

Výskyt bakterií rodu *Bacillus* v dehydrovaných potravinách

Kateřina Táborská

Bakalářská práce
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství
akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina TÁBORSKÁ**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Výskyt bakterií rodu Bacillus v dehydrovaných potravinách**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- Význam rodu Bacillus v potravinářství, jeho popis a charakteristika.
- Bacillus cereus.
- Dehydrované potraviny.

II. Praktická část

- Stanovení rodu Bacillus v dehydrovaných potravinách.
- Stanovení ostatních mikroorganismů v dehydrovaných potravinách.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] ICMFS. **Microorganisms of foods 6. Microbial ecology of food commodities. 2.vydání**, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 2005.

[2] BLACKBURN, C. **Food spoilage microorganisms**, CRC Press, New York 2006.

[3] MONTVILLE, T.J., MATTHEWS, K.R. **Food microbiology: an introduction**, ASM Press, Washington 2005.

[4] TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.K. **Microbiology an introduction, 9.vydání**, Pearson Education, San Francisco 2007.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Magda Doležalová**
Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce: **16. února 2009**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. května 2009**

Ve Zlíně dne 31. května 2009


doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Bakalářská práce se v teoretické části zabývá dehydrovanými výrobky a velmi často se v nich vyskytující bakterií rodu *Bacillus*. *Bacillus cereus* je schopen produkovat toxiny, které bývají častými původci dvou odlišných alimentárních nemocí. Emetický toxin, cereulid, je tvořen v potravině a je příčinou tzv. dávivého syndromu. Enterotoxiny, které vyvolávají průjemové onemocnění, jsou na rozdíl od cereulidu tvořeny v tenkém střevě člověka. V praktické části bylo z mikrobiologického hlediska analyzováno pět různých vzorků dehydrovaných výrobků.

Klíčová slova: *Bacillus*, *Bacillus cereus*, cereulid, dehydrované výrobky, enterotoxiny

ABSTRACT

Bachelor thesis deals with dehydrated products and genera *Bacillus*, which mostly occurs in this kind of foodstuff. *Bacillus cereus* is able to produce toxins, which are causes of two different food-borne illnesses. Emetic toxin, cereulid, is created in foodstuff and is a cause of emetic syndrome. Enterotoxins, which are created in small intestine of host, bring on diarrheal syndrome. In experimental part of this work, microbiological analyses of five different dehydrated products were performed.

Keywords: *Bacillus*, *Bacillus cereus*, cereulid, dehydrated products, enterotoxins

V první řadě bych chtěla poděkovat své vedoucí bakalářské práce, Mgr. Magdě Doležalové, za poskytnutí odborných rad a materiálů a také za čas, který mi věnovala při vypracovávání mé práce. Dále bych chtěla poděkovat laborantkám, paní Olze Haukové a slečně Haně Miklíkové, za pomocnou ruku při zpracovávání praktické části.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodičům a všem blízkým, kteří mě po dobu mého studia podporovali.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....

Podpis

OBSAH

ÚVOD.....	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 VÝZNAM RODU <i>BACILLUS</i> V POTRAVINÁŘSTVÍ, JEHO POPIS A CHARAKTERISTIKA	10
1.1 <i>BACILLUS COAGULANS</i>	11
1.2 <i>BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS</i>	12
1.3 <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	12
1.4 <i>BACILLUS LICHENIFORMIS</i>	12
1.5 <i>BACILLUS ANTHRACIS</i>	13
1.6 <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	14
1.7 VÝZNAM RODU <i>BACILLUS</i> V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	14
1.7.1 Mléko a mléčné výrobky	14
1.7.2 Obilí.....	15
1.7.3 Vejce.....	15
1.7.4 Kakao	15
1.7.5 Konzervy	15
1.7.6 Ostatní potraviny	16
2 <i>BACILLUS CEREUS</i>	17
2.1 CHARAKTERISTIKA ALIMENTÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ.....	18
2.1.1 Infekční dávky	19
2.2 VIRULENTNÍ FAKTORY A MECHANIZMUS NÁKAZY	19
2.2.1 Emetický toxin	19
2.2.2 Enterotoxiny	20
2.2.3 Spory	20
3 DEHYDROVANÉ POTRAVINY	22
3.1 POŽADAVKY NA DEHYDROVANÉ POTRAVINY DLE ZÁKONA.....	22
3.2 MIKROBIOLOGICKÉ POŽADAVKY NA DEHYDROVANÉ POTRAVINY	23
4 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	26
II PRAKTICKÁ ČÁST	27
5 MATERIÁL A METODIKA	28

5.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY	28
5.2	KULTIVAČNÍ PŮDY.....	28
5.3	CHEMIKÁLIE	32
5.4	POUŽITÉ VZORKY POTRAVIN.....	33
5.5	ODBĚR VZORKŮ A KULTIVACE NA JEDNOTLIVÝCH MÉDIÍCH.....	33
5.6	IDENTIFIKACE KMENŮ.....	34
5.6.1	Barvení dle Grama	34
5.6.2	Barvení spor	34
5.6.3	KOH test.....	34
5.6.4	Oxidačně fermentační test (OFT).....	35
5.6.5	Důkaz produkce katalázy	35
5.6.6	Důkaz produkce oxidázy (OXI)	35
5.6.7	Voges-Proskauerův test (VPT).....	35
5.6.8	Test aktivity β -galaktosidázy (ONP).....	35
5.6.9	ENTEROtest	36
5.6.10	NEFERMtest	36
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
6.1	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR VZORKŮ.....	37
6.2	IDENTIFIKACE IZOLÁTŮ	39
	ZÁVĚR	42
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	44
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	48
	SEZNAM OBRÁZKŮ	49
	SEZNAM TABULEK.....	50
	SEZNAM PŘÍLOH.....	51

ÚVOD

V současné době existuje mnoho organizací a systémů, které se zabývají bezpečností potravin. Zároveň se neustále zdokonaluje výrobní technika, která by měla pomoci zajistit nezávadnost potravin. Ovšem i přes veškeré snahy se může stát, že dojde k mikrobiální kontaminaci jednotlivých surovin či potravin, což může následně vést ke vzniku alimentárních nemocí. Jednou z nejznámějších nemocí je salmonelóza (původci jsou bakterie z rodu *Salmonella*). Mezi další mikroorganismy vyvolávající tento typ onemocnění patří například bakteriální rody *Listeria*, *Campylobacter* nebo *Bacillus*, z kvasinek *Candida* sp. a z plísní *Aspergillus* sp. nebo *Fusarium* sp.

V předložené bakalářské práci je pozornost upřena na bakteriální rod *Bacillus*. Nejznámější je pravděpodobně *Bacillus anthracis*. Do podvědomí veřejnosti se tento mikroorganismus dostal především ve spojení s bioterorizmem. Přítomnost *B. anthracis* v lidském těle mívá často smrtelné následky. Práce je zaměřena na *Bacillus cereus*, který má tu schopnost, resp. jeho toxiny, vyvolat otravu potravinami. Na rozdíl od *B. anthracis* nebývají jeho následky smrtelné. Ve většině případů není onemocnění způsobené *B. cereus* léčeno, protože průběh nemoci bývá velmi rychlý a krátký.

Dehydrované výrobky jsou v dnešní době konzumovány především díky své rychlosti a jednoduchosti přípravy. Do této skupiny potravin patří zejména široká škála polévek, dětské stravy nebo různých směsí pro přípravu pokrmů. Mikroorganismy, které se zde vyskytují nejčastěji, jsou především salmonely, *Clostridium perfringens* nebo *Bacillus cereus*.

Cílem praktické části bylo provést mikrobiologický rozbor pěti vzorků dehydrovaných výrobků a následně izolovat a identifikovat bakteriální kmeny.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VÝZNAM RODU *BACILLUS* V POTRAVINÁŘSTVÍ, JEHO POPIS A CHARAKTERISTIKA

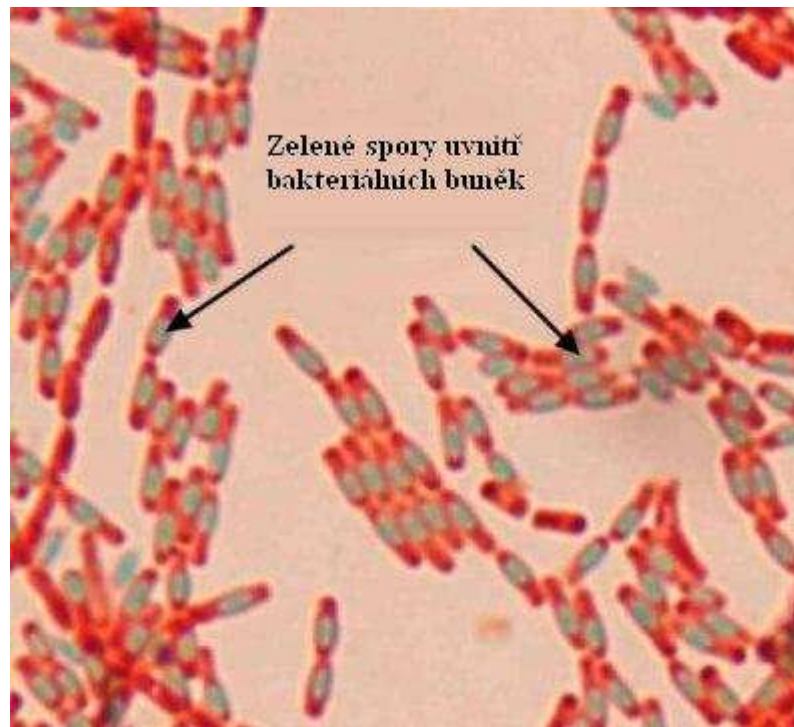
Zařazení rodu *Bacillus*: doména *Bacteria*, kmen *Firmicutes*, třída *Bacilli* a řád *Bacillales*. *Bacillus* sp. jsou grampozitivní sporulující aerobní, popř. fakultativně anaerobní bakterie. Jejich tvarem jsou delší tyčinky, které se někdy mohou shlukovat do řetízků [1]. Jejich výskyt je velmi rozličný: od půdy, přes rostliny a vodu, až po potraviny a suroviny. Z biochemických znaků je pro ně charakteristické štěpení bílkovin za vzniku amoniaku a fermentace sacharidů s málo výraznou tvorbou kyselin (některé s tvorbou plynu). Jsou to kataláza pozitivní a oxidáza variabilní mikroorganismy redukující dusičnany. Dalším významným znakem je tvorba spor (*Obr. 1*). Při sporulaci se nemění tvar buňky, přičemž spory bývají lokalizovány v různých částech sporangia (centrálně, paracentrálně, subterminálně, terminálně nebo laterálně). Sporulace probíhá za přístupu kyslíku. S výjimkou *B. anthracis* jsou pohyblivé [2], [3], [4].

Bakterie tohoto rodu velmi dobře rostou na běžných agarových půdách v aerobní atmosféře. Morfologie kolonií je značně rozmanitá. Časté jsou růstové fáze S a R, vyskytuje se i plazivý růst. Druhy, a někdy i kmeny téhož druhu, rodu *Bacillus* rostou v rozdílných teplotách. Například k psychrotolerantním mikroorganismům patří *B. insolitus*, k mezofilním *B. cereus* nebo *B. subtilis* a k termofilním *B. stearothermophilus*. Nejlépe rostou v prostředí o pH 5,5 – 8,5, ovšem některé, jako *B. coagulans*, rostou i při pH nižším než 5 [3].

Medicínsky významnou bakterií tohoto rodu je *B. anthracis*, je patogenem zvířat a člověka a je původcem respiračního onemocnění tzv. sněti slezinné (antrax). Další druhy bacilů se podílejí na kontaminaci potravin, krmiv a surovin živočišného původu. Významné jsou zejména enterotoxigenní kmeny *B. cereus*. Významnou skupinu představují i druhy patogenní pro hmyz jako například *B. thuringiensis*, často užívaný pro výrobu pesticidů. Je velmi zajímavé, že *B. anthracis* je geneticky (podle chromozomální DNA) neodlišitelný od druhů *B. thuringiensis* a *B. cereus*. Oba prvně uvedené druhy zřejmě vznikly evolucí z druhu *B. cereus*. Tato skupina byla pojmenována *Bacillus cereus sensu lato* a mimo již tři uvedené bakterie sem patří *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* a *B. weihenstephanensis* [4].

Tvar endospory a mateřské buňky jsou charakteristickými znaky jednotlivých druhů bacilů využitelnými v taxonomii. Podle těchto charakteristik je možno *Bacillus* sp. rozdělit do tří

morfoložických skupin. I. morfoložická skupina zahrnuje endospory oválného tvaru, které neztlušťují buňku. Pro veterinární medicínu je nejvýznamnější. Do této skupiny patří: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. lichnofomis*, *B. mycoides* a *B. thuringiensis*. II. morfoložická skupina je typická tvorbou endospor oválného tvaru, které ztlušťují mateřskou buňku. Mezi zástupce se řadí *B. circulans*, *B. coagulans* nebo *B. alcalophilus*. Do III. morfoložické skupiny se řadí bakterie tvořící endospory kulatého tvaru, které vždy ztlušťují mateřskou buňku [5].



Obr. 1 Mikroskopické zobrazení *Bacillus* sp. a jejich spor [6]

1.1 *Bacillus coagulans*

Bacillus coagulans je aerobní až mikroaerofilní bakterie tvořící kyselinu mléčnou. Jako ostatní druhy rodu *Bacillus* tvoří spory, které jsou odolné vůči chemickým a fyzikálním vlivům. Optimální teplotu růstu má kolem 50 °C. V potravinářství je poměrně častou příčinnou kažení výrobků. Tento druh bakterie produkuje kyselinu L-(+)-mléčnou, ovšem nelze jej řadit mezi bakterie mléčného kvašení a to z důvodu tvorby spor. V dnešní době se tato bakterie využívá i jako probiotikum [7].

1.2 *Bacillus stearothermophilus*

Bacillus stearothermophilus patří mezi termofilní bakterie rodu *Bacillus*. Tato bakterie se nachází v půdě, horkých pramenech či sedimentech oceánů. Sterilizace je široce používaným procesem v potravinářském průmyslu již mnoho let, a protože je *B. stearothermophilus* nepatogenní termofilní a také sporotvornou bakterií, je výborným indikátorem procesu letality mikroorganismů. Díky extrémní teplotní rezistenci jeho spor se v konzervářském průmyslu využívá ke zhodnocení efektivity sterilizace [8].

1.3 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je bakterie běžně se vyskytující v půdě. Má schopnost tvořit velmi tvrdé, ochranné endospory, což umožňuje jeho přežití i v extrémních podmínkách životního prostředí. Tento bacil není považován za lidský patogen. Může kontaminovat potraviny, ale jen zřídka kdy způsobí otravu. Ovšem je potenciálním patogenem skotu, kdy u něj může způsobit zánět vemene. *B. subtilis* produkuje extracelulární enzym známý jako subtilisin. Ačkoliv je jeho toxicita nízká, může u některých jedinců, kteří jsou v častém styku s tímto toxinem, způsobit alergickou reakci. Subtilisin a některé jeho další enzymy jsou široce používány jako přídatné látky do pracích prostředků. Jsou známy případy alergické či hypersenzitivní reakce, včetně dermatitidy a respiračních potíží, které jsou spojeny s používáním těchto pracích prostředků [9].

1.4 *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis se běžně vyskytuje v půdě a bývá kontaminantem mléčných produktů. Bylo zjištěno, že se může vyskytovat i na ptačím peří. Je to termofilní bakterie s optimem růstu okolo 50 °C, ovšem může přežít i vyšší teploty. Včetně alimentárních onemocnění lze *B. licheniformis* spojit se septikémií, peritonitidou u člověka; a s toxémií a potraty u skotu. Alimentární onemocnění způsobené tímto mikroorganizmem jsou spojeny s vařeným masem a zeleninou. Příznaky jsou bolest žaludku, průjem a zvracení. Příznaky obvykle nastoupí do 2 – 14 hodin, ale netrvají déle než 36 hodin [10].

Tato bakterie se uměle kultivuje za účelem získání proteáz, které se využívají při výrobě pracích prášků. Proteáza umožňuje snazší odstranění bílkovin z oděvů – jsou použity nižší teploty, které šetří oděv a spotřebu energie [10].

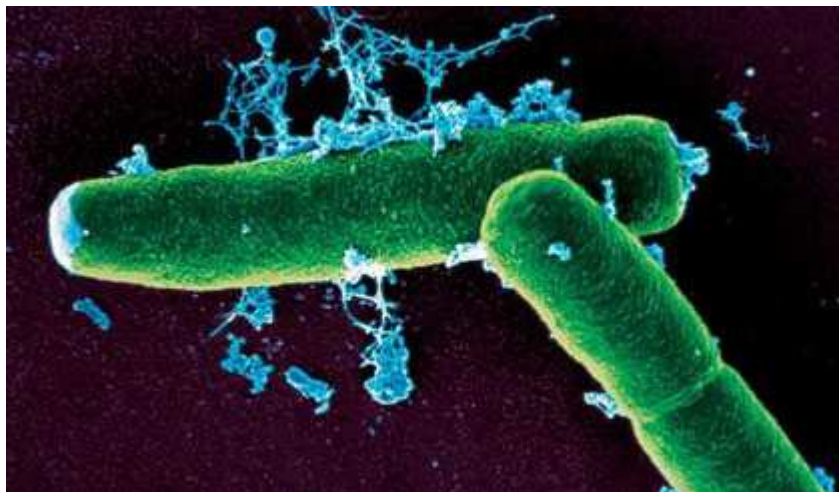
1.5 *Bacillus anthracis*

Bacillus anthracis (Obr. 2) je patogenní pro savce, u nichž vyvolává sněť slezinnou (antrax). Antrax člověka se vyskytuje po aspiraci spor nebo po perorálním podání kontaminované potravy. Můžeme se setkat se třemi druhy antraxu: kožní, plicní a střevní. Nejčastěji se vyskytuje antrax kožní, související s infekcí oděrek [11]. Antrax se stal předmětem bioterorizmu v USA vzhledem ke své vysoké stabilitě spor a nízké infekční dávce pro člověka při snadném přenosu aerogenní cestou [4].

Ze zvířat jsou k antraxu nejvýmavější býložravci a prasata. Naopak kočka a pes, jako masožravci patří k nejméně vnímavým živočichům. Ptáci jsou vzhledem k teplotě svého těla téměř rezistentní, podobně jako studenokrevná zvířata. K infekci dochází obvykle perorálně krmivem kontaminovaným spory, vyloučena není ani infekce aspirací [4].

Ve vyspělých zemích Evropy se antrax zvířat vyskytuje pouze sporadicky v souvislosti s importem surovin živočišného původu, zejména kůží obsahující spory *B. anthracis* z jiných světadílů [4].

Tento mikroorganismus je rezistentní vůči mnohým antibiotikům, ovšem je velmi citlivý k účinkům penicilinu, i když existují i rezistentní kmeny. V minulosti byl preferován právě penicilin při léčbě antraxu [11]. Pro léčbu člověka se používá v dnešní době ciprofloxacin [4].



Obr. 2. *Bacillus anthracis* [12]

1.6 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis je patogenem hmyzu, proto se používá jako biologický insekticid. Insekticidy jsou založeny na produkci δ -endotoxinů (krystalových proteinů), které lze komerčně dostat v práškových preparátech či granulích obsahujících směs endospor a proteinů. Pomocí těchto produktů je možno chránit úrodu okurek, rajčat nebo vinných hroznů. Spory tohoto mikroorganismu mohou zůstat jako rezidua v potravinách, které jsou chráněny insekticidy tohoto druhu. Například v Číně, kde se hojně používá těchto pesticidů, bylo zjištěno, že endospory zůstávají dlouhou dobu v čaji, a nejsou posléze odstraněny ani při výrobě zeleného čaje. Spory přežívají pasteraci a dále klíčí a množí se v nápojích připravovaných z čaje. Díky redukci obsahu dusíku a kyslíku v lahvích, které obsahují čaj, se obsah *B. thuringiensis* pohybuje ve velmi malém množství (10^{-1} CFU.ml⁻¹). Kvůli produkci enterotoxinů může být přítomnost tohoto bacila v čaji jistým rizikem pro lidské zdraví [13].

1.7 Význam rodu *Bacillus* v potravinářství

Rod *Bacillus* je považován za jeden z mnoha indikátorů primární a sekundární kontaminace surovin a potravin.

1.7.1 Mléko a mléčné výrobky

Velký význam má rod *Bacillus* v mlékárenství. Při dojení mléka dochází k prvotní kontaminaci a to mikroflórou z povrchu vemene, kde se vyskytují i zástupci tohoto rodu. Po tepelném ošetření jsou to právě spory *Bacillus* sp., které zůstávají v mléce. Mohou nastat problémy se sporami *B. stearothermophilus* nebo *B. sporothermodurans*, které jsou vysoce rezistentní i vůči sterilizačním teplotám [3], [14].

U mléčných výrobků především závisí na původním obsahu těchto bakterií v mléce a prostředí. Výrobu slazeného zahuštěného mléka mohou přežívat spory *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* nebo *B. subtilis*, které při nevhodném skladování klíčí. U neslazeného zahuštěného mléka tvoří bacily H₂ a CO₂ a současně sráží mléko. Dalším výrobkem, na který mají bacily negativní vliv, jsou sýry (*Tab. 1*).

Tab. 1. Vady sýrů způsobené bakteriemi z rodu *Bacillus* [3]

Vada	Druh sýru	Druh bacilu
hořká chuť	všechny druhy sýrů	<i>B. cereus</i> var. <i>mycooides</i> , <i>B. brevis</i>
červené skvrny	měkké sýry	<i>B. fusci</i>
hnědé skvrny	sýry s plísní v těstě	<i>B. mesentericum</i> var. <i>niger</i>
modrání sýrů	všechny sýry	<i>B. cyaneofuscus</i>
černání sýrů	měkké a kyselé sýry	<i>B. demingrams</i>
roztékání sýrů	měkké a kyselé sýry	<i>B. cereus</i> var. <i>mycooides</i> , <i>B. brevis</i>

1.7.2 Obilí

Další velkou skupinou, kde můžeme najít bacily je obilí, na nějž se bakterie dostávají z prostředí – půda, vzduch. V tomto druhu surovin mohou bakterie tohoto rodu působit velké problémy. Pečení mohou přežívat spory *B. subtilis* a *B. licheniformis*, tvoří sliz, který způsobuje nitkovitost a tažnost chleba, což způsobí nepřírozené zbarvení a mazlavost kůrky a tvoří se lepkavé, elastické slizovité nitky [3], [14].

1.7.3 Vejce

Do vajec nejčastěji pronikají mikroorganismy z vnějšího prostředí. Vaječný bílek se proti těmto mikroorganizmům, mezi kterými jsou i bacily, chrání lysozymem. Účinnost lysozymu přestává v okamžiku, kdy se smísí bílek se žloutkem [3].

1.7.4 Kakao

Mikroflóra kakaa je převážně tvořena zástupci rodu *Bacillus*, a to *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. alvei*, *B. licheniformis*, a *B. megaterium*. Mohou se zde vyskytovat i termofilní druhy jako *B. stearothermophilus* či *B. coagulans*. Počty spor bacilů se mění hlavně v závislosti na použité technologii výroby, ale většinou nepřekračují hodnotu 10^4 CFU.g⁻¹. Z kakaa se dostávají spory bacilů do čokolády a čokoládových cukrovinek [14].

1.7.5 Konzervy

Přítomnost bacilů v konzervách svědčí o provedení nedostatečné sterilace výrobku. Kažení může probíhat bez tvorby plynu nebo s tvorbou plnu za vzniku bombáže. Bez tvorby plynu

se u zeleninových konzerv, zejména rajčat vyskytuje plynuprosté kysání. Přitom se hlavně pomnožují *B. stearothermophilus* a *B. coagulans*. Dochází k tvorbě kyselin a mění se chuť a vůně. Teplotní rozmezí růstu pro tyto mikroorganismy je 30 – 60 °C, přičemž *B. stearothermophilus* je schopen růst i při 75 °C. Velmi často dochází k bombáži konzerv, jednou z příčin jsou fakultativně anaerobní bakterie *B. cereus*, *B. subtilis* nebo *B. circulans*. U konzerv je většinou vyžadována tzv. komerční sterilita, což znamená, že výrobky mohou obsahovat spory aerobních mikroorganismů, a to jen pouze v desítkách na gram [3], [14].

1.7.6 Ostatní potraviny

Z dalších surovin se bacily vyskytují v koření – převážně *B. cereus* [14]. Dále se objevují v zelenině, kvašené nebo sušené. *B. subtilis* je jednou z možných příčin měknutí okurek, kdy je nízký obsah soli a málo kyselého prostředí uvnitř okurky. U sušené zeleniny jsou spory bacilů schopny přežívat, a proto mohou být posléze přeneseny do finálního výrobku. Maso je bacily kontaminováno sekundárně. Zde mohou bacily způsobit rozklad bílkovin, jelikož mají bohatý proteolytický enzymový aparát [3].

2 *BACILLUS CEREUS*

Bacillus cereus je grampozitivní fakultativně anaerobní bakterie ve tvaru tyčinek, jejichž velikost se pohybuje od 1,0 μm do 5,0 μm . Na masopeptonovém agaru tvoří tato bakterie mírně našedlé matné kolonie (velikost 3 – 8 mm), které mají nepravidelné hranice a jsou rovinného rázu. Většina kmenů tvoří na běžně užívaném agaru spory již během několika dní. Spory *Bacillus cereus* jsou vysoce termorezistentní. Většina kmenů je schopna produkce toxinu. Mezi další charakteristické rysy pro identifikaci patří pohyblivost, hemolýza, fermentace cukrů (kromě mannitolu) a produkce lecitinázy [15].

Bacillus cereus je saprofyt, široce rozšířený v přírodě. Velmi často je izolován z půdy, rostlin a vody. Roste na rozkládajících se zbytcích rostlin v půdě, hnoji a krmivech. Z prostředí bakterie snadno kontaminují potraviny. Příkladem je kontaminace kravských vemen. Bakterie se dostávají na vemen z půdy a trávy, posléze při dojení se dostávají bakterie do mléka [3], [4].

Pro izolaci a detekci *B. cereus* z potravin se využívají různá média, např. MYP = Mannitol Egg Yolk Phenol Red Polymyxin Agar nebo PEMBA % Polymyxin Pyruvate Egg Yolk Mannitol Bromthymol Blue Agar (Obr. 3). Tato média obsahují selektivní složky jako je například polymyxin nebo mannitol, který *B. cereus* nezkvašuje [15].



Obr. 3. Růst *B. cereus* na PEMBA agaru [16]

2.1 Charakteristika alimentárních onemocnění

V padesátých letech dvacátého století byl *Bacillus cereus* zařazen mezi mikroorganismy, které vyvolávají otravu potravinami. Stalo se tak po tom, co v letech 1947 až 1949 došlo celkem čtyřikrát k rozsáhlému průjmovému onemocnění (nákaza postihla přibližně 600 lidí ze tří nemocnic a domova důchodců) [17]. V současné době jsou známi dvě alimentární onemocnění způsobené tímto bacilem, emetické a průjmové (Tab. 2). Obě onemocnění jsou klasifikována jako méně závažná ovšem jsou známi vážnější až letální případy [18].

Tab. 2. Charakteristika onemocnění způsobená *Bacillus cereus* [15]

Charakteristika	Průjmové onemocnění	Emetické onemocnění
typ toxinu	protein; enterotoxiny: Hbl, Nhe, CytK	cyklický peptid; emetický toxin (cereulid)
místo produkce toxinů	tenké střevo hostitele	potravin
infekční množství	$10^5 - 10^7$ (všechny buňky)	$10^5 - 10^8$ (CFU.g ⁻¹)
inkubační doba	8 – 16 h (ojediněle do 24 h)	0,5 – 6 h
doba trvání nemoci	12 – 24 h (ojediněle pár dní)	6 – 24 h
symptomy	bolest břicha, řídký průjem a ojediněle nevolnost	nevolnost, zvracení, křeče
druh potravin	masné produkty, polévky, zelenina, pudinky, párky, mléko a mléčné produkty	opékaná a vařená rýže, těstoviny, nudle a cukrářské zboží

V padesátých letech dvacátého století bylo v Norsku prvně popsáno průjmové onemocnění způsobené *B. cereus*. Jedná se o infekci způsobenou vegetativními buňkami, které produkují enterotoxiny proteinové povahy v tenkém střevě. Vegetativní buňky mohou být přijaty buď jako životaschopné buňky nebo spory. Mezi typické příznaky průjmového onemocnění patří bolesti břicha, vodnatý průjem a příležitostně nevolnost či zvracení. Inkubační doba je něco přes 6 hodin, nejběžněji se pohybuje v rozmezí od 8 do 16 hodin. Nemoc trvá přibližně 12 – 24 hodin, ovšem jsou známy i případy, kdy nemoc trvala déle [15].

Dávivý syndrom byl prvně identifikován ve Velké Británii v sedmdesátých letech dvacátého století, kdy došlo k několika případům nákazy způsobenou konzumací uvařené rýže. Tato nemoc je intoxikací. Je způsobená emetickým toxinem, který *Bacillus cereus*

vyprodukuje v připravené potravíně. Následnou konzumací se toxin dostane do zažívacího traktu člověka. Průběh nemoci je doprovázen nevolností a následným zvracením. Inkubační doba je 0,5 – 6 hodin. Samotná nemoc trvá přibližně 6 – 24 hodin [15], [18], [19].

2.1.1 Infekční dávky

V potravinách, které vyvolaly otravu, se počet buněk *B. cereus* pohyboval v rozmezí $2 \cdot 10^2$ až $10^9 \text{ g}^{-1} (\text{ml}^{-1})$. Celková infekční dávka kolísá mezi 10^5 a 10^8 životaschopných buněk nebo spor. Každý pokrm obsahující více jak 10^3 buněk *B. cereus* na 1 gram nelze považovat za zcela bezpečné ke konzumaci [19].

2.2 Virulentní faktory a mechanismus nákazy

Odlišné typy toxinů způsobují dva typy alimentárních onemocnění bakteriemi *Bacillus cereus*. Zvracení způsobuje emetický toxin, zatímco průjemové onemocnění spouští enterotoxiny.

2.2.1 Emetický toxin

Emetický toxin způsobuje pouze zvracení. Jeho struktura byla dříve neznámá, ovšem s pokrokem doby byl toxin detekován pomocí Hep-2 buněk, což vedlo k jeho izolaci a posléze popisu jeho struktury. Tento toxin byl pojmenován cereulid. Jeho kruhová struktura je tvořena třemi opakováními čtyř aminokyselinami a/nebo oxokyselinami: (D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val)₃ [18].

Tvorba cereulidu začíná na konci logaritmické fáze během vegetativního růstu *B. cereus*, která nesouvisí se sporulací. Syntéza tohoto toxinu se pohybuje v teplotním rozmezí 12 – 37 °C, přičemž největší produkce byla zaznamenána mezi 12 – 22 °C. Mezi další faktory, které ovlivňují produkci toxinu, patří přístup kyslíku, pH nebo přítomnost specifických aminokyselin [15].

Přesný mechanismus intoxikace emetickým toxinem není dosud přesně znám, ale byly popsány některé biologické účinky tohoto toxinu [15]. Cereulid vystupuje jako kation [20]. Mezi účinky emetického toxinu patří poškození buněk a inhibice buněk imunitního systému [15]. Ve dvou případech došlo působením toxinu k selhání jater. To mělo za následek úmrtí švýcarského chlapce ve věku 17 let a belgické sedmileté dívky [21], [22].

Tento toxin je rezistentní vůči teplu, kyselému prostředí a proteolýze, proto odolává žlučedním kyselinám a proteolytickým střevním enzymům. Může se tedy vyskytovat v ohřáté potravě, která byla předtím skladována při pokojové teplotě [15].

2.2.2 Enterotoxiny

Počet enterotoxinů a jejich vlastnosti byly dlouhodobým tématem diskuzí. V dnešní době jsou s průjmovým onemocněním spojovány především tři toxiny: Hbl, Nhe a CytK (Tab. 3).

Před objevením Nhe a CytK byl toxin Hbl považován za primární virulentní faktor. Hbl byl určený jako příčina vzniku akumulované tekutiny v králičí střevní smyčce. Dále je známý svou dermonekrotickou aktivitou, cévní propustností, cytotoxickou aktivitou a hemolytickou aktivitou [19].

Enterotoxin Nhe byl prvně charakterizován v Norsku v roce 1995, kdy došlo k rozsáhlé otravě jídlem *hbl*-negativním kmenem *B. cereus*. Proteiny byly odlišeny od komponent Hbl a na rozdíl od Hbl nebyla zjištěna hemolytická aktivita [15].

CytK je protein s nekrotickou, cytotoxickou a hemolytickou aktivitou. Byl izolován ve Francii v roce 1998. V tomto případě trpělo několik lidí krvavým průjmem a také došlo k úmrtí třech starších lidí [23].

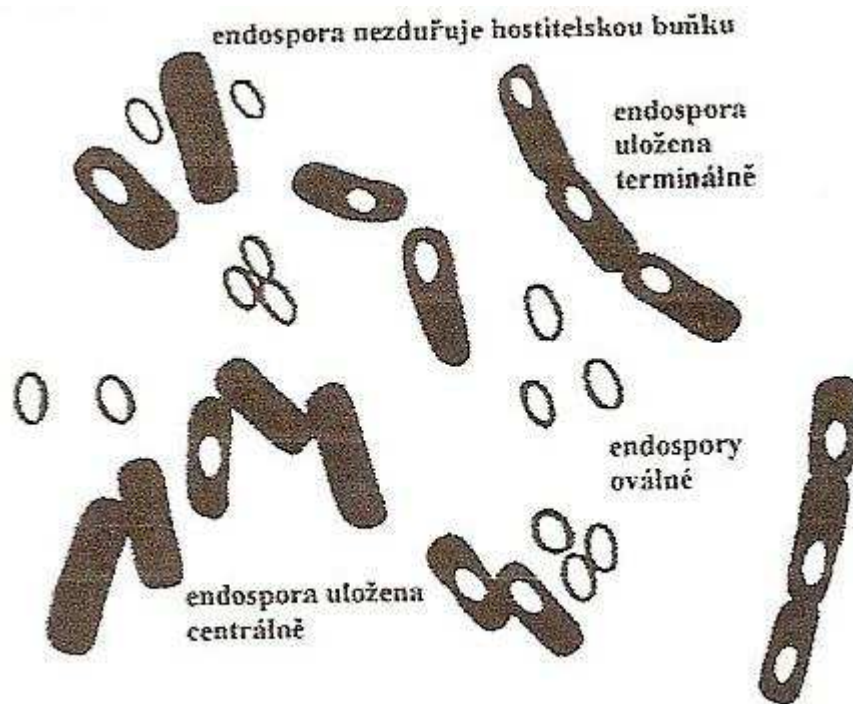
Tab. 3. Skladba enterotoxinů *B. cereus* [15]

Jméno toxinu	Složení toxinu
Hemolysin BL (Hbl)	Geny / Proteiny: <i>hblC</i> / L2 <i>hblD</i> / L1 <i>hblA</i> / B
Nehemolytický enterotoxin (Nhe)	Geny / Proteiny: <i>nheA</i> / A <i>nheB</i> / B <i>nheC</i> / C
Cytotoxin K (CytK)	Gen / Protein: <i>cytK</i> / CytK

2.2.3 Spory

Spory, resp. jejich tvar a umístění, řadí *Bacillus cereus* do I. morfologické skupiny (Obr. 4). Také hrají velmi důležitou roli ve vzniku alimentárních onemocnění. Jsou více hydrofobní než spory jiných druhů rodu *Bacillus*. Tím snáze přilnou k různým povrchům. Pouhými čistícími prostředky jdou odstranit jen velmi těžce, proto je žádoucí používat dezinfekce. Tyto spory také mají pili, které pomáhají při adhezi. Tyto částice umožňují

sporám odolávat sanitaci a tak dále zůstat na površích, odkud se snadno dostanou na potraviny, ale také jim pomáhají v přilnutí k epitelovým buňkám [18].



Obr. 4. Spory *B. anthracis* morfologické skupiny [5]

3 DEHYDROVANÉ POTRAVINY

Podle vyhlášky Ministerstva zemědělství je dehydrovaným výrobkem potravina vzniklá smísením složek se sníženým obsahem vlhkosti, pastovité nebo sypké konzistence, která se před konzumací obnoví zejména tekutinou. V následující tabulce je uvedeno rozdělení dehydrovaných potravin (Tab. 4).

Tab. 4. Členění dehydrovaných potravin na skupiny [24]

Druh	Skupina
Dehydrovaný výrobek	polévka
	omáčka
	bujón
	vývar
	šťáva
	základ pokrmu
	směs pro přípravu hotového pokrmu
	směs pro přípravu dresinku
	směs pro přípravu zálivky
	směs pro přípravu dezertu
	směs pro přípravu krému
	směs pro přípravu polévky
	směs pro přípravu zmrzliny
	přístada do polévky

3.1 Požadavky na dehydrované potraviny dle zákona

Požadavky na jakost:

- a) smyslové požadavky – dehydrované výrobky se hodnotí vždy po přípravě dle návodu. Vzhled, barva, konzistence, chuť a vůně musí být charakteristické pro druh výrobku označený na jeho obalu. Chuť a vůně výrobku musí být vlastní, bez cizích příměsí, nebo jinak změněné chuti a vůně [24]

- b) fyzikální a chemické požadavky – dehydrované výrobky obsahují nejvýše 15 % vody [24]
- c) přípustné záporné hmotnostní odchylky (Tab. 5)

Tab. 5. Přípustné záporné hmotnostní odchylky [24]

Deklarovaná hmotnost [g]	Přípustná záporná odchylka od deklarované hmotnosti [%]
do 50	10
51 – 120	5
121 – 250	4
251 – 1000	3
1001 – 2500	2
nad 2500	1

Označování – kromě údajů uvedených v zákoně se dehydrované výrobky označí:

- a) názvem skupiny, u polévek, omáček a bujónů se doplní názvem druhu
- b) návodem k přípravě

Uvádění do oběhu – dehydrované výrobky se skladují v suchých, chladných a větratelných místnostech na podlážkách, nejméně 5 cm nad zemí a od stěn. Dehydrované výrobky se skladují odděleně od látek s výraznými pachy a vůněmi [25].

3.2 Mikrobiologické požadavky na dehydrované potraviny

Nařízení komise č. 1441/2007 o mikrobiologických kritériích pro potraviny zahrnuje z dehydrovaných potravin: sušené mléko a kojeneckou stravu [26]. V následujících tabulkách (Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8) jsou uvedeny požadavky:

Tab. 6. Sušené mléko a sušená syrovátka [26]

Mikroorganismy, jejich toxiny a metabolity	Plán odběru vzorků		Limity		Fáze, na níž se kritérium vztahuje
	n	c	m	M	
<i>Salmonella</i>	5	0	nepřítomnost ve 25 g		produkty uvedené na trh během doby údržnosti
<i>Enterobacteriaceae</i>	5	0	10 CFU.g ⁻¹		konec výrobního procesu
koagulázopozitivní stafylokoky	5	2	10 CFU.g ⁻¹	100 CFU.g ⁻¹	konec výrobního procesu

n = počet jednotek tvořících vzorek; c = počet jednotek vzorku, jejichž hodnoty leží mezi m a M

Tab. 7. Sušená počáteční kojenecká výživa a sušené dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely určené pro kojence do šesti měsíců [26]

Mikroorganismy, jejich toxiny a metabolity	Plán odběru vzorků		Limity		Fáze, na níž se kritérium vztahuje
	n	c	m	M	
<i>Salmonella</i>	30	0	nepřítomnost ve 25 g		produkty uvedené na trh během doby tržnosti
<i>Enterobacter sakazakii</i>	30	0	nepřítomnost v 10 g		produkty uvedené na trh během doby tržnosti
<i>Enterobacteriaceae</i>	10	0	nepřítomnost v 10 g		konec výrobního procesu
předpokládaný výskyt <i>Bacillus cereus</i>	5	1	50 CFU.g ⁻¹	500 CFU.g ⁻¹	konec výrobního procesu

n = počet jednotek tvořících vzorek; c = počet jednotek vzorku, jejichž hodnoty leží mezi m a M

Tab. 8. Sušená pokračovací kojenecká výživa [26]

Mikroorganismy, jejich toxiny a metabolity	Plán odběru vzorků		Limity		Fáze, na níž se kritérium vztahuje
	n	c	m	M	
<i>Salmonella</i>	30	0	nepřítomnost ve 25 g		produkty uvedené na trh během doby tržnosti
<i>Enterobacteriaceae</i>	5	0	nepřítomnost v 10 g		konec výrobního procesu

n = počet jednotek tvořících vzorek; c = počet jednotek vzorku, jejichž hodnoty leží mezi m a M

Dehydrované potraviny (typu polévek, pyré nebo kojenecké stravy), ve kterých je přítomnost spor patogenních *Bacillus* sp. velmi častá, mohou po dehydrataci umožnit růst *Bacillus cereus*. Některé dehydrované potraviny včetně sušené počáteční kojenecké výživy a sušených dietních potravin jsou konzumovány potenciálně choulostivými spotřebiteli. V souladu se stanoviskem European Food Safety Authority (EFSA) by počty spor *Bacillus cereus* v sušené počáteční kojenecké výživě a sušených dietních potravinách měly být co nejnižší. Proto se tedy doporučuje zkrátit prodlevu mezi přípravou jídla a jeho konzumací na co nejkratší dobu [26], [27].

4 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo:

- v teoretické části charakterizovat rod *Bacillus* a některé jeho zástupce, dále popsat význam *Bacillus* sp. v potravinářství
- charakterizovat *Bacillus cereus*, jeho toxiny a s nimi spojené alimentární nemoci
- charakterizovat dehydrované potraviny dle platných zákonů
- v praktické části izolovat bakterie z vybraných dehydrovaných výrobků a následná identifikace vybraných izolátů

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Použité přístroje, zařízení a pomůcky

- Autokláv H+P Varioklav (H+P Labortechnik AG, Německo)
- Biologický termostat BT 120 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika)
- Denzitometr (Lachema, Česká republika)
- Homogenizátor Stomacher (Seward Ltd., Velká Británie)
- Chladnička Electrolux (Electrolux s.r.o., Česká republika)
- Laboratorní sklo
- Mikropipety – 100 – 1000 μ l (BIOHIT plc., Finsko)
- Mikroskop MOTIC BA 200
- Plynový kahan
- Váhy – Kern 440 – 47N
- Vortex (Heidolph Reax, Německo)

5.2 Kultivační půdy

- Mannitol Yolk Polymixin Agar – HiMedia, Indie (*Tab. 9*)
- Tryptone Yeast Extract Agar – HiMedia, Indie (*Tab. 10*)
- Bacillus cereus Agar Base – HiMedia, Indie (*Tab. 11*)
- Masopeptonový Agar – HiMedia, Indie (*Tab. 12*)
- Endo Agar – HiMedia, Indie (*Tab. 13*)
- Slanetz-Bartley Agar – HiMedia, Indie (*Tab. 14*)
- Violet Red Bile Agar – Bio-Rad, France (*Tab. 15*)

Tab. 9. Mannitol Yolk Polymixin Agar

Agar	MYP		
Složení	složka	c [g.l ⁻¹]	Návod k přípravě
	masový extrakt	1,0	Bylo naváženo 46,0 g přípravku do 900,0 ml destilované vody. Směs byla zahřívána do úplného rozpuštění přípravku. Medium bylo autoklávováno při 121 °C po dobu 15 minut a zchlazeno na 55 °C. Sterilně byly přidány suplementy.
	pepton	10,0	
	D-mannitol	10,0	
	chlorid sodný	10,0	
	fenolová červeň	0,025	Použití
	agar	15,0	Médium je určeno k izolaci a identifikaci <i>Bacillus</i> spp. a patogenních stafylokoků.
Přídavek	polymyxin B		
	žloutková emulze		
pH	7,1 ± 0,2		

Tab. 10. Tryptone Yeast Extract Agar

Agar	TYE		
Složení	složka	c [g.l ⁻¹]	Návod k přípravě
	kaseinový hydrolyzát	10,0	Bylo naváženo 41,5 g přípravku do 1000,0 ml destilované vody. Směs byla zahřívána do úplného rozpuštění přípravku. Medium bylo autoklávováno při 121 °C po dobu 15 minut.
	kvasničný extrakt	1,5	
	dextróza	10,0	
	chlorid sodný	5,0	
	bromkresolová červeň	0,015	Použití
	agar	15,0	Médium se využívá k identifikaci bakterií z čeledi <i>Enterobacteriaceae</i> a pro <i>Bacillus cereus</i> .
pH	7,0 ± 0,2		

Tab. 11. *Bacillus cereus* Agar Base = Polymyxin Pyruvate Egg Yolk Mannitol Bromthymol Blue Agar

Agar	PEMBA		
Složení	složka	c [g.l ⁻¹]	Návod k přípravě
	pepton	1,0	Bylo naváženo 20,5 g přípravku do 475,0 ml destilované vody. Směs byla zahřívána do úplného rozpuštění přípravku. Medium bylo autoklávováno při 121 °C po dobu 15 minut a zchlazeno na 50 °C. Sterilně byly přidány suplementy.
	mannitol	10,0	
	chlorid sodný	2,0	
	siřičitan hořečnatý	0,1	
	pyruvát sodný	10,0	
	bromthymolová modř	0,12	
	hydrogenfosforečnan sodný	2,5	
	dihydrogenfosforečnan draselný	0,25	Médium se využívá ke kultivaci <i>Bacillus cereus</i> .
	agar	15,0	
Přídavek	polymixin B		
	žloutková emulze		
pH	7,1 ± 0,2		

Tab. 12. Masopeptonový agar

Agar	MPA		
Složení	složka	c [g.l ⁻¹]	Návod k přípravě
	masový výtažek	3,0	Jednotlivé složky byly naváženy a rozpuštěny v 1000,0 ml destilované vody. Medium bylo autoklávováno při 121 °C po dobu 15 minut.
	pepton	5,0	
	chlorid sodný	3,0	
	agar	15,0	Použití
pH	7,0 ± 0,2		Patří mezi univerzální média.

Tab. 13. Endo Agar

Agar	EA		
Složení	složka	c [g.l ⁻¹]	Návod k přípravě
	pepton	10,0	Bylo naváženo 41,5 g přípravku do 1000,0 ml destilované vody. Směs byla zahřívána do úplného rozpuštění přípravku. Medium bylo autoklávováno při 121 °C po dobu 15 minut.
	laktóza	10,0	
	bazický fuchsin	0,5	
	hydrogenfosforečnan draselný	3,5	
	siřičitan sodný	2,5	
	agar	15,0	
pH	7,5 ± 0,2		Použití
			Médium se používá ke stanovení koliformních tyčinek a enterobakterií.

Tab. 14. Slanetz-Bartley Agar

Agar	SB		
Složení	složka	c [g.l ⁻¹]	Návod k přípravě
	tryptóza	20,0	Bylo naváženo 46,5 g přípravku do 1000,0 ml destilované vody. Směs byla opatrně zahřívána do úplného rozpuštění přípravku. Směs byla ochlazená ve vodní lázni na 50 °C. Neautoklávováno.
	kvasničný extrakt	5,0	
	hydrogenfosforečnan sodný	4,0	
	azid sodný	0,4	
	trifenyltetrazolium chlorid	0,1	
	glukóza	2,0	Použití
	agar	10,0	
pH	7,2 ± 0,2		Médium se využívá ke stanovení fekálních enterokoků.

Tab. 15. Violet Red Bile Agar

Agar	VRBA		
Složení	složka	c [g.l ⁻¹]	Návod k přípravě
	pepton	7,0	Bylo naváženo 38 g přípravku do 1000,0 ml destilované vody. Směs byla zahřívána do úplného rozpuštění přípravku. Neautoklávováno.
	kvasničný extrakt	3,0	
	laktóza	10,0	
	chlorid sodný	5,0	Použití
	žlučové soli	1,5	Médium se využívá k identifikaci koliformních bakterií.
	neutrální červeň	0,03	
	krystalová violet'	0,002	
	agar	15,0	
pH	7,4 ± 0,2		

5.3 Chemikálie

- Fyziologický roztok (Složení: 8,5 g NaCl; 1000 ml H₂O)
- Hydroxid draselný - 2% roztok KOH (Výrobce: Ing. Petr Lukeš, Česká republika)
- Chlorid sodný (Výrobce: Ing. Petr Lukeš, Česká republika)
- Karbolfuchsin (Složení: 1 g bazický fuchsin; 10 ml etanol_{96%}; 5% fenol v H₂O)
- Krystalová violet' (Složení: 5 g krystalová violet'; 200 ml etanol_{96%}; 1 % oxalát amonný)
- Lugolův roztok (Složení: 1 g I₂; 2 g KI; 300 ml H₂O)
- Peroxid vodíku - 3% roztok H₂O₂ (Výrobce: Ing. Petr Lukeš, Česká republika)

5.4 Použité vzorky potravin

VZOREK Č. 1



Mléčnoobilná kaše s broskvemi a meruňkami
Výrobce: HiPP, Chorvatsko
Minimální trvanlivost do 2.1.2009

VZOREK Č. 2



Chlupaté knedlíky
Výrobce: Vitana a.s., Česká republika
Minimální trvanlivost do 29.10.2008

VZOREK Č. 3



Creamy vegetable soup
Výrobce: Hügli Food s.r.o., Česká republika
Minimální trvanlivost do 30.1.2009

VZOREK Č. 4



Sušená bramborová kaše s mlékem
Výrobce: NATURAMYL a.s., Česká republika
Minimální trvanlivost do 16.6.2009

VZOREK Č. 5



Coffee Creamer
Výrobce: FoodCare Sp. z o.o., Polsko
Minimální trvanlivost do července 2010

5.5 Odběr vzorků a kultivace na jednotlivých médiích

Při odběru vzorků byly použity vždy sterilní nástroje. 5 g vzorku bylo smícháno s 45 ml sterilního fyziologického roztoku a důkladně zhomogenizováno ve stomacheru. Mikropipetou bylo na jednotlivé půdy (PEMBA, MYP, TYE, MPA, VRBA, SB a EA)

naneseno množství 0,1 ml suspenze. Ta byla důkladně rozetřena sterilní hokejkou. Petriho misky s médii byly inkubovány následovně PEMBA, MYP, TYE a MPA při 30 °C a VRBA, SB a EA při 37 °C po dobu 24 hodin.

Celkem bylo izolováno 14 bakteriálních kmenů pro identifikaci. K dosažení čistých kultur byl použit křížový roztěr, který byl proveden na Petriho misce s MPA. Misky byly inkubovány při 30 °C po dobu 24 hodin.

5.6 Identifikace kmenů

Úkolem identifikace bakteriální kultury je stanovení příslušnosti studovaného kmene k určité skupině. Při identifikaci využíváme morfologické, biochemické a fyziologické vlastnosti.

5.6.1 Barvení dle Grama

Barvení dle Grama je jednou z nejdůležitějších diagnostických metod při určování rodu a druhu bakterií. Podstatou je barvení fixovaného preparátu a následného moření buněk roztokem jodu (Lugolův roztok). Tím vzniká komplex barviva, jodu a složky buněčné stěny. Je-li tento komplex vyplaven organickým rozpouštědlem z buňky (aceton), jedná se o gramnegativní bakterie, které je nutno dobarvit karbolfuchsinem. Grampozitivní bakterie si zbarvení ponechávají [28].

5.6.2 Barvení spor

Byl připraven fixovaný preparát. Nátěr byl převrstven malachitovou zelení a zahříván do výstupu par. Následně byl preparát opláchnut vodou a dobarven kongo-červení. Bylo opět provedeno opláchnutí a uschlý preparát byl mikroskopován s pomocí imerzního oleje při zvětšení 17x100. Spory byly obarveny zeleně a zbylý buněčný obsah červeně [28].

5.6.3 KOH test

Na podložní sklíčko byla kápnuta kapka 2% roztoku KOH, do níž byla sterilní kličkou vmíchána kultura. Při pomalém odtahování kličky směrem nahoru, bylo sledováno, zda se tvoří viskózní táhnoucí hmota. Viskózní hmota se tvoří u gramnegativních bakterií. U grampozitivních bakterií se tato hmota netvoří, protože silná peptidoglykanová vrstva jejich buněčné stěny je k účinkům louhu odolná

5.6.4 Oxidačně fermentační test (OFT)

Pomocí testu bylo zjišťováno, jak je glukóza využívána mikroorganismy, zda fermentačně nebo aerobní oxidací. Zkumavky byly zaočkovány jednotlivými kulturami vpichem. Jedna zkumavka byla ponechána pro aerobní oxidaci a druhá byla zakapána parafinovým olejem pro zajištění anaerobního prostředí. Zkumavky byly inkubovány při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. V pozitivním případě dojde ke změně barvy média (zelená → žlutá). Složení média na 1000 ml vody: 5 g (NH₄)₂SO₄; 1 g KH₂PO₄; 0,5 g MgSO₄ · 7 H₂O; 10 mg kvasničný extrakt; 1 % glukóza.

5.6.5 Důkaz produkce katalázy

Na podložní sklíčko byla kápnuta kapka 2% roztoku H₂O₂, do níž byla sterilní kličkou vmíchána kultura. Některé bakterie jsou schopny produkovat enzym katalázu, který je schopen rozložit peroxid vodíku na molekulární kyslík a vodu. Pozitivní reakce se projeví uvolňováním bublinek O₂ bezprostředně po přidání kultury.

5.6.6 Důkaz produkce oxidázy (OXI)

Test (papírkový test od firmy Lachema, Česká republika) je zaměřený na produkci enzymu cytochromoxidázy, který se podílí na oxidativních procesech v buňce. Sterilní očkovací kličkou byla odebrána čistá kultura a vetřena do testovací zóny proužku. Pozitivní test je dán modrým zbarvením.

5.6.7 Voges-Proskauerův test (VPT)

Test je zaměřený na tvorbu acetoinu. Průkaz se provádí pomocí α-naftolu a KOH. Z čisté kultury a fyziologického roztoku byla připravena suspenze. Do zkumavky byl vložen papírkový test (firma Lachema, Česká republika) tak, aby byly obě zóny ponořeny. Zkumavky byly inkubovány po dobu 2 hodin při 37 °C. Posléze bylo přikápnuto činidlo pro VPT test. Pozitivní reakce se projeví červeným nebo růžovým zbarvením [28].

5.6.8 Test aktivity β-galaktosidázy (ONP)

Test je zaměřený na produkci enzymu β-galaktosidázy. Z čisté kultury a fyziologického roztoku byla připravena suspenze. Do zkumavky byl vložen papírkový test (Lachema,

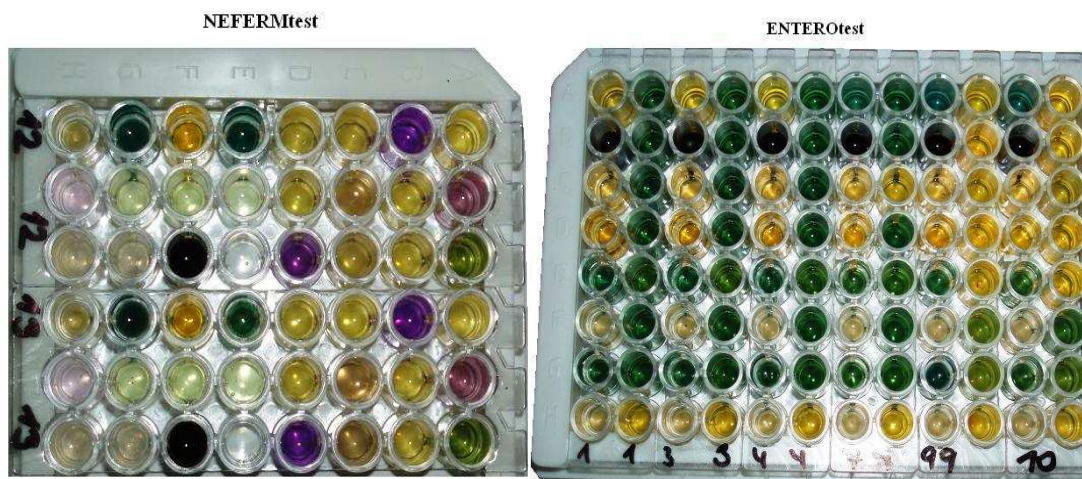
Česká republika). Zkumavky byly inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C. Pozitivní reakce se projeví žlutým zbarvením.

5.6.9 ENTEROtest

Souprava ENTEROtest (Lachema, Česká republika) je určena pro identifikaci významných druhů střevních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* (Obr. 5). Test je v podobě dehydrovaných diagnostických médií, která jsou na destičce. Z čisté kultury a fyziologického roztoku byla připravena suspenze o 1. stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Do každé jamky bylo pipetováno 0,1 ml suspenze. K určeným testům byl přidán parafinový olej. Testy byly inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C. Po inkubaci byla k určeným testům přidána činidla. Při vyhodnocování byly výsledky porovnány s barevnou srovnávací stupnicí a posléze byly vyhodnoceny softwarovým programem TNW-Lite.

5.6.10 NEFERMtest

Souprava NEFERMtest (Lachema, Česká republika) je určena pro identifikaci gramnegativních nefermentujících bakterií (Obr. 5). Test je v podobě dehydrovaných diagnostických médií, která jsou na destičce. Z čisté kultury a fyziologického roztoku byla připravena suspenze o 2. stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Do každé jamky bylo pipetováno 0,1 ml suspenze. K určeným testům byl přidán parafinový olej. Testy byly inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C. Po inkubaci byla k určeným testům přidána činidla. Při vyhodnocování byly výsledky porovnány s barevnou srovnávací stupnicí a posléze byly vyhodnoceny softwarovým programem TNW-Lite.



Obr. 5. Zobrazení NEFERMtestu a ENTEROtestu

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Mikrobiologický rozbor vzorků

Pro mikrobiologický rozbor bylo použito celkem pět různých vzorků dehydrovaných potravin. Před prvním rozbohem měla být výrobcem zajištěna zdravotní nezávadnost u čtyř vzorků, prošlé datum minimální trvanlivosti pouze měl vzorek č. 2 (chlupaté knedlíky). Po rozboru byly vzorky uzavřeny a skladovány při 24 °C po dobu 139 dní. Během tohoto období došlo k prodloužení minimální doby trvanlivosti u dalších dvou vzorků (Creamy vegetable soup a mléčnoobilná kaše). Po skladování byl proveden druhý mikrobiální rozbor vzorků. Při odečítání z jednotlivých médií je uváděn pouze kvalitativní výskyt mikroorganismů. Ve většině případů nebylo možno spočítat jednotlivé kolonie z důvodu jejich morfologického charakteru.

Při první kultivaci byly jednotlivé dehydrované potraviny prvně rozbaleny, tzn. že do této doby by měla být zajištěna komerční sterilita výrobku. Nárůst bakterií (*Tab. 16*) byl zaznamenán u vzorků č. 1, 2 a 3 na univerzálním médiu a médiu vhodném pro kultivaci *B. cereus* a čeledi *Enterobacteriaceae*. U vzorku č. 3 se vyskytly koliformní bakterie.

Tab. 16. Nárůst mikroorganismů před uplynutím doby skladování

Vzorek	č. 1	č. 2	č. 3	č. 4	č. 5
Půda					
MYP	-	-	-	-	-
TYE	+	+	+	-	-
PEMBA	-	-	-	-	-
MPA	+	+	+	-	-
SB	-	-	-	-	-
VRBA	-	-	+	-	-
EA	-	-	-	-	-

+ pozitivní nárůst; - negativní nárůst

Skladováním po dobu 139 dní se počet mikroorganismů ve zkoumaných vzorcích jednoznačně zvýšil (*Obr. 6*). Pozitivní nárůst byl opět zaznamenán pouze u vzorků č. 1, 2 a

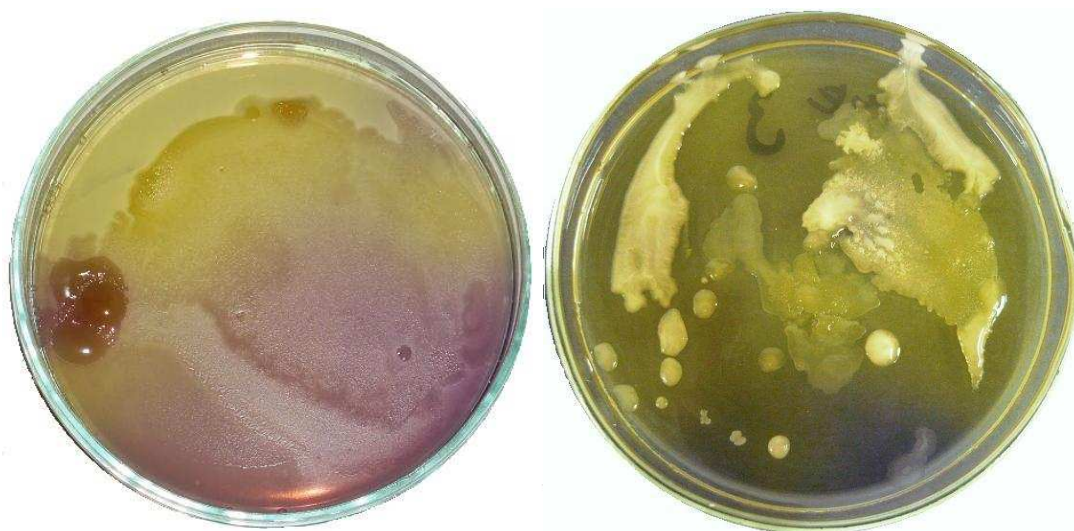
3. Přítomnost mikroorganismů byla zjištěna zejména na půdách vhodných pro kultivaci rodu *Bacillus*.

Tab. 17. Nárůst mikroorganismů po uplynutí doby skladování

Vzorek Půda	č. 1	č. 2	č. 3	č. 4	č. 5
MYP	-	+	+	-	-
TYE	+	+	+	-	-
PEMBA	+	+	+	-	-
MPA	+	+	+	-	-
SB	-	-	-	-	-
VRBA	-	-	+	-	-
EA	-	-	-	-	-

+ pozitivní nárůst; - negativní nárůst

Při první i druhé kultivaci byl mikrobiologický rozbor vzorků č. 4 a 5 negativní. Ve všech vzorcích nebyl zaznamenán žádný výskyt fekálních bakterií a enterokoků.



Obr. 6. Srovnání mikrobiologického rozboru pro vzorek č. 3 (médiu TYE) - před a po uplynutí 139 dní skladování

6.2 Identifikace izolátů

VZOREK Č. 1 – mléčnoobilná kaše

Tento produkt slouží k výživě kojenců (od ukončeného 4. měsíce) a malých dětí. Výrobce dále udává, že jsou obsaženy kultury mléčného kysání. Výrobek lze klasifikovat jako pokračující kojeneckou výživu a tudíž podle platného Nařízení komise č. 1441/2007 [26] by měl být prost salmonel a enterobakterií. Literatura uvádí výskyt *B. cereus* ve výrobcích určených pro kojeneckou výživu. Přítomnost této bakterie nebývá příčinou alimentárních onemocnění [29].

Ze tří morfologicky odlišných kolonií, které vyrostly na půdě TYE, byla hodnocena pouze jedna. Nažloutlé a lesklé kolonie, velikosti 2 mm, byly ploché a okrouhlé s myceálními okraji. Jejich povrch byl hladký a konzistence kašovitá. Bylo zjištěno, že bakterie patří mezi gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky. Podle výsledků ENTEROtestu byl tento mikroorganismus vyhodnocen jako *Edwardsiella ictaluri* s identifikačním skórem 80,27 %.

Literatura uvádí, že tato bakterie byla příčinou velkého úhynu sumců (*Pangasius hypophthalmus*) ve sladkovodním rybníku v únoru 2002 v Indonésii. *Edwardsiella ictaluri* byla v tomto případě izolována z vnitřností nakažených ryb [30].

VZOREK Č. 2 – chlupaté knedlíky

Současná legislativa nestanovuje mikrobiologické limity pro podobný produkt. Podstatná část výrobku je tvořena pšeničnou moukou, proto se zde mohou vyskytovat sporulující bakterie, zástupci bakteriálních rodů *Pseudomonas* nebo *Achromobacter* či plísně rodů *Alternaria*, *Mucor* nebo *Cladosporium* [3]. Celkem bylo izolováno pět morfologicky odlišných kolonií z půd MPA, PEMBA, MYP a TYE. Jednotlivé izoláty byly vyhodnoceny následovně:

- *Edwardsiella ictaluri* – dvě kultury byly identifikovány jako *Edwardsiella ictaluri*. Kolonie, velké přibližně 4 mm, byly ploché, lesklé, okrouhlé s hladkým povrchem. Mezi další morfologické znaky patřily myceální okraje a kašovitá konzistence. Pomocí testů byly kmeny přiřazeny ke gramnegativním fakultativně anaerobním bakteriím. Identifikační skóre, 80,27 %, bylo pro obě kultury shodné.

- Grampozitivní sporulující bakterie – mikroorganismy lze díky svým charakteristikám pravděpodobně přiřadit k rodu *Bacillus*. Dva kmeny náležely do skupiny fakultativně anaerobních bakterií. Matné kolonie, velké přibližně 3 mm, se vyznačovaly plochým profilem, nepravidelným tvarem a okrajem. Barva kolonií se jevila jako mírně nažloutlá. Zbylý kmen lze zařadit mezi aerobní bakterie a na rozdíl od předchozích dvou byly jeho kolonie větší (cca 5 mm). Všechny tři kultury patří do I. morfologické skupiny.

VZOREK Č. 3 – Creamy vegetable soup

Instantní polévky patří mezi nejvíce používané dehydrované výrobky. Přesto na ně legislativa neklade jakékoliv mikrobiologické požadavky. V dehydrovaných polévkách můžeme najít salmonely, bacily nebo klostridia. Tato polévka navíc obsahuje sušenou zeleninu, a proto by bylo dále v tomto vzorku možno najít enterokoky, stafylokoky, koliformní bakterie, kvasinky a plísňe [14]. Celkově bylo vyhodnocováno osm mikrobiálních kultur, jednotlivé mikroorganismy byly vyhodnoceny následovně:

- *Pragia fontium* – kolonie byly žluté, hladké, lesklé, mírně vypouklé s myceálními okraji a okrouhlého tvaru. Průměrná jejich velikost byla 1,5 mm a jsou kašovitě konzistence. Jako gramnegativní fermentující a oxidáza negativní mikroorganismus byla kultura podrobena ENTEROtestu. Program vyhodnotil tuto bakterii s identifikačním skórem 96,28 %. Tento mikroorganismus byl prvně izolován v tehdejší Československu. Bakterie byla nalezena ve vodním potrubí či vrtech. Ovšem je znám i případ, kdy byla bakterie *Pragia fontium* izolována z lidského těla, konkrétně ze zubu zdravé ženy [31].
- *Serratia plymuthica* – dvě kultury byly vyhodnoceny jako *Serratia plymuthica*. Kolonie o průměru 1 mm byly okrouhlého tvaru. Profil byl vypouklý, povrch hladký a lesklý a okraje myceální. Mikroorganismus měl žlutou barvu a kašovitou konzistenci. Opět se jednalo o gramnegativní a oxidáza negativní bakterii, který spotřebovával glukózu jak aerobní respirací, tak i fermentací. Identifikační skóre bylo 86,35 % a 60,98 %. Bakterie *Serratia plymuthica* byla prvně popsána v roce 1896. Hlavním místem jejího výskytu je voda, ale byla izolována i půdy, rostlin,

hmyzu a divokých zvířat [32]. Dostupná literatura uvádí, že bakterie rodu *Serratia* se mohou vyskytovat v mléce a na skořápce vejce [14].

- *Buttiauxella ferragutiae* – jednotlivé kolonie o velikosti 5 mm měly vypouklý profil, dále byly okrouhlé s myceálním okrajem. Bakterie se vyznačovaly mírně nažloutlým zbarvením. Povrch byl zvrásnělý a lesklý a konzistence kožovitá. Byl proveden ENTEROtest, jeho výsledkem je daný mikroorganismus s identifikačním skórem 98,53 %. Tato bakterie byla izolována z měkkýšů, slimáků a šneků [33].
- Grampozitivní sporulující fakultativně anaerobní bakterie – do této skupiny byly přiřazeny dvě kultury. Obě dvě se vyznačovaly drsným a matným povrchem a plochým profilem s nepravidelnými okraji. Pravděpodobně se jedná o zástupce rodu *Bacillus*. V rámci tohoto rodu je lze dále dělit podle charakteristiky spor. První mikroorganismus náleží do I. morfologické skupiny a druhý do II. morfologické skupiny.
- Gramnegativní nefermentující bakterie – dvě kultury se shodovaly jak v morfologii tak i NEFERMtestu. Lze tedy předpokládat, že se jednalo o stejný bakteriální rod. Velikost kolonií se pohybovala okolo 2 mm. Povrch byl hladký a lesklý, profil plochý a okraje myceální. Mikroorganismy kašovitě konzistence byly zbarveny žlutě. Program TNW-Lite neurčil, o jaký bakteriální rod se jedná.

V dostupné literatuře nebyl popsán výskyt *Edwardsiella ictaluri*, *Pragia fontium*, *Serratia plymuthica* a *Buttiauxella ferragutiae* v dehydrovaných výrobcích.

ZÁVĚR

Dehydrované výrobky jsou v dnešní době populární díky své rychlosti a snadnosti přípravy. Do této skupiny patří zejména polévky. Další velkou skupinu tvoří kojenecká strava. Ta má z dehydrovaných výrobků jako jediná legislativou stanovené mikrobiální limity. Důvodem je, že bývá konzumována potenciálně choulostivými spotřebiteli. Bakteriální mikroflóra vyskytující se v dehydrovaných potravinách může nejčastěji obsahovat salmonely, *Bacillus cereus* a *Clostridium perfringens*.

V této práci byl proveden mikrobiologický rozbor pěti vybraných dehydrovaných výrobků plotnovou metodou, následné skladování a opětný rozbor. Následně bylo vybráno 14 kolonií k podrobnější analýze. Bakterie byly identifikovány pomocí morfologických vlastností a biochemických testů.

- Přístup kyslíku během doby skladování měl pozitivní vliv na růst bakterií.
- U vzorku č. 1 (kojenecká kaše) byla identifikována pouze jedna kolonie. Ta byla vyhodnocena jako *Edwardsiella ictaluri* s identifikačním skórem 80,27 %.
- U vzorku č. 2 (směs pro přípravu knedlíků) bylo analyzováno celkem pět bakteriálních kultur. Dvě kultury byly identifikovány jako *Edwardsiella ictaluri* s identifikačním skórem 80,27 %. Zbylé tři izoláty byly vyhodnoceny jako grampozitivní sporulující bakterie pravděpodobně náležící k rodu *Bacillus*. Vzhledem k poloze a charakteristice spor byly bakterie zařazeny do I. morfologické skupiny. Žádná z těchto bakterií nebyla díky morfologii růstu na PEMBA agaru vyhodnocena jako *B. cereus*.
- U vzorku č. 3 (instantní zeleninová polévka) bylo celkově analyzováno 8 kolonií. Bakterie byly rozděleny do tří skupin: enterobakterie, gramnegativní nefermentující bakterie a grampozitivní sporulující fakultativně anaerobní bakterie. Program TNW-Lite vyhodnotil jednotlivé enterobakterie jako *Pragia fontium* s identifikačním skórem 96,28 %, *Buttiauxella ferragutiae* se skórem 98,53 % a dvě kultury jako *Serratia plymuthica* s identifikačními skóry 86,35 % a 60,98 %. Gramnegativní nefermentující bakterie nebyly pomocí programu identifikovány. Grampozitivní bakterie lze opět charakterizovat jako zástupce rodu *Bacillus* patřící do I. a II. morfologické skupiny.

- U vzorku č. 4 (bramborová kaše) a 5 (sušené mléko) byl mikrobiologický rozbor negativní.

Snaha o omezení výskytu bakterií v potravinách je v průmyslové výrobě založena nejen na hygieně výrobního procesu, ale také v současné době na zavedení systému, jenž se zakládá na zásadách analýzy rizika a kritických kontrolních bodů. Dalším velmi důležitým faktorem je doba mezi přípravou pokrmu a jeho spotřebou, která by měla být vždy zkrácena na co nejmenší interval.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BLACKBURN, C. *Food spoilage microorganisms*. New York: CRC Press, 2006, 712 s.
- [2] TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.K. *Microbiology an introduction*. 9. vyd. San Francisco: Pearson Education, 2007, 958 s.
- [3] *Potravinářská mikrobiologie* [online]. [cit. 8.3.2009]. Dostupný z WWW: <<http://utb.cepac.cz/Screens/Default.aspx>>
- [4] *Veterinární a farmaceutická univerzita Brno* [online]. [cit. 27.2.2009]. Dostupný z WWW: <http://fvl.vfu.cz/export/sites/fvl/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie/Gx_tycinky.pdf>
- [5] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. Brno. Masarykova univerzita, 2007, 270 s.
- [6] *Bacillus sp.* [online]. [cit. 14.3.2009]. Dostupný z WWW: <http://www.microbelibrary.org/microbelibrary/files/ccImages/Articleimages/Atlas_Endospore/Bacillus%20species_Endospore%20stainlabeled_fig14.jpg>
- [7] VECCI, E., DRAGO, L. *Lactobacillus sporogenes* or *Bacillus coagulans*: misidentification or mislabelling?. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. 2006, 1: 3-10
- [8] CUNNINGHAM, S.E., MAGEE, T.R.A., MCMINN, W.A.M., GAZE, J.E., RICHARDSON, P.S. Thermal resistance of *Bacillus stearotherophilus* spores in dried pasta at different stages of rehydration. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2007, 31: 420-432
- [9] *Bacillus subtilis* Final Risk Assessment [online]. [cit. 8.3.2009]. Dostupný z WWW: <http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm>
- [10] *Bacillus licheniformis* Final Risk Assessment [online]. [cit. 6.3.2009]. Dostupný z WWW: <http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra005.htm>
- [11] MEDICAL AND PUBLIC HEALTH MANAGEMENT. Anthrax as a Biological Weapon. *JAMA*. 1999, 28: 1735-1745
- [12] *Bacillus anthracis* [online]. [cit. 14.3.2009]. Dostupný z WWW: <http://www.srs.dl.ac.uk/Annual_Reports/AnRep01_02/anthrax.htm>

- [13] ZHOU, G., YAN, J., DASHBERG, Z., ZHOU, X., YUAN, Z. The residual occurrences of *Bacillus thuringiensis* biopesticides in food and beverages. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, 127: 68-72
- [14] ICMFS (International Commission on Microbiological Specification for Food). *Microorganisms of foods 6. Microbial ecology of food commodities*. 2.vyd. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2005, 763 s.
- [15] ARNESEN, L.P.S., FAGERLUND, A., GRANUM, P.E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology revue*. 2008, 32: 579-606
- [16] PEMBA [online]. [cit. 14.3.2009]. Dostupný z WWW: <http://farm3.static.flickr.com/2101/2111323032_ab5c1c99b1.jpg?v=0>
- [17] HAUGE, S. Food poisoning caused by aerobic spore forming bacilli. *Journal of Applied Microbiology*. 1955, 18: 591-595
- [18] MONTVILLE, T.J., MATTHEWS, K.R. *Food microbiology: an introduction*. Washington: ASM Press, 2005, 380 s.
- [19] GRANUM, P.E., LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*. 1997, 157: 223-228
- [20] MIKKOLA, R., SARIS, N.E., GRIGORIEV, P.A., ANDERSSON, M.A., SALKINOJA-SALONEN, M.S. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *European Journal of Biochemistry*. 1999, 263: 112-117
- [21] DIERICK, K., VAN COLLIE, E., SWIECICKA, I., MEYFROIDT, G., DEVLIEGER, H., MEULEMANS, A., HOEDEMAEKERS, G., FOURIE, L., HEYNDRIKX, M., MAHILLON, J. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus* – associated food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005, 43: 4277-4279
- [22] MAHLER, H., PASI, A., KRAMER, J.M., SCHULTE, P., SCOGING, A.C., BÄR, W., KRÄHENBÜHL, S. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *The New England Journal of Medicine*. 1997, 336: 1142-1148

- [23] LUND, T., DE BUYSER, M-L., GRANUM, P.E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotis enteritis. *Molecular Microbiology*. 2000, 38: 254-261
- [24] Vyhláška Mze ČR č. 419/2000 Sb., ze dne 10. listopadu 2000, kterou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 331/1997 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro koření, jedlou sůl, dehydrované výrobky a ochucovadla a hořčici
- [25] Vyhláška MZe ČR č. 331/1997 Sb., ze dne 11. prosince 1997, kterou se provádí § 18 písm. a), d), h), i), j), a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro koření, jedlou sůl, dehydrované výrobky a ochucovadla a hořčici
- [26] Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007, ze dne 5. prosince 2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny
- [27] ANONYMUS. Opinion of the scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. *The EFSA Journal*. 2005, 175: 1-48
- [28] DEMNEROVÁ, K. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 179 s.
- [29] BECKER, H., SCHALLER, G., WIESE, W., TERPLAN, G. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *International Journal of Food Microbiology*. 1994, 24: 1-15
- [30] YUASA, K., Kholdin, B., PANIGORO, N., HATAI, K. First Isolation of *Edwardsiella ictaluri* from Cultured Striped Catfish *Pangasius hypophthalmus* in Indonesia. *Fish Pathology*. 2003, 38: 181-183
- [31] ALDOVÁ, E., HAUSNER, O., BRENNER, D.J., KOČMOUD, Z., SCHINDLER, J., POTUŽNÍKOVÁ, B., PETRÁŠ, P. *Pragia fontium* gen. nov., sp. nov. of the Family *Enterobacteriaceae*, Isolated from Water. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1988, 38: 183-189

- [32] DOMINGO, D., LIMIA, A., ALARCÓN, T., SANZ J.C., REY, M.C., LÓPEZ-BREA, M. Nosocomial Septicemia Caused by *Serratia plymuthica*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994, 32: 575-577
- [33] MÜLLER, H.E., BRENNER, D.J., FANNING, G.R., GRIMONT, P.A., KÄMPFER, P. Emended description of *Buttiauxella agrestis* with recognition of six new species of *Buttiauxella* and two new species of *Kluyvera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1996, 46: 50-63

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CFU	Colony Forming Units
CytK	Cytotoxin K
EA	Endo Agar
EFSA	European Food Safety Authority
HACCP	Hazard Analysis and Control Critical Point
Hbl	Hemolysin BL
MPA	Masopeptonový Agar
MYP	Mannitol Egg Yolk Phenol Red Polymyxin Agar
Nhe	Nehemolytický enterotoxin
OFT	Oxidačně fermentační test
ONP	Test aktivity β -galaktosidázy
OXI	Důkaz produkce oxidázy
PEMBA	Polymyxin Pyruvate Egg Yolk Mannitol Bromthymol Blue Agar
SB	Slanetz-Bartley Agar
TYE	Tryptone Yeast Extract Agar
VP	Voges-Prakauerův test
VRBA	Violet Red Bile Agar

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Mikroskopické zobrazení <i>Bacillus</i> sp. a jejich spor	11
Obr. 2. <i>Bacillus anthracis</i>	13
Obr. 3. Růst <i>B. cereus</i> na PEMBA agaru	17
Obr. 4. Spory I. morfologické skupiny	21
Obr. 5. Zobrazení NEFERMtestu a ENTEROtestu	36
Obr. 6. Srovnání mikrobiologického rozboru pro vzorek č. 3 (médiu TYE) - před a po uplynutí 139 dní skladování	38

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Vady sýrů způsobené bakteriemi z rodu <i>Bacillus</i>	15
Tab. 2. Charakteristika onemocnění způsobená <i>Bacillus cereus</i>	18
Tab. 3. Skladba enterotoxinů <i>B. cereus</i>	20
Tab. 4. Členění dehydrovaných potravin na skupiny	22
Tab. 5. Příпустné záporné hmotnostní odchylky	23
Tab. 6. Sušené mléko a sušená syrovátka	24
Tab. 7. Sušená počáteční kojenecká výživa a sušené dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely určené pro kojence do šesti měsíců	24
Tab. 8. Sušená pokračovací kojenecká výživa	24
Tab. 9. Mannitol Yolk Polymixin Agar	29
Tab. 10. Tryptone Yeast Extract Agar	29
Tab. 11. <i>Bacillus cereus</i> Agar Base = Polymyxin Pyruvate Egg Yolk Mannitol Bromthymol Blue Agar	30
Tab. 12. Masopeptonový agar	30
Tab. 13. Endo Agar	31
Tab. 14. Slanetz-Bartley Agar	31
Tab. 15. Violet Red Bile Agar	32
Tab. 16. Nárůst mikroorganismů před uplynutím doby skladování	37
Tab. 17. Nárůst mikroorganismů po uplynutí doby skladování	38

SEZNAM PŘÍLOH

P. I. Výsledky ENTEROtestu

P. II. Fotodokumentace – barevné změny médií způsobené bakteriemi

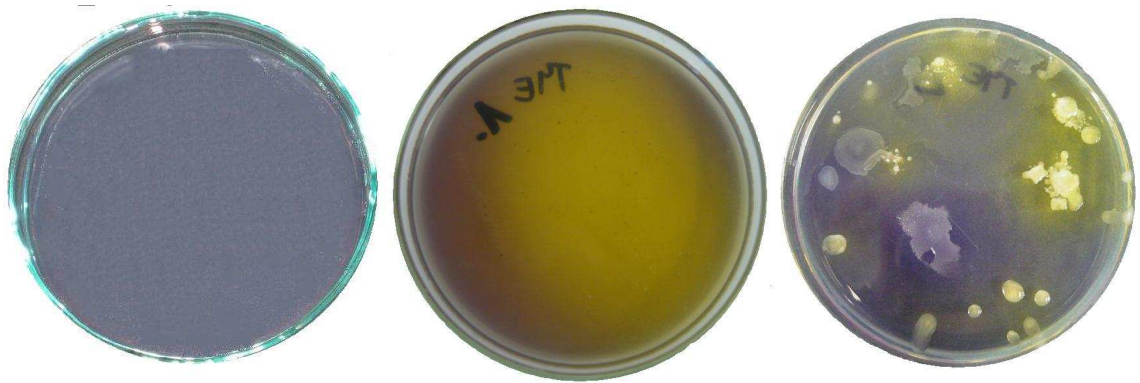
PŘÍLOHA P I: VÝSLEDKY ENTEROTESTU

Bakterie	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	<i>Pragia fontium</i>	<i>Serratia plymuthica</i>	<i>Buttiauxella ferragutiae</i>
Test				
H₂S	-	-	-	-
LYS	+	-	-	+
IND	-	-	-	-
ORN	+	-	-	+
URE	-	-	-	-
PHE	-	-	-	-
ESL	-	+	+	+
SCI	-	+	+	-
MAL	-	-	-	-
INO	-	-	-	-
ADO	-	-	-	-
CEL	-	-	+	+
SUC	-	-	+	-
SOR	-	+	+	+
TRE	-	-	+	+
MAN	-	-	+	+
Identifikační skóre [%]	80,27	99,28	86,35	98,53

**PŘÍLOHA P II: FOTODOKUMENTACE - BAREVNÉ ZMĚNY MÉDIÍ
ZPŮSOBENÉ BAKTERIEMI**



Barevné změny agaru PEMBA



Barevné změny agaru TYE



Barevné změny agaru MYP