SP	-	+	+	-	+	-	
AG NI2	G+ KOK	-	-	+	-	-	-	
AH NI2	G+ KOK	-	-	+	-	+	-	
AI NI2	G+ KOK	-	-	+	-	+	-	
AJ NIII3T	G+ TYC SP	-	+	+	-	+	-	
AK NIII3T	G+ KOK T	-	+	+	+	+	+	
AL NIII2	G- KOK T	+	+	+	+	+	+	-
CA NIII3Tsp	G+ KOK	-	+	+	-	+	-	
AM NIT3	KVASINKA		+	-	-	-	-	
AN NIIT3	G+ KOK	-	+	-	-	-	-	
AO NIIT3	G+ TYC SP	-	+	-	-	-	-	

+ pozitivní reakce

- negativní reakce

Tabulka 7. Výsledky identifikace mikroorganismů zpracované o ve 12 a 20 měsíci skladování a vyhodnocení jejich vlastností.

VZOREK		VZHLED KOLONIÍ	GRAM	KOH	OXIDAČ -NÍ +PLYN	FERMEN -TAČNÍ +PLYN
C01	NIII2	bílá, malá	G- TYC	+	+	+
C02	NIII2	bílá, malá	G- TYC	+	+	+
C03	NIII2	rozlézavá bílá	G+ TYC	-	-	-
C04	NI2	bílá, malá	G+ KOK	-	-	-
C05	NIII1	velké rozlézavé	G+ TYC	-	-	-
C06	NIII2	žlutobílá, malá	G+ KOK	-	-	-
C07	NIII2	průsvitná malá	G+ KOK	-	-	-
C08	NI2	průhledná malá	G+ KOK	-	-	+
C09	NI2	průhledná malá	G+ KOK	-	-	-
C10	NI2	průhledná malá	G+ KOK	-	+	-
C11	NII2	žluté	G+ KOK	-	-	-
C12	NII2	slizovité, rozlézavé	G+ KOK	-	-	-
C13	NII2	malé průhledné	G+ TYC	-	-	-
S14	NI1	žp. neodb., červená k.	G+ KOK	-	+	-
S15	NI2	půdu odbarvuje	G- TYC	+	-	-
S16	NII1	půdu odbarvuje	G+ KOK	-	-	-
S17	NII1	půdu odbarvuje	G+ KOK	-	-	-
S18	NII2	půdu odbarvuje	G+ KOK	-	-	-
S19	NII2	půdu odbarvuje	G+ KOK	-	-	-
S20	NIII1	žp.odbarvuje do žluta, žlutá k	G+ KOK	-	-	-
S21	NIII2	žp.odbarvuje do žluta, žlutá k	G+KOK	-	-	-
S22	NIII1	neodbarvuje půdu	G+KOK	-	-	-
E23	NIII	běžová kolonie	G- TYC	+	+ pl	+ pl
E24	NIII	běžová kolonie	G- TYC	+	+ pl	+ pl
E25	NIII	běžová kolonie	G- TYC	+	+ pl	+ pl
E26	NIII	běžová kolonie	G- TYC	+	+ pl	+ pl
E27	NIII	běžová kolonie	G- TYC	+	+	+ pl
E28	NIII	běžová kolonie	G- TYC	+	+ pl	+ pl
E29	NIII	oslizlé červené kolonie	G- TYC	+	+	-
E30	NIII	oslizlé červené kolonie	G- TYC	+	+	-
E31	NIII	kovový lesk	G- TYC	+	+	+ pl
E32	NIII	běžová kolonie	G- TYC	+	+	+ pl
E33	NIII	běžová kolonie	G- TYC	+	+	+ pl
P34	NII1	výrazně žluté kolonie	G+ KOK	-	-	-
P35	NII2	běžové k	G+ KOK	-	-	-
P36	NII1	žluté výrazné kolonie	G+ KOK	-	-	-
P37	NIII1	běžové k	G+ KOK	-	-	-
P38	NIII1	průhledná kolonie	G+ KOK	-	-	-
P39	NII1	běžové k	G+ KOK	-	-	-
P40	NII1	průhledné kolonie	G- TYC	+	+	-
P41	NII1	běžové k	G+ KOK	-	-	-
A42	NII1	běžová kolonie	G+KOK	-	-	-

VZOREK		VZHLED KOLONIÍ	GRAM	KOH	OXIDAČ -NÍ +PLYN	FERMEN -TAČNÍ +PLYN
A43	NII1	žluté kolonie	G+KOK	-	-	-
A44	NII1	běžová kolonie	G+KOK	-	-	-
A45	NI2	běžová kolonie	G+KOK	-	+	-
A46	NI2	běžové kolonie	G+KOK	-	-	-
A47	NI2	běžová kolonie	G+KOK	-	-	-
A48	NII2	běžová kolonie	G+KOK	-	-	-
A49	NII2	žluté kolonie	G+KOK	-	-	-
A50	NI1	běžová kolonie	G+KOK	-	-	-
A51	NI1	běžová kolonie	G+KOK	-	-	-
A52	NII2	bílé kolonie	G+KOK	-	-	-
A53	NII2	bílé kolonie	G+KOK	-	-	-
A54	NIII2	rozlézavé žluto béžové k.	G- TYC	+	+	+ pl
A55	NIII2	jemné malé kolonie	G- KOK	+	+	+ pl
A56	NIII1	bílé kolonie	G+KOK	-	-	-
A57	NIII1	bílé kolonie	G+KOK	-	+	-

+ pozitivní reakce

- negativní reakce

pl tvorba plynu

žp. živná půda

Tabulka 8. Identifikace mikroorganismů získaných s vybraných vzorků tavených sýrů. skladovaných 14 a 22 měsíců.

VZOREK	GRAM	ZKVAŠOVÁNÍ LAKTÓZY	KULTIVACE PŘI pH 9,5	KULTIVACE NA ŽIVNÉ PŮDĚ S 6,5% NaCl			KULTIVACE PŘI TEPLOTĚ 45°C	10°C, 10dní
C01 NIII2	G- TYC	-	+	-	-	-	+	
C02 NIII2	G- TYC	+	+	-	-	-	+	
C04 NI2	G+TYC	-	+++	+	24hod	-	-	
C05 NIII1	G+ KOK	+	+	+	24hod	-	-	
C06 NIII2	G+ KOK	+	+	+	24hod	-	-	
C07 NIII2	G+ KOK	+	+	-	-	-	-	
C08 NI2	G+ KOK	+	+	+	24hod	-	-	
C09 NI2	G+ KOK	+	+	+	24hod	-	-	
C10 NI2	G+ KOK	+	+	+	48hod	-	-	
C11 NII2	G+ KOK	+	+	+	24hod	-	-	
C12 NII2	G+ KOK	-	+	+	24hod	-	-	
C13 NII2	G+ TYC	+	+	+	-	-	-	
S14 NI1	G+ KOK	-	+	+	-	-	-	
S15 NI2	G+ KOK	+	+	+	24hod	-	-	
S16 NIII1	G+ KOK	-	+	+	24hod	-	-	
S17 NIII1	G- TYC	+	+	-	-	-	+	
S18 NII2	G- TYC	+	+	+	24hod	-	+	
S19 NII2	G- KOK T	+	+	-	-	-	+	
E26 NIII	G- TYC	+	+	-	-	-	+	
E27 NIII	G- TYC	+	+	-	-	-	+	
E28 NIII	G- TYC	+	+	+	-	-	+	
E32 NIII	G- TYC	+	+	-	-	-	+	
E33 NIII	G- TYC	+	+	-	-	-	+	
P37 NIII1	G+ KOK	+	+	+	-	-	-	
P38 NIII1	G+ KOK	-	+	+	24hod	-	-	
P39 NII1	G+ KOK	+	+	+	-	-	-	
A42 NII1	G+TYC sp.	-	+	+	24hod	-	-	
A43 NII1	G+ KOK	-	+	+	24hod	-	-	
A44 NII1	G+ KOK	-	+	+	-	-	-	
A45 NI2	G+ KOK	+	+	+	24hod	-	-	
A46 NI2	G+ KOK	-	+	+	24hod	-	-	
A48 NII2	G+ KOK	-	+	+	24hod	-	-	
A49 NII2	G+ KOK	-	+	+	24hod	-	-	
A54 NIII2	G- TYC	+	+	-	-	-	+	
A56 NIII1	G+ KOK	+	+	+	24hod	-	-	
A57 NIII1	G+ KOK	+	+	+	24hod	-	-	

+ pozitivní reakce

- negativní reakce

TYC sp. sporulující tyčinky