

Stanovení potravinářsky významných mikroorganismů na vybraných kultivačních půdách

Bc. Hana Odstrčilíková

Diplomová práce
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Hana ODSTRČILÍKOVÁ**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Stanovení potravinářsky významných mikroorganismů na vybraných kultivačních půdách**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- Charakterizace mikroorganismů významných v potravinářství.

II. Praktická část

- Kultivace vybraných mikroorganismů významných v potravinářství.
- Cenová kalkulace jednotlivých laboratorních cvičení.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] GÖRNER F., VALÍK L'. Aplikovaná mikrobiologie požívatin., 2004, Malé Centrum, SR.

[2] ICMSF. Microorganisms in Foods 6, 2nd edition, Kluwer Academic & Plenum Publishers, New York, 2005.

[3] <http://www.oxid.com/>.

[4] <http://www.himedialabs.com/>.

Vedoucí diplomové práce:

MVDr. Michaela Černíková

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

26. února 2009

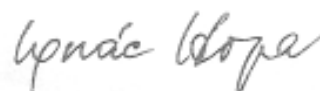
Termín odevzdání diplomové práce:

31. května 2009

Ve Zlíně dne 31. května 2009



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Tato práce popisuje a charakterizuje potravinářsky významné mikroorganismy. Jsou zde popsány podmínky jejich růstu, morfologie, fyziologické vlastnosti, výskyt, význam a média, která lze použít k jejich kultivaci. Další část se zabývá kultivací vybraných mikroorganismů významných v potravinářství. Je zde popsán růst daných mikroorganismů na vybraných kultivačních médiích a zobrazeno jejich fotografické znázornění. Poslední část je zaměřena na cenovou kalkulaci jednotlivých laboratorních cvičení.

Klíčová slova: potravinářství, mikroorganismy, kultivační médium, růst mikroorganismů, cenová kalkulace

ABSTRACT

This work was focused on description and characterization important food microorganisms. They were characterized conditions of their growth, morphology, physiology properties, presence in food, importance and media, which can be used to their cultivation. Next part was dealt with cultivation of chosen important food microorganisms. There was described growth of selected microorganism on chosen cultural media and painted their photograph. The last part was specialized in pricing separate laboratory practice.

Keywords: foodstuffs, microorganisms, culture medium, microorganisms growth, pricing

Děkuji vedoucí své diplomové práce MVDr. Michaelě Černíkové, za odborné vedení, trpělivost a cenné připomínky a rady, které mi poskytla během vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Magdě Doležalové, RNDr. Leoně Buňkové Ph.D. a Bc. Haně Miklíkové za poskytnutí cenných rad.

Prohlašuji, že jsem na diplomové 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 studenta

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 ROZDĚLENÍ POTRAVINÁŘSKY VÝZNAMNÝCH MIKROORGANIZMŮ	11
1.1 GRAMNEGATIVNÍ TYČINKY AEROBNÍ.....	11
1.1.1 Rod <i>Acetobacter</i>	11
1.1.2 Rod <i>Acinetobacter</i>	12
1.1.3 Rod <i>Alteromonas</i>	12
1.1.4 Rod <i>Gluconobacter</i>	12
1.1.5 Rod <i>Brucella</i>	13
1.1.6 Rod <i>Pseudomonas</i>	13
1.1.7 Rod <i>Flavobacterium</i>	15
1.1.8 Rod <i>Moraxella</i>	15
1.2 GRAMNEGATIVNÍ TYČINKY MIKROAEROFILNÍ.....	15
1.2.1 Rod <i>Campylobacter</i>	15
1.3 GRAMNEGATIVNÍ TYČINKY FAKULTATIVNĚ ANAEROBNÍ.....	16
1.3.1 Rod <i>Escherichia</i>	17
1.3.2 Rod <i>Salmonella</i>	19
1.3.3 Rod <i>Shigella</i>	21
1.3.4 Rod <i>Yersinia</i>	22
1.3.5 Rod <i>Proteus</i>	22
1.3.6 Rod <i>Serratia</i>	23
1.3.7 Rod <i>Enterobacter</i>	24
1.3.8 Ostatní zástupci	24
1.4 GRAMPOZITIVNÍ TYČINKY NESPORULUJÍCÍ FAKULTATIVNĚ ANAEROBNÍ.....	26
1.4.1 Rod <i>Brochotrix</i>	26
1.4.2 Rod <i>Listeria</i>	26
1.5 GRAMPOZITIVNÍ TYČINKY NESPORULUJÍCÍ AEROTOLERANTNÍ ANAEROBNÍ.....	28
1.5.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	28
1.6 GRAMPOZITIVNÍ KOKY AEROTOLERANTNÍ	30
1.6.1 Rod <i>Streptococcus</i>	30
1.6.2 Rod <i>Lactococcus</i>	32
1.6.3 Rod <i>Enterococcus</i>	32
1.6.4 Rod <i>Leuconostoc</i>	33
1.6.5 Rod <i>Pediococcus</i>	34
1.7 GRAMPOZITIVNÍ KOKY AEROBNÍ A FAKULTATIVNĚ ANAEROBNÍ.....	34
1.7.1 Rod <i>Micrococcus</i>	34
1.7.2 Rod <i>Staphylococcus</i>	35
1.8 GRAMPOZITIVNÍ KOKY ANAEROBNÍ.....	36
1.8.1 Rod <i>Sarcina</i>	36

1.9	GRAMPOZITIVNÍ TYČINKY SPORULUJÍCÍ AEROBNÍ NEBO FAKULTATIVNĚ ANAEROBNÍ	36
1.9.1	Rod <i>Bacillus</i>	36
1.9.2	Rod <i>Clostridium</i>	37
1.10	GRAMPOZITIVNÍ TYČINKY NEPRAVIDELNÉ ANAEROBNÍ	39
1.10.1	Rod <i>Bifidobacterium</i>	39
1.11	GRAMPOZITIVNÍ TYČINKY NEPRAVIDELNÉ AEROBNÍ A FAKULTATIVNĚ ANAEROBNÍ	39
1.11.1	Rod <i>Corynebacterium</i>	39
1.11.2	Rod <i>Arthrobacter</i>	40
1.11.3	Rod <i>Brevibacterium</i>	40
1.11.4	Rod <i>Cellulomonas</i>	40
1.11.5	Rod <i>Mycobacterium</i>	41
1.11.6	Rod <i>Propionibacterium</i>	41
1.11.7	Rod <i>Microbacterium</i>	42
1.12	RŮST MIKROORGANIZMŮ	42
II	PRAKTICKÁ ČÁST	45
2	CÍL PRÁCE	46
3	MATERIÁL A METODIKA	47
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	51
4.1.1	Tryptone Yeast Extract Agar (TYE)	51
➤	<i>Bacillus cereus</i>	51
➤	<i>Bacillus subtilis</i>	52
➤	<i>Bacillus brevis</i>	53
➤	<i>Bacillus sphaericus</i>	53
➤	<i>Streptococcus thermophilus</i>	54
➤	<i>Lactococcus lactis</i>	55
➤	<i>Proteus vulgaris</i>	55
➤	<i>Klebsiella</i> sp.	56
➤	<i>Salmonella typhi</i>	57
➤	<i>Citrobacter</i> sp.	57
➤	<i>Escherichia coli</i>	58
4.2	MANNITOL YOLK POLYMYXIN B (MYP):	59
4.2.1	<i>Bacillus cereus</i>	59
4.2.2	<i>Bacillus sphaericus</i>	59
4.2.3	<i>Bacillus brevis</i>	60
4.2.4	<i>Bacillus subtilis</i>	61
4.2.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	62
4.2.6	<i>Pseudomonas fluoerescens</i>	62
4.3	ENDO AGAR (EA):	63
4.3.1	<i>Escherichia coli</i>	63
4.3.2	<i>Citrobacter</i> sp.	64
4.3.3	<i>Salmonella typhi</i>	65
4.3.4	<i>Klebsiella</i> sp.	65
4.3.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66

4.3.6	<i>Yersinia enterocolitica</i>	67
4.4	BRILLIANT GREEN AGAR (BGA).....	67
4.4.1	<i>Klebsiella</i> sp.	67
4.4.2	<i>Escherichia coli</i>	68
4.4.3	<i>Salmonella typhi</i>	69
4.4.4	<i>Citrobacter</i> sp.....	69
4.5	XYLOSE LYSINE DEOXYCHOLATE AGAR (XLD)	70
4.5.1	<i>Klebsiella</i> sp.	70
4.5.2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	71
4.5.3	<i>Escherichia coli</i>	72
4.5.4	<i>Salmonella typhi</i>	72
4.5.5	<i>Citrobacter</i> sp.....	73
4.6	VIOLET RED BILE AGAR (VRBA)	74
4.6.1	<i>Escherichia coli</i>	74
4.6.2	<i>Salmonella typhi</i>	74
4.6.3	<i>Citrobacter</i> sp.....	75
4.6.4	<i>Proteus vulgaris</i>	76
4.7	VIOLET RED BILE GLUKOSE AGAR (VRBGA)	76
4.7.1	<i>Proteus vulgaris</i>	76
4.7.2	<i>Citrobacter</i> sp.....	77
4.7.3	<i>Salmonella typhi</i>	78
4.7.4	<i>Klebsiella</i> sp.	78
4.7.5	<i>Escherichia coli</i>	79
5	CENOVÁ KALKULACE JEDNOTLIVÝCH LABORATORNÍCH CVIČENÍ.....	80
5.1	PŘÍPRAVA ŽIVNÝCH MÉDIÍ (1. CVIČENÍ).....	80
5.1.1	Inokulace vybraných druhů mikroorganismů (vzorový výpočet)	80
5.2	STANOVENÍ KOLIFORMNÍCH MIKROORGANISMŮ (2.CVIČENÍ).....	84
5.2.1	Stanovení koliformních mikroorganismů	84
5.3	MIKROBIOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ MLÉČNÝCH VÝROBKŮ (3. CVIČENÍ)	85
5.3.1	Stanovení účinku pasterační teploty na mikrobiální obraz mléka.....	85
5.3.2	Mikrobiologické vyšetření sušeného mléka	86
5.3.3	Mikrobiologické vyšetření sýrů.....	86
5.4	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR KYSANÝCH MLÉČNÝCH VÝROBKŮ (4. CVIČENÍ)	87
5.4.1	Stanovení koliformních bakterií, kvasinek a plísní v kysaných výrobcích	88
5.4.2	Hodnocení kvality kysaných výrobků	88
5.5	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR MASA A MASNÝCH VÝROBKŮ (5. CVIČENÍ).....	89
5.5.1	Mikrobiologické vyšetření povrchu čerstvého a zkaženého masa	89
5.5.2	Mikrobiologické vyšetření hloubky čerstvého a zkaženého masa	90
5.5.3	Mikrobiologické vyšetření masných výrobků	91
5.6	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR DRŮBEŽE A RYB (6. CVIČENÍ).....	93
5.6.1	Mikrobiologické vyšetření povrchu drůbeže stěrem	93
5.6.2	Mikrobiologické vyšetření povrchu drůbeže oplachem	94

5.6.3	Mikrobiologické vyšetření masa z hloubky drůbeže/ryby.....	95
5.7	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR CUKRÁŘSKÝCH VÝROBKŮ, LAHŮDEK A VAJEC (7. CVIČENÍ).....	96
5.7.1	Mikrobiologické vyšetření cukrářských výrobků a lahůdek	96
5.7.2	Průnik mikroorganismů vejcem	97
5.7.3	Stanovení celkových počtů mikroorganismů a <i>Staphylococcus aureus</i> ve vejci	98
5.8	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR OVOCE, ZELENINY A KONZERV (8. CVIČENÍ).....	99
5.8.1	Mikrobiologické vyšetření medu nebo džemu	99
5.8.2	Mikrobiologické vyšetření rajčatového protlaku nebo kečupu	100
5.8.3	Mikrobiologické vyšetření konzerv.....	101
5.9	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR OBILOVIN, PEČIVA A KOŘENÍ (9. CVIČENÍ).....	102
5.9.1	Mikrobiologické vyšetření mouky, pečiva a těstovin.....	102
5.9.2	Mikrobiologický rozbor koření	103
5.10	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR NÁPOJŮ (10. CVIČENÍ).....	103
5.10.1	Mikrobiologické vyšetření nápojů.....	104
5.10.2	Mikrobiologické vyšetření nápojů metodou membránové filtrace	104
5.11	CELKOVÉ ZHODNOCENÍ CENOVÉ KALKULACE LABORATORNÍCH CVIČENÍ	105
	ZÁVĚR	106
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	107
	SEZNAM OBRÁZKŮ	111
	SEZNAM TABULEK.....	113

ÚVOD

Mikrobiologie potravin se zabývá nejen vlastní mikrobiologickou analýzou potravin, ale také mikrobiologickým zkoumáním předmětů denního užívání, prostředí potravinářských podniků a provozů společného stravování. Zaměřuje se na mikroorganismy přirozeně se vyskytující v potravinách i na mikroorganismy kontaminující, které mohou způsobit kažení potravin anebo případně alimentární onemocnění. Nedílnou součástí potravinářské mikrobiologie je také studium kulturních kmenů mikroorganismů využívaných při výrobě potravin. Zdravotní nezávadnost potravin je jedním z hlavních kritérií produkce potravin.

Tato práce popisuje a charakterizuje potravinářsky významné mikroorganismy, které mohou způsobovat kažení potravin a případně alimentární onemocnění. Jsou zde popsány podmínky jejich růstu, morfologie, fyziologické vlastnosti, výskyt, význam a média, která lze použít k jejich kultivaci.

Praktická část se zabývá kultivací vybraných mikroorganismů významných v potravinářství. Je zde popsán růst daných mikroorganismů na vybraných kultivačních médiích a zobrazeno jejich fotografické znázornění. Tato část by měla sloužit pro účely laboratorních cvičení.

Druhá část praktické diplomové práce je zaměřena na cenovou kalkulaci jednotlivých laboratorních cvičení.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ROZDĚLENÍ POTRAVINÁŘSKY VÝZNAMNÝCH MIKROORGANISMŮ

Jako základní kritérium pro třídění bakterií byla v této části použita morfologie, barvení podle Grama a vliv kyslíku na jejich růst. Jsou zde zahrnuty rody, případně druhy, které se v potravinářství vyskytují nejčastěji, bez ohledu na jejich užitečnost, škodlivost nebo choroboplodnost.

1.1 Gramnegativní tyčinky aerobní

1.1.1 Rod *Acetobacter*

Patří do čeledi *Acetobacteraceae* a představuje aerobní bakterie s výraznou schopností oxidovat etanol na octovou kyselinu [1]. Používá se jich proto při kvasné výrobě octa. Nepříznivě se „octové bakterie“ uplatňují při octovatení vína nebo piva, nebo jako nežádoucí kontaminace při výrobě droždí [1, 2]. Bakterie rodu *Acetobacter* mají tvar peritrichních nebo atrichních tyčinek, které však často tvoří tzv. involuční formy, tj. nepravidelné tvary (nepravidelně zduřené až kulovité, zakřivené, vláknité apod.), vyskytující se jednotlivě, v párech nebo řetězcích. Mají striktně aerobní metabolismus, takže již krátké přerušení dodávky kyslíku vede v přítomnosti etanolu k jejich usmrcení. Při poklesu koncentrace etanolu oxidují vzniklou octovou kyselinu až na oxid uhličitý a vodu (tzv. přioctění). Bakterie tohoto rodu využívají také některé jiné substráty, např. vyšší jednosytné a vícesytné alkoholy, hexózy a od nich odvozené kyseliny, dále laktát atd. Jednotlivé druhy se liší počtem využitelných sloučenin. Některé druhy se používají pro průmyslovou oxidaci organických sloučenin (např. oxidace sorbitolu na sorbózu při výrobě vitamínu C) [1]. Na oxidázu a katalázu reagují pozitivně. Jako zdroj uhlíku využívají glukózu [3]. Optimální růst bakterií tohoto rodu je při 25-30 °C a pH 5,4-6,3. Nejvíce se vyskytuje v ovoci, nápojích, medu a okvětlí. Jsou nepatogenní pro člověka a zvířata. Někteří zástupci mohou způsobit kažení fermentovaných masných výrobků [4].

Do rodu *Acetobacter* jsou dnes zařazovány čtyři druhy *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter liquefaciens*, *Acetobacter hansenii* [3]. Druhy *Acetobacter aceti* a *Acetobacter liquefaciens* oxidují řadu sacharidů (glukózu, manózu, galaktózu a některé pentózy) na příslušnou kyselinu s karboxylovou skupinou na prvním uhlíku [1]. V přírodě

je nejrozšířenější druh *Acetobacter aceti*, který stejně jako *Acetobacter pasteurianus* zkvašuje kyselinu octovou a je tedy považován za továrensky důležitý mikroorganismus užívaný v produkci octa [1, 5]. Půdy, na kterých se dá tento rod kultivovat je Universal Beer Agar [6].

1.1.2 Rod *Acinetobacter*

Řadí se do čeledi *Moraxelaceae*. Jedná se o krátké tyčinky až kokotyčky. Vyskytují se ve dvojicích a v řetězcích rozmanité délky. Optimum růstu je při 20–35 °C, jsou kataláza pozitivní a oxidáza negativní. Jako zdroj uhlíku a energie využívají některé sacharidy. Rod obsahuje více než desítku popsaných druhů např. *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii* [4]. Některé druhy jsou značně termorezistentní. Vyskytují se ve vodě, mase, rybách, vejcích [3, 7]. Negativně se projevují kažením bílkovinných potravin [3]. Nejlépe roste na půdě Sellers Differential Agar [8]. Kolonie *Acinetobacter* spp. na pevných půdách jsou často hladké, velikostně srovnatelné s koloniemi rodu *Pseudomonas*. Barva kolonií se může měnit od béžové až ke žluté [9].

1.1.3 Rod *Alteromonas*

Jedná se o rovné až zakřivené nesporelující tyčky. Pohybují se pomocí jednoho polárního bičíku. Někteří zástupci tohoto rodu mohou vytvářet pupeny. Všechny druhy vyžadují k růstu základ média z mořské vody nebo Na^+ . Růstová teplota je 10–40 °C s optimem okolo 20 °C [6]. Jsou oxidáza a kataláza pozitivní. Vyskytují se v mase, rybách, vejcích a mléce. Kazí tedy převážně potraviny bílkovinného charakteru a způsobují vznik rybí pachuti [3]. Nejznámější druh je *Alteromonas macleodii*, který tvoří mléčně bílé kolonie na kultivačním médiu Yeast Extract Agar [10].

1.1.4 Rod *Gluconobacter*

Tento rod také oxiduje etanol na acetát, který však již není dále oxidován. Polyalkoholy oxiduje na ketony, z glukózy tvoří 2-oxoglukonovou kyselinu a u některých kmenů také 5-oxoglukonovou kyselinu [1]. Patří do čeledi *Acetobacteraceae*, kde nejznámější druhy jsou *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter frateurii*, *Gluconobacter cerinus*, *Gluconobacter asaii* [3, 10]. Tvoří elipsoidní až tyčinkovité buňky bez bičíků nebo se svazkem bičíků na pólu [1]. Tento rod je striktně aerobní, kataláza a oxidáza pozitivní a způsobuje

okyselování glukózy. Optimální teplota růstu je při 20-30 °C a optimum pH při 5,5-6,0 [4]. Vyskytuje se jako kontaminace pekařského droždí, piva, vína a jiných nápojů (na sacharidy bohatých) [1, 4]. Využívá se při výrobě octa [3]. *Gluconobacter* lze kultivovat na médiu Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP) [10].

1.1.5 Rod *Brucella*

Patří do čeledi *Brucellaceae*. Druhový zástupci jsou *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*. Morfologicky se jedná o nepohyblivé koky, kokotyčky až krátké tyčky, vyskytující se převážně jednotlivě, méně často také ve dvojicích, krátkých řetězcích nebo malých shlucích [4]. Rostou v rozmezí 20-40 °C s optimem 37 °C a pH 6,6-7,4. Metabolismus je respirativní (fermentují glukózu), jsou kataláza pozitivní a většinou i oxidáza pozitivní. Většinou vyžadují komplexní médium, růst je podpořen sérem nebo krví. Sacharidy většinou neokyselují, nehydrolyzují želatinu. Dusičnany redukují na dusitany. Jsou obsaženy v syrovém mléce, krvi, a v moči infikovaných hospodářských zvířat [3, 4]. Z potravinářského hlediska je důležitá *Brucella abortus*, která způsobuje zmetání skotu a je přenosná (např. při poranění) na člověka [2]. U lidí způsobuje déle trvající horečku, mrazení, slabost, bolest hlavy, dýchací obtíže a kožní symptomy [11]. Ke kultivaci se používá půda *Brucella Medium Base* s přídavkem *Brucella Selective Supplement* [6].

1.1.6 Rod *Pseudomonas*

Řadí se do čeledi *Pseudomonadaceae*. Tento rod má okolo 100 druhů mezi nejvýznamnější druhy patří *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas alcaligene* [3]. Rod zahrnuje přísně aerobní bakterie bez kvasných schopností, které využívají nejrůznější organické sloučeniny jako zdroj energie a uhlíku. Široké enzymové vybavení způsobilo, že se některé druhy tohoto rodu používají pro průmyslové oxidace různých organických sloučenin, hlavně při výrobě léků apod. Řada druhů tvoří fenazinová barviva žlutých, zelených, modrých nebo červených odstínů, které uvolňují do růstového prostředí. Tím způsobují nežádoucí zabarvení potravin (např. modrání nebo červenání mléka). Některé druhy uvolňují do prostředí fluoreskující žlutozelené barvivo (fluorescein) [1, 12]. Určité druhy vyvolávají v potravinách cizí vůně nebo pachy (ovocné, rybí) nebo pachuti (např. mýdlovou, hořkou apod.) Silné proteolytické

schopnosti jim umožňují rozklad bílkovinných potravin, a proto patří k nejpočetnějším mikroorganizmům na povrchu masa. Jejich lipolytické vlastnosti se uplatňují při kažení tuků. Většinou jsou psychrofilní povahy, takže jejich nežádoucí činnost v potravinách probíhá i při poměrně nízkých skladovacích teplotách. Některé druhy (např. *Pseudomonas aeruginosa*) jsou patogenní pro člověka, zvířata i rostliny, jiné jsou patogenní jen pro rostliny [1]. Po morfologické stránce jsou to monotrichní nebo lofotrichní tyčinky, kataláza pozitivní, oxidáza pozitivní i negativní, chemoorganotrofní s respiratorním typem metabolismu [10]. Tyto bakterie jsou velmi přizpůsobivé. Teplota růstu je optimálně 37-42 °C a nerostou při pH<4,5 [3]. Vyskytují se ve vodě a bílkovinné potravě. Způsobují kažení mléka, masa, drůbeže, ryb, vajec a zeleniny [7, 9]. Většinu kmenů je možno identifikovat podle růstu na základních půdách, kde vytvoří kovově lesklé kolonie [12].

Tab. 1. Půdy používané ke kultivaci rodu *Pseudomonas* :

Půda	Druh	Barva kolonie
Pseudomonas Cetrimide Agar	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	žlutozelené kolonie
Pseudomonas Agar Base + Pseudomonas CN Selective Supplement + Pseudomonas CFC Selective Agar Supplement	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	béžové kolonie se zeleným pigmentem
Membrane Lactose Glucuronide Agar (MLGA)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	růžové kolonie
Briliant Green Agar (BGA)	<i>Pseudomonas species</i>	červené malé kolonie
Macconkey Agar (without salt CM7b)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	zelenohnědé kolonie s fluorescencí

[6,8]

1.1.7 Rod *Flavobacterium*

Rod *Flavobacterium* je velmi rozšířen v přírodě, v mléce a jiných potravinách, neboť je běžnou vzdušnou kontaminací [1]. Tvoří aerobní, nepohyblivé, nespíralující tyčinky. Kolonie mohou být pigmentující (žluté až oranžové) [1, 4]. Některé druhy však barvivo neprodukují. Z cukrů tvoří kyselinu, ale nikoliv plyn [1]. Tento rod se řadí do čeledi *Flavobacteriaceae* s nejnámějšími druhy *Flavobacterium aquatile*, *Flavobacterium odoratum*, *Flavobacterium balustinum* [3, 4]. Jedná se o druhy mezofilní, ale některé jsou i psychrotrofní. Nejlépe rostou při pH 7,0-7,5. Způsobují kažení masa, ryb, mléka a zeleniny [3]. K izolaci rodu *Flavobacterium* získaného z různých potravin se používá medium Tryptone Soya Agar (TSA) nebo Plate Count Agar (PCA). Není potřeba žádné selektivní medium [9].

1.1.8 Rod *Moraxella*

Rod *Moraxella* byl rozdělen na dva podrody. Druhy tvořící tyčinkovité buňky jsou zařazeny do podrodu *Moraxella*, koky přísluší podrodu *Branhamella* [1]. Tyčky jsou bez bičíků, často velmi krátké a buclaté a běžně se blíží kokovitému tvaru, vyskytují se po dvou a v krátkých řetězcích. Jsou aerobní, ale některé kmeny mohou slabě růst za anaerobních podmínek. Řada druhů je nutričně náročná [4]. Optimální růstová teplota je 33-35 °C a pH 7,0-7,5, jsou oxidáza pozitivní a obvykle i kataláza pozitivní [3, 4]. Obvykle jsou citlivé k penicilinu a ze sacharidů netvoří kyseliny. Rod obsahuje téměř dvě desítky druhů, které parazitují na sliznicích člověka a teplokrevných zvířatech. Nejnámější druhy jsou *Moraxella lacunata* (podrod *Moraxella*) a *Moraxella catarrhalis* (podrod *Branhamella*) [4]. Vyskytují se ve vodě, půdě a potravinách a způsobují kažení masa, drůbeže, ryb a garnel [3, 7]. Druhy *Moraxella* mohou růst na standardních médiích, ale kvůli různorodosti potravin ve kterých se nacházejí se používá Tryptone Soya Agar (TSA) nebo Plate Count Agar (PCA) [9].

1.2 Gramnegativní tyčinky mikroaerofilní

1.2.1 Rod *Campylobacter*

Řadí se do čeledi *Campylobacteraceae* s nejnámějšími druhy *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter sputorum*, *Campylobacter*

curvus, *Campylobacter gracilis* [4, 13]. Jsou to spirálovité tyčinky, mikroaerofilní [3]. Pohybují se pomocí polárních bičků, jeden bičík na jednom či obou pólech buňky. Charakteristický je pro ně rotační pohyb na způsob vývrtky [4]. Při kultivaci vyžadují snížený obsah kyslíku na 5 až 7%. Nerostou za aerobních podmínek. Jsou kataláza a oxidáza pozitivní. Nerostou v prostředí s 3,5 % NaCl a nefermentují glukózu. Rostou při teplotě 37 °C [3]. Půdy pro kultivaci *Campylobacter jejuni* uvádí Tab. 2. energii získávají z aminokyselin [4]. Kamylobaktery jsou málo odolné vůči záhřevu, mrazírenským teplotám a vůči kyselinám [3, 14]. Vyskytují se ve fekáliích lidí a zvířat, v syrovém mléce, v mase, ve vodě, v ústní dutině člověka a zvířat [3, 4]. Způsobují otravy z potravin, které se projevují zvracením, horečkami a průjmami [3]. *Campylobacter coli* je patogenní pro člověka a zvířata. *Campylobacter jejuni* je běžný a celosvětově rozšířený původce gastroenteritid [4].

Tab. 2. Půdy používané ke kultivaci rodu *Campylobacter*:

Půda	Druh	Barva kolonie
Campylobacter Selective Agar (PRESTON)	<i>Campylobacter jejuni</i>	šedohnědé kolonie
Campylobacter Blood-Free Selective Medium (Modified CCDA- PRESTON)	<i>Campylobacter jejuni</i>	šedé kolonie

[6, 15]

1.3 Gramnegativní tyčinky fakultativně anaerobní

Čeď *Enterobacteriaceae*

Zahrnuje gramnegativní, nespírálující, fakultativně anaerobní, oxidáza negativní a kataláza pozitivní tyčinkovité bakterie. Redukují dusičnan na dusitan. Mohou být pohyblivé (peritrichní bičíky) nebo nepohyblivé.

Čeď *Enterobacteriaceae* obsahuje obligátně patogenní rody a druhy: *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*. Dále fakultativní patogeny (podmíněné patogeny) z nichž někteří jsou členové rodů: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Edwardsiella* a *Yersinia*. Tyto mají své původní stanoviště v střevním traktu lidí a zvířat.

Jako původci alimentárních toxikoinfekcí přicházejí v úvahu některé druhy a serovary salmonel, šigel, *Yersinia enterocolitica* a enteropatogen *Escherichia coli* [3].

1.3.1 Rod *Escherichia*

Escherichia coli je nejprozkoumanějším mikrobiálním druhem, neboť slouží jako modelový organismus pro biochemické, genetické i fyziologické studie. Je prvním bakteriálním druhem, u něhož byla pozorována a prostudována konjugace (tj. spájení) buněk a výměna genetického materiálu, jehož chromozom byl podrobně zmapován a také bakteriofágy, které jej napadají, patří k nejprostudovanějším.

Escherichia coli zkvašuje cukry (např. glukózu, laktózu, některé pentozany a alkoholické cukry) za intenzivní tvorby kyselin a plynů. Tvoří z těchto cukrů hlavně kyselinu mléčnou, pyrohroznovou, octovou a mravenčí, přičemž část kyseliny mravenčí rozkládá na oxid uhličitý a vodík. Gramnegativní povahy *Escherichia coli* a její schopnosti zkvašovat laktózu za vzniku kyselin se využívá pro zjištění této bakterie v potravinách nebo ve vodě [1]. Tyto rovné tyčky se vykytují jednotlivě a ve dvojicích, jsou pohyblivé (peritrichní bičíky) nebo nepohyblivé, nesporulující, fakultativně anaerobní, kataláza pozitivní, oxidáza negativní. Redukují dusičnany na dusitany [3, 4]. Některé kmeny z klinických materiálů tvoří pouzdra. Optimální teplota růstu je 37 °C. Nejznámější druhy jsou *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*. Vyskytují se jako přirozený obyvatel trávicího traktu člověka a zvířat, sekundárně ve vnějším prostředí [4]. Většinou se jedná o saprofyty. V potravinářství a ve vodárenství je využíván jako indikátorový organismus sanitace a zachování hygienických a technických požadavků při získání, opracování a zpracování, skladování, distribuci a spotřebě. Bakterie rodu *Escherichia* způsobují kažení potravin a časně duření sýrů. *Escherichia coli* je fakultativní patogen. Při oslabení lidského organismu může nastat onemocnění způsobené invazivními serovary *Escherichia coli*. Mezi tyto kmeny nebo serovary se řadí skupiny: enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enterotoxické *E. coli* (ETEC), enterohemoragické *E. coli* (EHEC) [3]. Všechny patogenní kmeny jsou charakterizovány a identifikovány serologicky na základě somatických (O), kapsulárních (K) a bičkových (H) antigenů [16]. Serovar *E. coli* O157:H7 je potvrzen jako patogen., který kontaminuje potraviny a je zařazen do skupiny enterohemoragických *E.coli* (EHEC) [3]. Tento serovar produkuje za vhodných podmínek velmi aktivní toxin shigatoxin (verotoxin), který

způsobuje vážné onemocnění lidí nazývané hemoragická kolitida [3, 4, 17]. Zásadně se *E. coli* přenáší kontaminovanými potravinami, jako syrovým masem nebo mlékem [3, 7]. Půdy pro kultivaci druhu *Escherichia coli* uvádí Tab. 3.

Tab. 3. Půdy používané ke kultivaci druhu *Escherichia coli*:

Půda	Barva kolonie
Brilliance Uti Agar	růžové kolonie
Chromogenic Uti Medium	růžové kolonie
Sorbitol Macconkey Agar (SMAC) with BCIG	bezbarvé kolonie
Brilliance E.Coli/Coliform Agar	purpurové kolonie
Tryptone Bile Agar	běžové kolonie
Macconkey Agar (without salt)	červené kolonie
Sorbitol Macconkey Agar	běžové kolonie
Endo Agar Base	červené kolonie se zlatým leskem
Violet Red Bile Lactose Agar (VRBA)	červené lesklé kolonie
Violet Red Bile Agar (VRBA) with MUG (4-methylumbellifery- β -D-glucuronide)	červené kolonie s fluorescencí
Violet Red Bile Glucose (VRBG) Agar (ISO)	červené kolonie
Macconkey Agar	červené kolonie

Yeast Extract Agar	běžové kolonie
--------------------	----------------

[6, 8, 16]

1.3.2 Rod *Salmonella*

Jedná se o gramnegativní rovné tyčky, většinou pohyblivé peritrichální bičíky. Fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní, mající jak respirativní, tak i fermentativní typ metabolismu [4]. Optimální růstová teplota je 37 °C [3]. Glukózu a další sacharidy okyselují, obvykle s tvorbou plynu, jsou oxidáza negativní, kataláza pozitivní, laktóza negativní [4]. Vyskytují se u člověka, teplotokrevných i studenokrevných živočichů, v prostředí, v potravinách jako je koření, majonéza, vejce, maso a další [4, 14]. Jsou patogenní pro člověka a i pro mnohá zvířata. Vnitrodruhová diferenciací je založena na dělení do serovarů dle somatických (O), kapsulárních (Vi) a bičíkových (H) antigenů. Tyto serovary mohou být děleny také na základě biochemických testů, které mohou mít epidemiologický význam. V současnosti jsou platná pouze dvě druhová jména a to *Salmonella bongori* a *Salmonella enteritica* se šesti poddruhy a více než 2500 serovary. Další dva druhy byly navrženy v posledních letech a nomenklatura salmonel je stále diskutována. Pro rutinní diagnostické laboratoře bylo doporučeno a povoleno používat označení sérovarů místo druhového jména [4].

Salmonella enterica subsp. *enterica* sv. **Enteritidis** způsobuje gastroenteritidy u člověka, často i u zvířat. U infikované drůbeže dojde i k přenosu na vejce [18]. V ČR se nakazí tímto druhem salmonelózy víc jak 96% z desetitisíců ročně hlášených případů.

Salmonella enterica subsp. *enterica* sv. **Typhimurium** je druhá nejčastější salmonela způsobující gastroenteritidy u člověka, často i u zvířat [4]. Je patogenní pro člověka a pro hlodavce a do organismu se dostává potravinami [1].

Salmonella enterica subsp. *enterica* sv. **Typhi** je patogenní pouze pro člověka [4]. Způsobuje velmi vážné a často i smrtelné střevní onemocnění lidí – břišní tyf, který se projevuje silnými bolestmi břicha, malátností a vysokými teplotami spojenými s blouzněním [1]. Přenáší se vodou a potravinami kontaminovanými lidskou stolicí.

Salmonella enterica subsp. *enterica* sv. **Choleraesuis** je patogenní pro člověka i pro zvířata [4].

Půdy pro kultivaci rodu *Salmonella* uvádí Tab. 4.

Tab. 4. Půdy používané ke kultivaci rodu *Salmonella*:

Půda	Druh	Barva kolonie
Salmonella Chromogenic Agar Base + Salmonella Selective Supplement	<i>Salmonella enteritidis</i>	purpurové kolonie
XLD AGAR	<i>Salmonella typhimurium</i>	červené kolonie s černými centry
Salmonella Shigella Agar (SS Agar)	<i>Salmonella enteritidis</i>	běžové kolonie s černými centry
Xylose Lactose Tergitol™ 4 (XLT 4)	<i>Salmonella enteritidis</i>	černé nebo červené kolonie s černým středem
Brilliant Green Agar (BGA)	<i>Salmonella typhimurium</i>	červené kolonie
Brilliance Salmonella Agar	<i>Salmonella typhimurium</i>	purpurové kolonie

Endo Agar (EA)	<i>Salmonella typhimurium</i>	světle růžové kolonie
----------------	-------------------------------	-----------------------

[6, 8]

1.3.3 Rod *Shigella*

Gramnegativní rovné tyčky, nepohyblivé. Fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní, mající jak respiratorní, tak i fermentatorní typ metabolismu [4]. Optimální teplota růstu je 37 °C, v potravinách rostou i při pokojové teplotě [3, 4]. Při pokojové teplotě mohou přežít až 50 dnů v potravinách jako mléko, vejce, mouka, v kyselých potravinách (pomerančová šťáva syčená CO₂) 5-10 dnů a 1-2 týdny v chlazeném kysaném mléce [9]. Glukózu a další sacharidy okyselují, ojedinele s tvorbou plynu, jsou oxidáza negativní, kataláza pozitivní. Jsou to střevní patogeny člověka a dalších primátů. Spolu se salmonelami a yersiniemi reprezentují nejčastější patogeny čeledi *Enterobacteriaceae*. Rod se skládá ze čtyř druhů, které jsou zařazovány jako podskupiny. *Shigella dysenterie* (podskupina A), *Shigella flexneri* (podskupina B), *Shigella boydii* (podskupina C), *Shigella sonnei* (podskupina D) [4]. Všechny čtyři druhy způsobují prudké střevní onemocnění tzv. shigelózy, kam patří tzv. bacilární úplavice (dysenterie). Tyto bakterie jsou přenášeny z fekálií nemocných lidí na ovoce nebo jiné potraviny hlavně v letním období, např. mouchami. Je to typické onemocnění „špinavých rukou“ a je rozšiřováno také bacilonosiči. Inkubační doba trvá jeden až tři dny, příznakem jsou horečky a průjmy, zvracení [1, 19]. Půdy pro kultivaci rodu *Shigella* uvádí Tab. 5.

Tab. 5. Půdy používané ke kultivaci druhu *Shigella sonnei*:

Půda	Barva kolonie
Salmonella Shigella Agar (SS Agar)	běžové kolonie
Salmonella Shigella Agar (SS Agar Modified)	běžové kolonie

Macconkey Agar NO.3	běžové kolonie
Salmonella Chromogenic Agar Base + Salmonella Selective Supplement	modré kolonie

[6, 8, 9]

1.3.4 Rod *Yersinia*

Gramnegativní rovné tyčky, občas vykazují kokovitý tvar, nepohyblivé při 37 °C, ale pohyblivé peritrichálními bičíky, pokud rostou pod 30 °C (některé kmeny *Yersinia ruckeri* a *Yersinia pestis* jsou nepohyblivé). Fakultativně anaerobní a chemorganotrofní, mající jak respiratorní, tak i fermentatorní typ metabolismu. Optimální teplota pro růst je 28-30 °C [4]. Optimální pH 4,6-9,0. Snáší i mrazírenské teploty (např. -19 °C) [3, 13]. Glukózu a další sacharidy okyselují bez tvorby plynu, nebo s malou produkcí plynu. Jsou oxidáza negativní a kataláza pozitivní. Nachází se v půdě, vodě a potravinách. Jsou zde striktně patogenní druhy pro člověka [4]. Nejnebezpečnějším druhem je *Yersinia pestis*, původce moru. *Yersinia pseudotuberculosis* způsobuje především u zvířat onemocnění podobné tuberkulóze [1]. Potravinářsky významná je *Yersinia enterocolitica* [3]. Půdy pro kultivaci rodu *Shigella* uvádí Tab. 6.

Tab. 6. Půdy používané ke kultivaci druhu *Yersinia enterocolitica*:

Půda	Barva kolonie
Yersinia Selective Agar Base + Yersinia Selective Supplement	transparentní s červeným středem kolonie

[6]

1.3.5 Rod *Proteus*

Rod *Proteus* je přítomen ve střevním traktu zvířat a člověka. Tvoří peritrichní, velmi pohyblivé buňky, které se plazí po pevných živných půdách, takže tvoří silně se rozrůstající kolonie s dlouhými výběžky. Největší pohyblivost dosahují při teplotě 20 °C, při teplotě 37

°C jeho pohyblivost mizí, a proto se při této teplotě tvoří jen malé kruhovitě kolonie. Některé kmeny jsou však bez bičíků. Tvar buněk je velmi proměnlivý (v kultuře jsou kromě tyčinek i kulovité a vláknité tvary) [1]. Jsou fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní mající jak respiratorní, tak i fermentatorní typ metabolismu [10]. Rozkládá bílkoviny za vzniku silného hnilobného pachu, způsobeného hlavně tvorbou sirovodíku a indolu. Patří mezi nejrozšířenější hnilobné bakterie. Některé druhy rodu *Proteus* mohou být patogenní (např. mohou způsobovat onemocnění močových cest) [1]. Zástupci rodu *Proteus* jsou *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* a *Proteus myxofaciens* [3]. Způsobují kažení bílkovinných potravin (hnití), oxidativně deaminují fenylalanin a tryptofan a tvoří amoniak a ketokyseliny [3, 4]. Půdy pro kultivaci rodu *Proteus* uvádí Tab. 7.

Tab. 7. Půdy používané ke kultivaci rodu *Proteus*:

Půda	Druh	Barva kolonie
Brilliance Uti Agar	<i>Proteus hauseri</i>	běžové kolonie
Cled Medium	<i>Proteus species</i>	průsvitné modré kolonie

[6]

1.3.6 Rod *Serratia*

Gramnegativní tyčinky s barvou kolonie bílou, růžovou nebo červenou [3]. Optimální teplota růstu 30-37 °C [4]. *Serratia marcescens* tvoří za aerobních podmínek mezi 12-36 °C červený pigment [3]. Glukózu a další sacharidy okyselují, často s tvorbou plynu, oxidáza negativní, kataláza pozitivní. Vyskytuje se v humánním klinickém materiálu, půdě, vodě, v mléce, zmrzlině, v mléčných výrobcích, kávě z automatu, vejci a mase, na povrchu rostlin a obecně v prostředí [4, 9]. Zástupci tohoto rodu jsou *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia plymuthica* a *Serratia odorifera* [3, 4]. Způsobuje kažení potravin [3]. *Serratia marcescens* je význačným patogenem pro hospitalizované pacienty, způsobuje septikémie a infekce močových cest. Dále způsobují mastitidy u krav i různé infekce zvířat

[4]. Ke kultivaci tohoto rodu se mohou použít China Blue Lactose Agar, Simmons Citrate Agar, X.L.D. Agar (žluté matné kolonie) [6].

1.3.7 Rod *Enterobacter*

Mezi zástupce tohoto rodu patří *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter sakazakii* a *Enterobacter gergoviae* [3, 4]. Jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní mikroorganismy [10]. Okyselují glukózu i jiné sacharidy. Je to enterobakterie široce rozšířená v prostředí, nachází se ve sladké vodě, půdě, odpadní vodě, na rostlinách, zelenině, ve zvířecích výkalech i lidské stolici, sekundárně i v mléku. Optimální teplota růstu je 30-37 °C [3]. Zúčastňují se kažení potravin [4]. Půdy pro kultivaci rodu *Enterobacter* uvádí Tab. 8.

Tab. 8. Půdy používané ke kultivaci rodu *Enterobacter*:

Půda	Druh	Barva kolonie
Brilliance Enterobacter Sakazakii Agar	<i>Enterobacter sakazakii</i>	modrozelené kolonie
Chromogenic Uti Medium (CLEAR)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	purpurové kolonie
Bile Aesculin Agar	<i>Enterobacter aerogenes</i>	hnědé kolonie

[6, 8]

1.3.8 Ostatní zástupci

➤ Rod *Klebsiella*

Nejnámější druhy jsou *Klebsiella pneumoniae* (lidský patogen), *Klebsiella oxytoca*. Jedná se o gramnegativní rovné tyčky vyskytující se jednotlivě, po dvou, nebo v krátkých řetězcích, buňky jsou opouzdřené a nepohyblivé. Jsou fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní, mající jak respiratorní tak i fermentatorní typ metabolismu. Optimální

teplota růstu je 37 °C . Jsou oxidáza negativní a kataláza pozitivní, okyselují velkou řadu cukrů (glukózu fermentují za tvorby plynu) a cukerných alkoholů. Vyskytuje se v střevním traktu lidí a zvířat, půdě a vodě, na skořápkách vejce. Může způsobovat infekci močových cest i jiné infekce člověka [4]. Zúčastňuje se kažení potravin a to vajec, sýrů (např. sýru mozzarella, kdy dochází k tvorbě plynu a tím k nafouknutí obalu), vakuově baleného masa, mléka [3, 20, 21].

➤ Rod *Citrobacter*

Rod *Citrobacter* je běžným obyvatelům střevního traktu člověka, ale ve vyšších koncentracích může způsobit onemocnění oslabených jedinců. Je tedy podmíněně patogenní [1]. Druhový zástupci jsou *Citrobacter freundii*, *Citrobacter boisei*. Jsou obvykle pohyblivé pomocí peritrichních bičků s chemoorganotrofním, respiratorním i fermentatorním typem metabolismu. Optimální teplota růstu je 37 °C. Okyselují glukózu a další sacharidy s tvorbou plynu, jsou oxidáza negativní a kataláza pozitivní. Vyskytuje se ve vodě, půdě a způsobuje kažení potravin hlavně vakuově baleného masa, mléka, kvašeného zelí [4, 22, 23].

➤ Rod *Erwinia*

Způsobuje kažení rostlinných potravin štěpením pektinu. Jedná se o fytopatogen. Druhy jsou *Erwinia carotovora*, *Erwinia amylovora*.

➤ Rod *Hafnia*

Způsobuje kažení bílkovinných potravin. U ryb tvoří histamin, což je biogenní amin, který vzniká z aminokyseliny histidinu dekarboxylací. Vyskytuje se ve střevním traktu, půdě a vodě. Nejznámější druh *Hafnia alvei*.

➤ Rod *Vibrio*

Řadí se do čeledi *Vibrionaceae*. Určité druhy rodu *Vibrio* jsou patogenní např. *Vibrio cholera* je původcem cholery, tj. velmi vážného střevního onemocnění člověka, jež má vysokou úmrtnost [1]. Přenáší se výkaly nemocných lidí, znečištěnou vodou, potravinami a kontaktem [1, 3]. Další známé druhy jsou *Vibrio alginolyticus* a *Vibrio parahaemolyticus*. Vyskytují se ve slaných vodách, rybách, mořských živočiších. *Vibrio alginolyticus* způsobuje otravu potravinami [3].

➤ Rod *Plesiomonas*

Řadí se rovněž do čeledi *Vibrionaceae*. Spolu s některými druhy z rodu *Vibrio* způsobuje mírná průjmová onemocnění [1]. Nejznámější druh *Plesiomonas shigelloides* dobře roste na médiích pro kultivaci salmonel. Výskyt je zaznamenán na drůbeži.

➤ Rod *Aeromonas*

Patří do čeledi *Aeromonadaceae*. Nejznámější vyskytující se druhy jsou *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida* a *Aeromonas calviae*. *Aeromonas salmonicida* za přítomnosti fenylalaninu a tyroxinu tvoří hnědé pigmenty. Tyto druhy se vyskytují ve vodě, mase, rybách a mléce. Způsobuje kažení bílkovinných potravin. Druh *Aeromonas hydrophila* je patogen [3].

1.4 Grampozitivní tyčinky nesporeující fakultativně anaerobní

Čeď *Listeriaceae*

Pravidelné, nespíralující, grampozitivní tyčky, které jsou kataláza pozitivní a růstem fakultativně anaerobním. Jedná se o nově navrženou čeď obsahující v současnosti dva rody, ale významné z hlediska klinické i potravinářské mikrobiologie.

1.4.1 Rod *Brochotrix*

Jedná se o pravidelné nevětví se tyčky vyskytující se jednotlivě, v krátkých řetízcích nebo v dlouhých vláknech z řetízků, které jsou zohýbány do masy složené z mnoha smyček. Ve starší kultuře se vyskytují kokovité formy. Grampozitivní, netvoří pouzdra, nepohyblivé, nespíralující, fakultativně anaerobní a nepigmentující. Rostou v teplotním rozmezí 0-30 °C s optimem 20-25 °C. Hlavním produktem fermentace glukózy je L(+)-laktát. Kataláza pozitivní. Vyskytují se především v masných produktech, ale jsou široce rozšířené v prostředí [4]. Druh *Brochotrix thermosphacta* je důležitý organizmus podílející se na kažení masa a masných výrobků, roste i při chladničkové teplotě a ve vakuovém balení [3, 4, 7].

1.4.2 Rod *Listeria*

Pravidelné krátké tyčky se zakulacenými konci, občas kokovitý tvar, vyskytují se jednotlivě nebo v krátkých řetízcích, méně často v dlouhých vláknech (starší kultury). Jsou grampozitivní, nespíralující, neacidorezistentní a netvoří pouzdra. Při kultivaci ve 20-25 °C

jsou pohyblivé několika peritrichálními bičíky. Bakterie rodu *Listeria* jsou fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní s fermentačním metabolismem. Hlavním produktem fermentace glukózy je L(+)-laktát, okyselují řadu cukrů, ale bez tvorby plynu. Tento rod je kataláza pozitivní a oxidáza negativní. Optimální růstová teplota je 30-37°C [6]. Přežívá ve 20% NaCl při teplotě 4 °C až osm týdnů [3]. Půdy pro kultivaci rodu *Listeria* uvádí Tab. 9. Listerie jsou široce rozptýlené v přírodě, vodě, bahně, odpadových vodách, na rostlinách a výkalech zvířat a lidí [3, 4]. Kontaktem s infikovanými zvířaty nebo nepřímo s kontaminovanými potravinami, jako mléko, sýry a zeleniny se může přenést na oslabeného člověka (děti, těhotné ženy, starší lidi) a vyvolat encefalitidu, onemocnění jater a jiné nemoci s poměrně vysokou úmrtností [3, 1]. Na sýrech tvoří červené skvrny [24]. Druhy jsou *Listeria monocytogenes* a *Listeria innocua* [4].

Tab. 9. Půdy používané ke kultivaci rodu *Listeria*:

Půda	Druh	Barva kolonie
Brilliance Listeria Agar Base + Brilliance Listeria Selective Supplement + Brilliance Listeria Differential Supplement	<i>Listeria monocytogenes</i>	modrozelené kolonie se světlou zónou
Brilliance Listeria Agar Base + Brilliance Listeria Selective Supplement + Brilliance Listeria Differential Supplement	<i>Listeria innocua</i>	modrozelené kolonie se světlou zónou
Chromogenic Listeria Agar (ISO)	<i>Listeria monocytogenes</i>	modrozelené kolonie se světlou zónou
Agar Listeria Ottavani & Agosti Medium (ALOA)	<i>Listeria monocytogenes</i>	modré kolonie s bílou zónou

[6, 25, 26]

1.5 Grampozitivní tyčinky nesporeující aerotolerantní anaerobní

Čeľad' *Lactobacillaceae*

Čeľad' grampozitivních bakterií zahrnující v současnosti tři rody klasických bakterií mléčného kvašení. Jedná se o pravidelné, nesporeující grampozitivní tyčky nebo koky. Které jsou nepigmentující, mezofilní, chemoorganotrofní a rostou pouze na kompletním médiu. Druhově početným rodem je rod *Lactobacillus*, jehož více než sedm desítek druhů je poměrně dobře charakterizováno [4]. Jeho druhy se vyskytují v mléce, kde vyvolávají přirozené kysání (tj. zkvašování laktózy na kyselinu mléčnou). Protože mléčná kyselina zastavuje rozmnožování hnilobných bakterií a stafylokoků, využívá se činnost mléčných bakterií pro konzervaci zeleniny a některých krmiv. V mlékárenském průmyslu se homofermentativní laktobacily používají při výrobě sýrů, kysaného mléka, jogurtů a dalších výrobků. Některé laktobacily se vyskytují jako nežádoucí kontaminace ve vinařství a pivovarnictví [1].

1.5.1 Rod *Lactobacillus*

Buňky tohoto rodu mají tvar pravidelných tyček, tyčky obvykle delší, občas také kokovité, uspořádané v palisádách nebo krátkých řetězcích. Jedná se o grampozitivní, nesporeující, pouze zřídka pohyblivé peritrichálními bičíky, které jsou fakultativně anaerobní, občas mikroaerofilní (slabý růst na vzduchu, ale lepší růst při redukované koncentraci kyslíku), někteří zástupci vyžadují při izolaci anaerobní podmínky. Obecně platí, že přítomnost 5% CO₂ podporuje růst laktobacilů. Bakterie toho rodu jsou chemoorganotrofní, vyžadují bohatá komplexní média a jejich metabolismus je fermentatorní. Neredukují nitráty, nehydrolyzují želatinu, jsou kataláza negativní. Optimální růstová teplota je 30-40 °C a optimum pH obvykle 5,5 až 6,2. Půdy pro kultivaci rodu *Lactobacillus* uvádí Tab. 10. Laktobacily jsou široce rozšířené v prostředí, obzvláště v nejrůznějších potravinách živočišného nebo rostlinného původu, v nápojích, čisté i znečištěné vodě, kysaném zelí, silážích. Tvoří část normální ústní flóry mnoha teplokrevných živočichů i člověka. Pouze vzácně jsou patogenní [4]. Rod *Lactobacillus* je jedním z nejběžnějších mléčných kultur užívaných v produkci různorodých výrobních sortimentů včetně acidofilního podmásí, jogurtu, keфіru, sýru a dalších, kde přispívají k chuti díky produkci kyseliny mléčné, octové a acetaldehydu [27]

Na základě konečných produktů fermentace cukrů je možno dělit laktobacily do tří skupin :

I. skupina – obligátně homofermentativní:

Hexózy fermentují výhradně na kyselinu mléčnou. Patří sem druhy *Lactobacillus delbrueskii* ssp. *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueskii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueskii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus farciminis* [3, 4]. Vyskytují se v mléce a v mléčných výrobcích, v masových produktech, v pečárenském kvase, jablečném moště a víně a v hroznovém moště. Některé se využívají ve formě čistých zákysových kultur při výrobě jogurtů, acidofilního mléka, tvarohu, sýrů, kynutého těsta [3].

II. skupina – fakultativně heterofermentativní:

Hexózy fermentují na kyselinu mléčnou nebo na směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a etanolu, pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou. Patří sem druhy *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, *Lactobacillus casei* ssp. *pseudoplantarum*, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* ssp. *tolerans*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bavaricus* [3, 4]. Vyskytují se v mléce, sýrech, mléčných a masových produktech, pečárenském kvasu. Některé jsou v mlékárenském průmyslu (*L. casei*) a v konzervárenském průmyslu (*L. bavaricus*) používané ve formě čistých kultur [3].

III. Skupina – obligátně heterofermentativní:

Hexózy fermentují na kyselinu mléčnou, octovou, etanol a CO₂, pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou. Řadí se zde druhy *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus bifermantans*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus fructivorans*, a jiné [3, 4]. Tyto druhy se vyskytují v mléce a mléčných produktech, masových výrobcích (vakuově balených), fermentované zelenině, pečárenském kvasu. Zúčastňují se kažení potravin. Některé kmeny laktobacilů produkují bakteriociny, např. *Lactobacillus acidophilus* Laktocin B, L a *Lactobacillus helveticus* Laktocin LP27 [3].

Tab. 10. Půdy používané ke kultivaci rodu *Lactobacillus*:

Půda	Druh	Barva kolonie
Universal Beer Agar	<i>Lactobacillus fermentum</i>	běžové kolonie
Tomato Juice Agar	<i>Lactobacillus fermentum</i>	krémové kolonie
Raka-Ray Agar	<i>Lactobacillus fermentum</i>	mléčné kolonie
MRS Agar	<i>Lactobacillus fermentum</i>	mléčné kolonie

[6]

1.6 Grampozitivní koky aerotolerantní

Čeleď *Streptococcaceae*

Buňky jsou sférické nebo ovoidní, vyskytující se po dvou nebo v řetízcích rozmanité délky. Jsou grampozitivní, nepohyblivé, netvořící endospory. Jedná se o chemoorganotrofní mikroorganismy, které mají fermentační metabolismus, kdy z cukru tvoří kyselinu mléčnou, octovou, mravenčí, etanol a CO₂. Bakterie této čeledi jsou fakultativně anaerobní, kataláza negativní, mohou být nutričně náročné a vyžadují komplexní médium [4]. Některé druhy mohou být patogenní [1].

1.6.1 Rod *Streptococcus*

Rod *Streptococcus* obsahuje katalázo negativní, grampozitivní koky uspořádané do párů a řetízků, které jsou fakultativně anaerobní [3]. Tvoří enzymy, které rozkládají červené krvinky v krevním agaru, což má za následek nazelenalé zbarvení (α - hemolýza) nebo úplné projasnění média (β - hemolýza) [1, 4]. Optimální teplota růstu je 37 °C, nerostou při 10 °C. Půdy pro kultivaci rodu *Streptococcus* uvádí Tab. 11. Streptokoky jsou parazity

Obratlovců, osídlují převážně ústní dutinu a horní část respiračního traktu, některé druhy jsou vysoce patogenní pro člověka a zvířata. Velmi často jsou streptokoky děleny do čtyř skupin na pyogenní, orální, ostatní a anaerobní streptokoky. Druhově nejpočetnější je skupina orálních streptokoků [4].

➤ Pyogenní β – hemolytické streptokoky:

Tato skupina obsahuje pět druhů a to *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus equi* ssp. *equi*, *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus canis* a *Streptococcus iniae*. *Streptococcus pyogenes* je patogenní pro člověka [3, 4].

➤ Orální streptokoky

Do této skupiny patří *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans* a další. Tyto druhy se vyskytují v dutině ústní a v horní části dýchacího traktu [4]. Streptokokové infekce mohou být přenášeny jídlem [28].

➤ Ostatní streptokoky

Druhy *Streptococcus acidominimus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*. V této skupině je zařazený i mlékárensky významný rod *Streptococcus thermophilus*. Vyskytuje se v mléce a v mléčných produktech nativní, ale i jako část složky čistých zákysových mlékárenských kultur používaných při výrobě jogurtů, tvarohů a sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou.

➤ Anaerobní streptokoky :

Skupina, která vyžaduje striktně anaerobní podmínky. Druhy, které patří do této skupiny jsou *Streptococcus hansenii* a *Streptococcus pleomorphus* [3, 4].

Tab. 11. Půdy používané ke kultivaci rodu *Streptococcus*:

Půda	Druh	Barva kolonie
Columbia CNA Agar	<i>Streptococcus pyogenes</i>	bílé kolonie
MRS Agar	<i>Streptococcus thermophilus</i>	mléčné kolonie

[6]

1.6.2 Rod *Lactococcus*

Buňky jsou sférické nebo ovoidní, vyskytují se po dvou a v krátkých řetězcích. Jsou grampozitivní, netvoří spory a jsou nepohyblivé a bez pouzder. Jedná se o fakultativně anaerobní mikroorganismy, chemoorganotrofní s fermentačním metabolismem, které k růstu vyžadují nutričně kompletní média. Využívají množství cukrů a hlavním produktem fermentace je kyselina mléčná, ale ne plyn. Jsou kataláza a oxidáza negativní [4]. Optimální teplota růstu je 37 °C. Mohou růst i při 10 °C, ale ne při 45 °C a nemohou růst s 0,5% NaCl [9]. Významné druhy jsou *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus garvieae*. Vyskytují se převážně v rostlinném materiálu a potravinách, dále v mléce a mléčných výrobcích (startovací kultury). Jsou obecně považovány za nepatogenní pro člověka [4]. Kultivovat se mohou na půdě MRS Agar (DE MAN, ROGOSA, SHARPE) [6].

1.6.3 Rod *Enterococcus*

Rod *Enterococcus* se řadí do čeledi *Enterococcaceae* a tvoří grampozitivní koky, morfologicky a fermentačně podobné mléčným streptokokům [3]. Jsou kataláza negativní. Optimální teplota růstu je 37 °C, ale rostou i při 10 °C a 45 °C [1, 6]. Půdy pro kultivaci rodu *Enterococcus* uvádí Tab. 12. Původním stanovištěm je intestinální trakt lidí a zvířat a také obvykle se vyskytují v zelenině, rostlinném materiálu a jídlech, zvláště zvířecího původu [9]. Sekundárně se nachází v mléku a v mléčných produktech a také v produktech s vyšším obsahem soli (sýry, uzeniny). Dekarboxylací aminokyselin způsobují vznik biogenních aminů [3]. Druhy jsou *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus*

faecium, *Enterococcus durans*, *Enterococcus malodoratus* a další [4]. *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* jsou indikátorem fekálního znečištění [1].

Tab. 12. Půdy používané ke kultivaci rodu *Enterococcus*:

Půda	Druh	Barva kolonie
Slanetz and Bartley Medium	<i>Enterococcus faecalis</i>	tmavě červené kolonie
Brilliance Uti Agar	<i>Enterococcus faecalis</i>	modrozelené kolonie

[6]

1.6.4 Rod *Leuconostoc*

Tento rod patří do čeledi *Leuconostocaceae*. Jedná se o buňky sférického nebo ovoidního tvaru, uspořádané do dvojic nebo řetězců. Občas mají tvar krátkých tyčků se zakulacenými konci, vyskytující se v dlouhých řetězcích. Tyto bakterie jsou grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující. Růst je pomalý, vytváří malé kolonie, které mohou být mukózní na médiích obsahujících sacharózu. Jedná se o fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní mikroorganismy, které vyžadují nutričně bohatá média, jsou kataláza negativní a neredukují nitráty. Optimální růstová teplota je 20-30 °C [4]. Glukózu fermentují za tvorby kyseliny mléčné, etanolu a CO₂ [1]. Většina leukonostoků disimiluje citran za přítomnosti laktózy za tvorby acetoinu, diacetylu a 2,3 – butylenglykolu [3, 24]. Diacetyl má významný aromatický charakter [3]. Jsou široce rozšířeny na rostlinách a v mléčných produktech, běžně přítomny i v jiných potravinách. Obecně považovány za nepatogenní. V současnosti obsahuje rod *Leuconostoc* druhy *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc lactis* [3, 4]. Druh *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum* a *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* bývají složkou mezofilních zákysů pro významnou tvorbu aromatické látky diacetylu. Dále se druh *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* využívá v konzervárenství (kyselé zelí), v cukrovarnictví způsobuje fermentaci sacharózy na kyselinu mléčnou a tvorbu slizovitých dextranů, které ucpávají zařízení [4]. *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum* se používá pro průmyslovou výrobu dextranů pro lékařské

účely (náhražka krevní plazmy) [1]. Ke kultivaci může být použit Acetate Agar nebo MRS Agar [6, 8].

1.6.5 Rod *Pediococcus*

Tento rod se řadí do čeledi *Lactobacillaceae*. Buňky jsou sférické, nikdy nejsou prodloužené, tvoří tetrády, vzácně uspořádané jednotlivě nebo ve dvojicích. Tvoří grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující, fakultativně anaerobní koky, které jsou chemoorganotrofní, vyžadují nutričně bohatá média a fermentovatelné cukry (monosacharidy a disacharidy). Glukóza je fermentovaná za současné produkce kyseliny mléčné, ale ne plynu. Kataláza negativní, neredukují nitráty, optimální růstová teplota je 25-40 °C. Vyskytují se hojně na rostlinném materiálu, v potravinách, nápojích. Jsou považovány za nepatogenní pro rostliny a živočichy [4]. Hlavní druhy *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus parvus*, *Pediococcus halophilus* [3, 4]. Druh *Pediococcus acidilactici* se používá v mlékárenství a masném průmyslu jako fermentační kultura, dále při kysání zelí [3, 29]. *Pediococcus damnosus* se zúčastňuje kažení piva tvorbou diacetylu, který nepříznivě ovlivňuje vůni a chuť piva [4]. Dále se podílí na kažení masových produktů a výrobku studené kuchyně [3]. Ke kultivaci se může použít Universal Beer Agar, MRS Agar nebo Acetate Agar [6, 8].

1.7 Grampozitivní koky aerobní a fakultativně anaerobní

1.7.1 Rod *Micrococcus*

Patří do čeledi *Micrococcaceae* s druhy *Micrococcus luteus*, *Micrococcus roseus*, *Micrococcus variant*, *Micrococcus kristinae*. Grampozitivní, nepravidelně uspořádané koky, některé gramnegativní. Jsou nepohyblivé, nesporulující, kataláza a oxidáza pozitivní, striktně aerobní. Z cukrů produkují malé nebo žádné množství kyselin. Redukují dusičnany. Pomalu ztekucují želatinu. Na agarových médiích dobře rostou, některé kolonie jsou žlutě, oranžově až červeně pigmentované. Optimální teplota růstu je 20-25 °C. Vyžadují komplexní média, nesnáší kyselé prostředí. Vyskytují se v mléce, mléčných produktech, půdě, vodě, vzduchu a v masě [3, 4]. Také na solených potravinách, kde mohou tvořit žluté, oranžové až červené kolonie. Toto zbarvení je způsobeno nerozpustnými karotenoidními barvivy, přítomnými v jejich buňkách, které chrání buňku

před letálními účinky ultrafialové složky slunečního světla [1]. Obecně jsou považovány za nepatogeny [4]. *Micrococcus rosus* je součástí mazové sýrařské kultury [3]. Ke kultivaci mohou být použita tato média Fermentation Medium for Staphylococcus and Micrococcus, CLED Medium (Cystine Lactose Electrolyte Deficient) [6, 8].

1.7.2 Rod *Staphylococcus*

Čeleď *Staphylococcaceae* s druhy *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus carnosus* jsou grampozitivní kokovité buňky uspořádané do hroznovitých útvarů, nepohyblivé, nesporující. Dobře rostou na agarových médiích, některé tvoří žlutý až oranžový pigment. Jsou silně kataláza pozitivní a oxidáza negativní, halotolerantní a redukuje dusičnan [3, 4]. Fermentují sacharidy a za jejich přítomnosti rostou i anaerobně. Optimum růstu 37 °C. Nesnáší kyselé prostředí [3]. Půdy pro kultivaci rodu *Staphylococcus* uvádí Tab. 13. Vyskytují se na pokožce, v nosohltanu, hnisavých ranách a na potravinách jako je mléko, sýry, klobásy, šunka a jiné bílkovinné potraviny [28]. Způsobují stafylokokové enterotoxikozy (alimentární otravy) [3]. *Staphylococcus carnosus* je součást masných startovacích kultur (při výrobě klobás a fermentovaných výrobků) [3, 4]. *Staphylococcus aureus* je potenciální patogen [3].

Tab. 13. Půdy používané ke kultivaci rodu *Staphylococcus*:

Půda	Druh	Barva kolonie
Mannitol Salt Agar	<i>Staphylococcus aureus</i>	žluté kolonie se žlutou zónou
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	růžové kolonie s růžovou zónou
Staphylococcus Medium NO.110	<i>Staphylococcus aureus</i>	mléčné kolonie

[6]

1.8 Grampozitivní koky anaerobní

1.8.1 Rod *Sarcina*

Patří do čeledi *Clostridiaceae* s druhy *Sarcina ventriculi*, *Sarcina maxima* [1]. Vyskytují se v krychlovitých balíčcích z osmi nebo více buněk. Některé buňky se vyskytují jednotlivě nebo po dvou v tetrádách. Buňky jsou obvykle zploštělé v místech kontaktu se sousedícími buňkami. Jsou grampozitivní, anaerobní, nepigmentující a nepohyblivé. Mohou vytvářet spory. Chemoorganotrofní, vyžadují bohatá média a sacharidy [4]. Metabolismus je fermentatorní se sacharidy jako substráty, glukózu fermentuje na etanol, kyselinu octovou, kyselinu máselnou, H₂ a CO₂ [3, 4]. Tento rod je kataláza negativní s optimální růstovou teplotou 30-37 °C a velkým rozmezím pH pro růst od 1,0 po 9,8 [4]. Netvoří pigmenty. Široce rozšířené v prostředí, izolované ze vzduchu, půdy, povrchu obilovin, otrub, lidského a zvířecího intestinálního traktu [3].

1.9 Grampozitivní tyčinky sporulující aerobní nebo fakultativně anaerobní

1.9.1 Rod *Bacillus*

Tvarově jsou to rovné tyčky různé délky, často uspořádané ve dvojicích nebo v řetězcích se zakulacenými nebo čtvercovými konci. Barví se grampozitivně a jsou pohyblivé pomocí peritrichálních bičíků. Endospory jsou oválné nebo kulaté a jsou velmi rezistentní k mnoha nepříznivým podmínkám. Optimální teplota růstu je 15-55 °C. Dobře rostou v rozmezí pH 5,5 až 8,5. Chemoorganotrofní s fermentatorním nebo respiratorním metabolismem, obvykle kataláza pozitivní. Někteří zástupci produkují pigmenty nebo pouzdra [4]. Půdy pro kultivaci rodu *Bacillus* uvádí Tab. 14. Mají bohaté enzymové vybavení, takže mohou rozkládat nejrůznější organické sloučeniny. Většina druhů má velmi aktivní amylytické enzymy, které štěpí škrob, řada druhů má pektolytické enzymy, které štěpí rostlinné pektiny, a většina druhů má velmi aktivní proteolytické enzymy, takže se uplatňuje při aerobním a anaerobním rozkladu bílkovin [1]. Několik druhů je patogenních nebo způsobují potravinové otravy [4]. Vyskytují se v půdě, potravinách, v tepelně upravených a potom nedostatečně zchlazených jídlech, v dlouho uchovávaném pasterizovaném mléku v chladu, na povrchu ovoce a zeleniny [3, 4, 14]. Patří do čeledi *Bacillaceae* s druhy, které

se dělí na chladotolerantní *Bacillus insolitus*, *Bacillus globisporus*, mezofilní *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis* a jiné. Mezi termofilní druhy patří *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis* [3, 4]. *Bacillus anthracis* je pro zvířata a lidi patogenní. Pomocí některých druhů se vyrábí polypeptidové antibiotika a proteolytické enzymy [3]. Velký význam v konzervářenském průmyslu mají termofilní bacily, jejich spory jsou silně termorezistentní, takže často přežívají tepelný sterilizační zákrok u nekyselých zeleninových a masových nebo masozeleninových konzerv. Patří sem především *Bacillus stearothermophilus*, který může být příčinou tzv. plynuprostého kysnutí nekyselých konzerv, neboť při vhodné teplotě tvoří značné množství kyselin [1]. *Bacillus cereus* produkuje při růstu na polysacharidových substrátech toxiny, které mohou být příčinou otrav. Nejčastější příčinou těchto otrav jsou potraviny obsahující obiloviny nebo škrob (polévky, vařená rýže, pudinky, bramborová kaše, játrová paštika apod.). Příznaky se projevují nevolností, bolestí břicha, průjmami nebo zvracením [1, 9].

Tab. 14. Půdy používané ke kultivaci rodu *Bacillus*:

Půda	Druh	Barva kolonie
Brilliance Bacillus Cereus Agar + Brilliance Bacillus Cereus Selective Supplement	<i>Bacillus cereus</i>	modrozelené kolonie
Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP Agar)	<i>Bacillus cereus</i>	jasné růžové kolonie

[6]

1.9.2 Rod *Clostridium*

Patří do čeledi *Clostridiaceae* s druhy, které se dělí na proteolytické tj. *Clostridium botulinum* typ A, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium histolyticum* a jiné. Další druhy se dělí na sacharolytické a patří sem *Clostridium botulinum* typ E, *Clostridium butyricum*, *Clostridium felsineum*, *Clostridium pasterianum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium perfringens* a jiné [3, 4]. Rod *Clostridium* je velmi rozsáhlý a z potravinářského hlediska velmi důležitý. Jeho druhy tvoří peritrichní tyčky, které jsou grampozitivní, kataláza

negativní [1, 4]. Spora je širší než vegetativní buňka [1]. Optimální teplota růstu je 30-37 °C. Půdy pro kultivaci *rodu Clostridium* uvádí Tab. 15. Vyskytují se v půdě, mléku, sýrech. Způsobují kažení tepelně upravených a potom nedostatečně chlazených jídel [3, 14]. Některé druhy mají silné proteolytické schopnosti a uplatňují se při anaerobním rozkladu bílkovin (např. *C. sporogenes*), jiné mají silné sacharolytické schopnosti a vedle jednoduchých cukrů využívají i oligosacharidy a škrob, některé druhy dokonce štěpí i celulózu. Při anaerobní oxidaci sacharidů tvoří příslušníci *rodu Clostridium* velké množství plynu (CO₂ a H₂). Tvorba plynu se nepříznivě projevuje např. v sýrařství (duření sýrů), kde však jsou klostridie nežádoucí také pro tvorbu nepříjemně páchnoucích sloučenin, především máselné kyseliny. Některé druhy *klostridií* produkují velmi nebezpečné toxiny [1]. Z potravinářského hlediska je nejdůležitější *Clostridium botulinum*, produkující tzv. botulotoxiny (klobásový jed), které patří k nejúčinnějším jedům (1 mg představuje smrtící dávku pro 16 000 lidí), podle jehož odlišné struktury se rozlišuje 7 subtypů označených A až G. Typy A, B, E a F způsobují onemocnění člověka a typy C a D zvířat [1, 3, 4]. Dalším druhem produkujícím toxin je *Clostridium perfringens*, jež je popisovaný jako nejvíce všudypřítomná patogenní bakterie v našem prostředí. Produkuje až 12 biologicky aktivních toxinů [8]. Otrava však nastává pouze při silné kontaminaci potravin touto bakterií [1].

Tab. 15. Půdy používané ke kultivaci *rodu Clostridium*:

Půda	Druh	Barva kolonie
Membrane Clostridium Perfringens (m-CP) Medium	<i>Clostridium perfringens</i>	růžové nebo červené kolonie
Perfringens Agar (OPSP)	<i>Clostridium perfringens</i>	černé kolonie

[6]

1.10 Grampozitivní tyčinky nepravidelné anaerobní

1.10.1 Rod *Bifidobacterium*

Jedná se o čeleď *Bifidobacteriaceae* s druhy *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*. Jsou velmi nepravidelné, často se větvcí, grampozitivní, kataláza negativní, nesporulující delší a kratší pohyblivé tyčinky. Rostou jednotlivě nebo v řetězcích v hvězdicovitém, palisádovém nebo nepravidelné uspořádání. Optimální teplota růstu je 37-41 °C [3]. Bifidobakterie jsou prospěšnou součástí střevní flóry, kde pomáhají udržovat rovnováhu a znesnadňují jiným patogenním mikroorganismům pomnožení ve střevech [4]. Ve formě čistých kultur, spolu s jinými bakteriemi mléčného kvašení se používají na výrobu skupiny probiotických kysaných mlék, např. *Bifidobacterium longum* BB536 [1]. Jsou náchylná k penicilinu a tento rod se může kultivovat na médiu MRS Agar [6, 27].

1.11 Grampozitivní tyčinky nepravidelné aerobní a fakultativně anaerobní

1.11.1 Rod *Corynebacterium*

Buňky tohoto rodu patří do čeledí *Corynebacteriaceae* s druhy *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium glutamicum*. Tvoří rovné nebo zakřivené tyčinky se zúženým nebo tlustým koncem (kyjovité formy) [4, 6]. Obvykle uspořádané jednotlivě nebo ve dvojicích nebo v krátkých palisádách. Barví se grampozitivně a vyžadují nutričně bohatá média. Buňky jsou nepohyblivé, nesporulující, neacidorezistentní, kataláza pozitivní. [4, 30]. Korynebakterií jsou více než dvě desítky druhů z nichž je řada patogenních [4]. Některé nepatogenní druhy se používají pro průmyslovou výrobu řady aminokyselin např. *Corynebacterium glutamicum* pro výrobu glutamové kyseliny nebo aminokyseliny lysinu [1]. Půdy pro kultivaci rodu *Corynebacterium* uvádí Tab. 16.

Tab. 16. Půdy používané ke kultivaci rodu *Corynebacterium*:

Půda	Druh	Barva kolonie
Tinsdale Agar Base + Tinsdale Supplement	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	černé kolonie

[6]

1.11.2 Rod *Arthrobacter*

Tento rod s nejznámějším druhem *Arthrobacter globiformis*, patří do čeledi *Micrococcaceae* [4]. V mladých kulturách se vyskytují jako gramnegativní tyčinky s často grampozitivními granulami, v starších kulturách se tvoří velké koloidní buňky, striktně aerobní, katalázo pozitivní, netvoří endospory [9]. Sacharidy nefermentují nebo jen velmi málo. Optimální teplota růstu je 20-30 °C [3]. Většina druhů vyžaduje bohaté růstové prostředí, kolonie na půdách jsou u většiny druhů zbarveny žlutě až oranžově [6]. Vyskytují se ve vodě, rostlinách, tvoří sliz na čerstvých rybách [3].

1.11.3 Rod *Brevibacterium*

Z čeledi *Brevibacteriaceae* s druhem *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium linens*. Buňky u mladé kultury jsou nepravidelné tyčky, vyskytující se jednotlivě, po dvou ve tvaru „V“, mohou být i větvené, ale netvoří mycelium. Ve starší kultuře jsou tyčky rozděleny do malých koků. Grampozitivní, starší kultury se mohou barvit gramnegativně, nepohyblivé, nesporulující, neacidorezistentní. Striktně aerobní, kataláza pozitivní, glukózu neokyselují. Optimální teplota růstu je 20-35 °C. Kolonie mohou být pigmentované, a to žlutooranžové nebo purpurové [4]. Druhy rodu *Brevibacterium* jsou široce rozšířené v mléčných výrobcích a byly zjištěny také na kůži člověka, na rybách a v prostředí [3, 4]. V mlékárenském průmyslu se používá *Brevibacterium linens* ve formě tzv. mazové kultury, při zrání sýrů zrajících pod mazem [24].

1.11.4 Rod *Cellulomonas*

Tento rod patří do čeledi *Cellulomonadaceae* s druhem *Cellulomonas flavigena*. Mladé kultury tvoří štíhlé nepravidelné tyčky, které mohou být rovné nebo mírně zakřivené, uspořádané po dvou, někdy ve tvaru „V“ nebo větvcí se. U starší kultury jsou tyčky kratší

a mohou se vyskytovat i koky. Barví se grampozitivní, ale snadno se odbarvují. Většinou jsou pohyblivé, nesporulující, neacidorezistentní a kataláza pozitivní. Optimální teplota růstu je 30 °C. Kolonie jsou žlutě pigmentované a tento rod se vyskytuje se v půdě a potravinách [4]. Zúčastňují se kažení oliv [3]. Důležitou schopností je štěpit celulózu, škrob a želatinu [1, 3].

1.11.5 Rod *Mycobacterium*

Patří do čeledi *Mycobacteriaceae* s druhy *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium avium*. Rovné nebo mírně zahnuté, pomalu rostoucí tyčinky, někdy větvené [3]. Jsou acidorezistentní, nepohyblivé, nesporulující. Rostou pomalu při optimální teplotě 37 °C a pH 6,4-6,7. Pokud jsou vystaveny světlu, tak kolonie pigmentují (žlutě, oranžově a růžově), ale pigment neprostupuje do média [4]. Patogenní druhy rodu *Mycobacterium* způsobují různé lidské a zvířecí formy tuberkulózních onemocnění. Z potravinářsko-mikrobiologického hlediska se může *Mycobacterium tuberculosis* vyskytnout v mléku, když má dojnice tuberkulózu.

1.11.6 Rod *Propionibacterium*

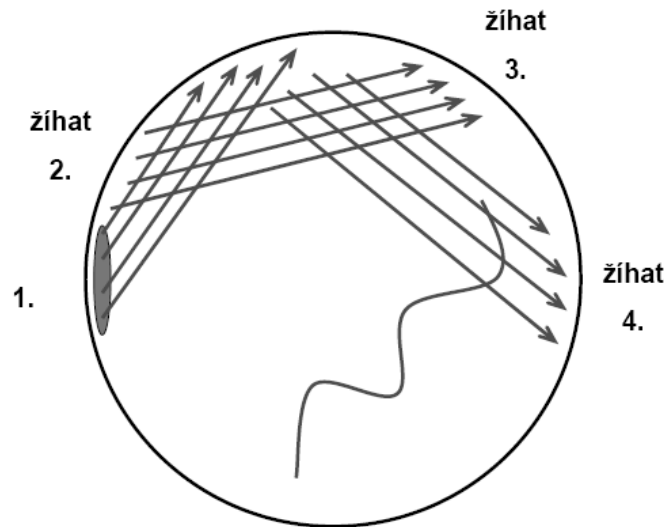
Tento rod se řadí do čeledi *Propionibacteriaceae* s druhy *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii*, *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*, *Propionibacterium jensenii*, *Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium acidipropionici* [3]. Jedná se o pleomorfní tyčinky až koky, někdy větvené, nepohyblivé, nesporulující, anaerobní až aerotolerantní, kataláza pozitivní. Sacharidy fermentují na významné množství kyseliny propionové, CO₂, H₂O, kyselinu mravenčí a dalších [3, 4]. Optimální teplota růstu je u mléčných druhů 30-32 °C, u kožních 36-37°C. Potravinářsky jsou důležité v sýrech s vysokodohřívanou sýřeninou s významnou tvorbou ok v těstě (ementálského typu). Vyskytují se v siláži, fermentovaných olivách a v půdě [3]. *Propionibacterium acidipropionici* se využívá na výrobu kyseliny propionové [1]. *Propionibacterium jensenii* a *Propionibacterium thoenii* jsou kontaminanty tvořící v sýrech hnědočerné skvrny [3].

1.11.7 Rod *Microbacterium*

Řadí se do čeledi *Microbacteriaceae* druhy *Microbacterium lacticum*, *Microbacterium liquefaciens*. Krátké grampozitivní tyčinky, tvoří V-formy a palisády, nepohyblivé, kataláza pozitivní, želatinu neštěpí. Glukózu a laktózu okyselují. Dusičnany redukuje. Optimální teplota růstu je 30 °C [3]. Vyžadují nutričně bohatá média [4]. Nachází se v mléčných výrobcích, na rostlinách v půdě [3].

1.12 Růst mikroorganismů

Kultivace vybraných mikroorganismů byla provedena křížovým roztěrem. Většina kultur získaná přímo z prostředí se skládá z několika druhů mikroorganismů, jedná se tedy o smíšenou kulturu. K získání čisté kultury z přirozeného materiálu se používá izolace. Obvykle se izolují mikroorganismy postupným zředěvacím způsobem, aby kolonie vzniklé rozmnožováním vyrostly pokud možno z jedné buňky. Nejčastěji se používá metoda křížového roztěru. Princip tohoto způsobu izolace spočívá v postupném vyředování původního vzorku na agarové plotny za pomoci bakteriologické kličky tak, aby na konci vyrůstaly jednotlivé kolonie bakterií. Bakteriologickou kličkou se nabere kultura a pečlivě se rozetře na povrch živného média v Petriho misce. Petriho miska se pootočí, vyžihá se klička v plameni a po ochlazení se udělají 3-4 čáry přes hustý nátěr. Petriho miska se opět pootočí a opět se udělají nové čáry. Tento postup se zopakuje a přes poslední 3-4 čáry se vytvoří vlnovka tzv. hádek, který se nesmí dotknout prvních čar [31]. Postup křížového roztěru je zobrazen na Obr. 1.



Obr. 1. Křížový roztěr

Naočkované misky se vloží do termostatu vyhřátého na požadovanou teplotu a na dobu potřebnou k růstu daného mikroorganismu. U bakterií je to 1-2 dny. Po vyjmutí petriho misek se hodnotí růst bakterií na živných půdách.

Hodnocení morfologie kolonií představuje důležitý diagnostický krok. Při posuzování bakteriálních kolonií na pevných půdách na Petriho miskách se hodnotí velikost, pigmentace, tvar, okraje, profil, povrch, transparence, změny okolí, vrůstání do půdy, konzistence a vůně nebo zápach.

- Velikost kolonie - vyjadřuje se průměrem v milimetrech
- Pigmentace - je dána produkcí barevných látek (pigmentů) nebo změnou barvy indikátoru v živné půdě
- Tvar kolonií - může být okrouhlý, pravidelný, nepravidelný, kořenovitý (Obr. 2.)
- Okraje - rovné, laločnaté, zvlňené, zubaté, výběžkaté, vláknité, vyvýšené.
- Profil - může být plochý, mírně vypouklý, vypouklý, výrazně vypouklý nebo pupkovitý.
- Povrch kolonií - hladký, lesklý, matný, drsný a zvrásnělý.
- Transparence - průhledná, průsvitnostmi, neprůsvitná.

- Změny okolí – se posuzují změnou barvy (produkce ve vodě rozpustných pigmentů, změnou pH média – změna barvy indikátoru), na krevním agaru stupně hemolýzy erytrocytů mohou být způsobeny změnou pH (změnou barvy indikátoru)
- Vzdělávání do půdy
- Konzistence - mazlavá, máslovitá, drobivá, vosková, hlenovitá.
- Zápach - fekální, hnilobný, kyselý, nasládlý [32, 33]



Obr. 2. Tvary kolonií

[31]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo charakterizovat mikroorganismy významné v potravinářství a zaměřit se na jejich podmínky růstu, morfologii, fyziologické vlastnosti, výskyt, význam a média, která lze použít k jejich kultivaci. Pozornost byla také věnována kultivacím vybraných mikroorganismů významných v potravinářství. V poslední části bylo úkolem provést cenovou kalkulaci jednotlivých laboratorních cvičení, které budou sloužit pro přehlednost spotřeby materiálu v laboratorních cvičeních z potravinářské mikrobiologie.

Konkrétní cíle diplomové práce byly stanoveny takto:

1. Charakterizovat mikroorganismy významné v potravinářství.
2. Kultivovat vybrané mikroorganismy významné v potravinářství.
3. Provést cenovou kalkulaci jednotlivých laboratorních cvičení.

3 MATERIÁL A METODIKA

➤ Materiál:

Dehydratované komerčně dodávané kultivační půdy (HIMEDIA, Indie), destilovaná voda, odměrný válec, váhy (KERN 440-47N), lžičky, zásobní láhve s víčkem, autokláv (VARIOKLAV-DAMPFSTERILISATOR-STEAM STERILIZER, Německo), Petriho misky, sterilizátor platinových klíčků (OLP), mikrobiologický inkubátor (TERMOSTAT MEMMERT, BIOLOGICAL TERMOSTAT BT, Německo), bakteriologické klíčky, polymyxin B, žloutková emulze.

Tryptone Yeast Extract Agar (TYE):

Tj. tryptonový agar s kvasničným extraktem slouží jako standardní médium ke zjištění počtu heterotrofních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* a druhu *Bacillus cereus*. Připravená půda má světle fialovou barvu [34, 35, 36].

Mannitol Yolk Polymyxin B (MYP):

Používá se ke kultivaci *Bacillus cereus*, který je původcem otrav potravinami. Jedná se o jednoduchý protonový základ, který je doplněn o mannitol a fenolovou červeň, která slouží jako indikátor kvašení mannitolu. Do půdy se ještě přidává polymyxin B a emulze vaječného žloutku. Polymyxin inhibuje růst gramnegativních mikroorganismů, žloutek pomáhá diferencovat kolonie produkující lecitinázu (fosfolipázu). Kultivační půda MYP je zbarvena růžově. *Bacillus cereus* nezkvašuje mannitol, proto se barva média nemění. Kolonie štěpící mannitol (*Bacillus subtilis*) jsou žluté a půda kolem nich je v širokém okruhu žlutě zbarvena.

Endo Agar (EA):

Na Endově půdě rostou jen gramnegativní bakterie. Obsahuje bazický fuchsin, který inhibuje růst grampozitivních mikrobů. Současně je to i půda diagnostická, neboť se na ní dají diagnostikovat mikroorganismy, které rychle štěpí laktózu. Obsahuje totiž kromě živného agarového základu i substrát laktózu. Indikátorem štěpení laktózy je opět bazický fuchsin, pro tento účel odbarvený siřičitanem sodným. Takto odbarvený fuchsin je podstatou Schiffova činidla na aldehydy. Mikroorganismy štěpící laktózu rostou na Endově půdě v tmavočervených koloniích, mnohdy s kovovým leskem vysráženého barviva. Půda kolem kolonie se rovněž barví červeně. U mikroorganismů, které laktózu neštěpí např.

Proteus sp. zůstávají kolonie světlé (průhledné) a barva média se nemění. Některé kmeny, např. *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., rostou v podobě růžových kolonií, avšak beze změny barvy půdy v okolí.

Brilliant Green Agar:

Agar s brilantovou zelení, laktózou, sacharózou a fenolovou červení je vysoce selektivní půda určená k izolaci salmonell. Půda má oranžovou barvu. Na tomto agaru rostou mikroorganismy neštěpící laktózu ani sacharózu v červených, růžových nebo bílých neprůhledných koloniích obklopených jasně červenou zónou precipitace. Koliformní mikroorganismy zčásti vyrůstají ve žlutých až žlutozelených koloniích s intenzivně žlutozeleným okolím.

Xylose Lysine Deoxycholate Agar:

Agar XLD je selektivně diagnostická půda vhodná k izolaci salmonell a shigell. Půda obsahuje thiosulfát sodný, fenolovou červeň jako indikátor pH a citrát železitoamonný jakožto indikátor tvorby sirovodíku. Některé enterobakterie využívají thiosulfát sodný, z něhož produkují sirovodík, což se na půdě projeví zčernáním přítomného indikátoru citrátu železitoamonného. Žlutá barva média značí okyselení půdy, červená naopak její alkalizaci.

Violet Red Bile Agar:

Agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi a laktózou (VČŽL), jehož původní barva je fialovočervená, se používá pro stanovení koliformních bakterií, které tvoří růžové kolonie. Většina kmenů koliformních bakterií vytváří v půdě precipitát, který se objevuje pod koloniemi v podobě skvrn růžové barvy nebo úzké zóny kolem kolonií. Laktózapozitivní bakterie, využívají laktózu na kyselinu mléčnou nebo jinou kyselinu, která okyselí prostředí, čímž dojde ke zrůžovění či zčervenání půdy. Naopak kmeny bakterií se světlými koloniemi se označují laktózanegativní tedy nezkrvašují laktózu a nejsou to tedy koliformní bakterie.

Violet Red Bile Glukose Agar

Agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi a glukózou (VČŽG) se používá ke stanovení všech enterobakterií. Laktózapozitivní enterobakterie kvasí glukózu

na kyselinu nebo plyn a tvoří purpurové až růžové kolonie, o průměru 1- 2 mm se zónou precipitace [6, 34].

➤ Metodika :

Bylo naváženo předepsané množství dehydratované komerčně dodávané kultivační půdy a suspendováno v předepsaném množství destilované vody. Disperze se povařila do úplného rozpuštění a sterilizovala v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min. Přidal se suplement, pokud byl předepsaný na obalu kultivační půdy. Připravená půda byla nalita na Petriho misky a ponechána ztuhnout. Některé půdy se nesterilizovaly (předepsáno výrobcem). Příprava půd je zobrazena v Tab. 17. Na půdy byly naočkovány křížovým roztěrem dané mikroorganismy a kultivovaly se v termostatu 24-48 hodin při 30 °C (druhy *Bacillus*) a při 37 °C (patogenní mikroorganismy jako *Salmonella* sp., *Escherichia coli*)

Tab. 17. Příprava vybraných půd:

Kultivační medium	Předepsané množství média (g)	Předepsané množství destilované vody (ml)	Autoklávovat	Suplement	Barva média
Tryptone Yeast Extract Agar (TYE)	41,5	1000,0	ano	žádný	fialová
Mannitol Yolk Polymyxin B (MYP)	46,0	900,0	ano	polymyxin B + žloutková emulze	růžová
Endo Agar (EA)	41,5	1000,0	ano	žádný	růžovo-červená
Brilliant Green Agar	29,0	500,0	ano	žádný	oranžová
Xylose Lysine Deoxycholate Agar	55,68	1000,0	ne	žádný	červeno-oranžová
Violet Red Bile Agar	38,0	1000,0	ne	žádný	fialovo-červená
Violet Red Bile Glukose Agar	41,5	1000,0	ano	žádný	růžovo-fialová

[6]

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Běžně se z potravin stanovují celkové počty mikroorganismů na neselektivních nutričně bohatých médiích jako je např. živná půda MPA. Na této půdě se dají rozlišit mikroorganismy jako je např. *Bacillus cereus*, který roste v matných, rozlitých koloniích s charakteristickým pachem. Druh *Staphylococcus aureus* produkuje žlutý pigment. *Micrococcus luteus* také tvoří žlutý pigment jako *Staphylococcus aureus*, ale kolonie jsou drobnější a barva výraznější. *Micrococcus roseus* tvoří pigment růžové barvy. Na MPA mohou růst i kvasinky a plísňe. *Enterobacteriaceae* se na neselektivních půdách nedají rozlišit, proto se ke kultivaci vybraných mikroorganismů významných v potravinářství používali selektivní půdy, na kterých rostou vybrané mikroorganismy specifickým růstem. Výsledky a diskuze, jsou popsány zvlášť pro každý mikroorganismus na dané kultivační půdě.

4.1.1 Tryptone Yeast Extract Agar (TYE)

Tryptone Yeast Extrakt Agar se použil pro kultivaci mikroorganismů *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus sphaericus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella* sp., *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* a *Citrobacter* sp..

➤ *Bacillus cereus*

Kolonie mikroorganismu *Bacillus cereus* na kultivačním médiu Tryptone Yeast Extrakt Agar (Obr. 3) jsou kruhovitého tvaru, matné, mírně rozlité, mléčné barvy s vlnitým okrajem. Okolo kolonií je žlutá zóna, dochází tedy k okyselení média.



Obr. 3. *Bacillus cereus* - TYE

➤ *Bacillus subtilis*

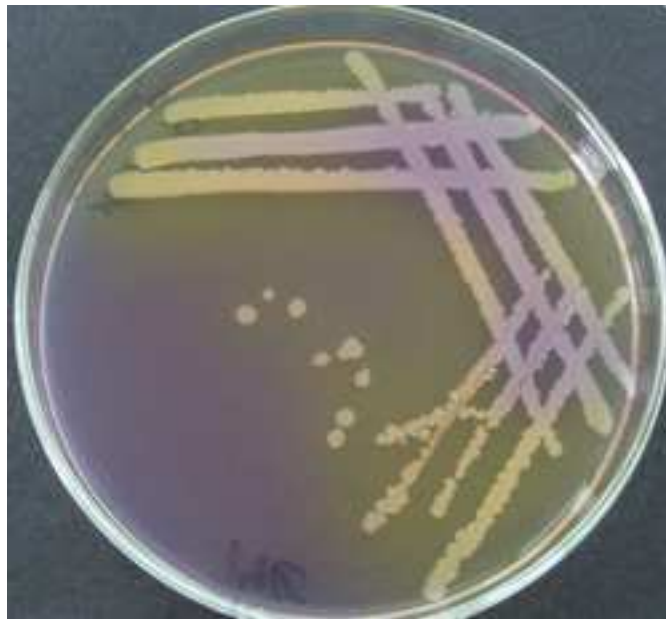
Kolonie druhu *Bacillus subtilis* jsou velmi rozlité, světle fialové s vlnitým okrajem. Barva média je světle fialová tedy nedochází ke změně barvy média. Růst je zobrazen na Obr. 4.



Obr. 4. *Bacillus subtilis* – TYE

➤ *Bacillus brevis*

Bacillus brevis roste na půdě TYE podobně jako *Bacillus cereus*. Kolonie jsou malé mírně rozlité s zvlněnými okraji. Barva kolonie je světle žlutá až mléčná. Na Petriho misce (Obr. 5) jde vidět změna barvy média v důsledku okyselení. Původně fialové médium se mění ve žluté.



Obr. 5. *Bacillus brevis* – TYE

➤ *Bacillus sphaericus*

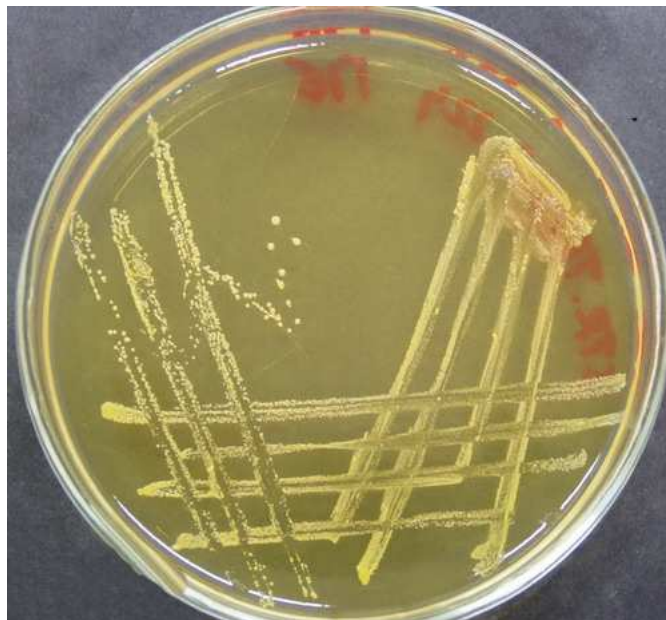
Kolonie druhu *Bacillus sphaericus* jsou velké, rozlité a se zvlněným okrajem. Některé kolonie jsou slité dohromady. Barva je světle fialová až mléčná s bílým středem (Obr. 6). Barva média se nemění. Svým růstem se podobá růstu druhu *Bacillus subtilis*.



Obr. 6. *Bacillus sphaericus* – TYE

➤ *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus tvoří na půdě TYE drobné, žluté, okrouhlé kolonie. Původně světle fialová půda se mění na žlutou, protože dochází k okyselení média. Růst je zobrazen na Obr. 7.



Obr. 7. *Streptococcus thermophilus* – TYE

➤ *Lactococcus lactis*

Růst druhu *Lactococcus lactis* je podobný jako u druhu *Streptococcus thermophilus*. Kolonie jsou velmi drobné okrouhlého tvaru, světle žluté barvy (Obr.8). Kultivační médium mění v blízkosti růstu kolonií barvu ze světle fialové na žlutou. Rovněž literatura uvádí, že druh *Lactococcus lactis* tvoří kolonie v barvě bílé až nažloutlé [32].



Obr. 8. *Lactococcus lactis* – TYE

➤ *Proteus vulgaris*

Tento druh tvoří drobné, okrouhlé kolonie světle žluté až mléčné barvy. Barva média se v blízkosti kolonií barví z fialové na žlutou, dochází tedy ke zkvašování sacharidů a tvorbě kyseliny (Obr. 9).



Obr. 9. *Proteus vulgaris* – TYE

➤ ***Klebsiella* sp.**

Kolonie jsou lesklé , vypouklé, mléčné až průsvitné barvy. Tvar kolonií je okrouhlý se zvlněnými okraji. Růst je zobrazen na Obr. 10.



Obr. 10. *Klebsiella* sp. – TYE

➤ *Salmonella typhi*

Růst salmonely na TYE (Obr. 11) se podobá růstu druhu *Proteus vulgaris*. Barva kolonií je světle žlutá. Kolonie mají tvar okrouhlý se zvlněnými okraji. Barva média je změněna v oblasti růstu kolonií na světle žlutou.



Obr. 11. *Salmonella typhi* – TYE

➤ *Citrobacter* sp.

Tento mikroorganismus roste na půdě TYE podobně jako *Salmonella typhi*. Kolonie jsou okrouhlé, světle žluté až mléčné barvy se zvlněným okrajem. Médium se barví okolo kolonií žlutě. Růst se zobrazuje na Obr. 12.



Obr. 12. *Citrobacter* – TYE

➤ *Escherichia coli*

Kolonie *Escherichia coli* na půdě TYE jsou světle žluté, průhledné, okrouhlého tvaru se zvlněnými okraji. Půda se v okolí kolonií barví žlutě (Obr. 13).



Obr. 13. *Escherichia coli* – TYE

Proteus vulgaris, *Salmonella typhi*, *Citrobacter* a *Escherichia coli* rostou na této půdě velmi podobně. K rozlišení by se použily selektivní půdy.

4.2 Mannitol Yolk Polymyxin B (MYP):

Mannitol Yolk Polymyxin B se použil pro kultivaci mikroorganismů *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus sphaericus*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas fluorescens*.

4.2.1 *Bacillus cereus*

Kolonie mikroorganismu *Bacillus cereus* na kultivačním médiu Mannitol Yolk Polymyxin B roste v podobě růžových kolonií se zónou precipitace. Kolonie jsou nepravidelného tvaru, matné, rozlité s vlnitým okrajem (Obr. 14).

Literatura popisuje růst *Bacillus cereus* roste v růžových koloniích, obklopených zónou precipitace. Precipitace je způsobena produkcí lecitinázy (fosfolipázy), která sráží žloutkovou emulzi. Některé kolonie *B. cereus* vytvářejí jen málo lecitinázy nebo žádnou. Kolonie takových kmenů nejsou obklopeny zónou precipitace [32, 35, 37]. Nedochozí ke změně barvy média, protože nedochází ke zkvašování mannitolu [6, 38].

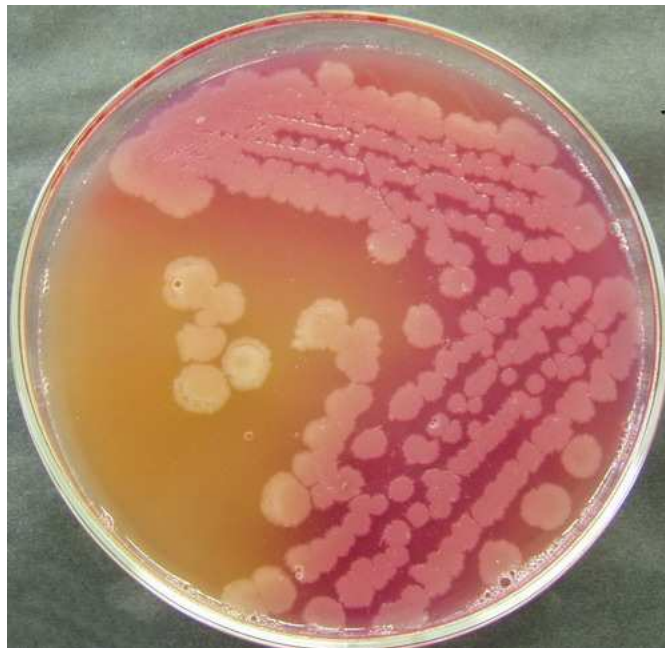


Obr. 14. *Bacillus cereus* – MYP

4.2.2 *Bacillus sphaericus*

Kolonie *Bacillus sphaericus* (Obr. 15) rostou na půdě MYP v barvě světle růžové až světle žluté. Kolonie jsou okrouhlé se zvlněným okrajem. Médium se v okolí kolonií barví žlutě.

Autoři knih uvádí, že změna původní barvy média v žlutou barvu je způsobená zkvašováním mannitolu [37].



Obr. 15. *Bacillus sphaericus* – MYP

4.2.3 *Bacillus brevis*

Tento mikroorganismus roste na půdě MYP v podobě světle růžových, neprůhledných kolonií s precipitační zónou. Kolonie jsou okrouhlého tvaru se zvlněným okrajem. Barva média se nemění, nedochází tedy ke zkvašování mannitolu (Obr. 16)



Obr. 16. *Bacillus brevis* – MYP

4.2.4 *Bacillus subtilis*

Růst tohoto mikroorganismu na půdě MYP je světle růžový až mléčný. Kolonie jsou neprůhledné, vláknité a o průměru až 10 mm. Barva média je změněna v okolí kolonií na světle oranžovou až žlutou (Obr. 17). Ve srovnání s literaturou jsou růsty kolonií tohoto druhu stejné. Kolonie *Bacillus subtilis* jsou schopny mannitol zkvašovat a při jejich růstu se barva MYP média mění na žlutou [37].



Obr. 17. *Bacillus subtilis* – MYP

4.2.5 *Staphylococcus aureus*

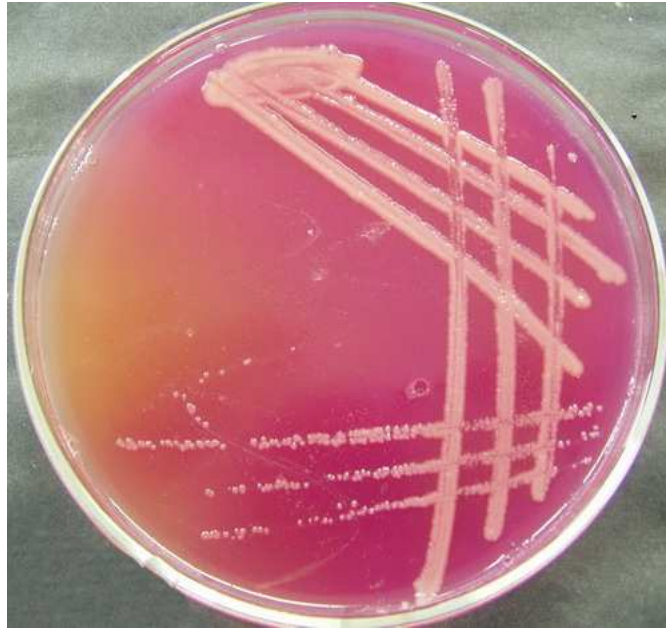
Staphylococcus aureus roste na půdě MYP ve světle žlutých až mléčných koloniích okrouhlého tvaru se změnou barvy média na žlutou v blízkosti těchto kolonií. Růst je zobrazen na Obr. 18. Literatura uvádí růst kolonií tohoto mikroorganismu v barvě citronově žluté, které zkvašují mannitol za tvorby kyseliny [37].



Obr. 18. *Staphylococcus aureus* – MYP

4.2.6 *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens tvoří drobné, lesklé, světle růžové kolonie okrouhlého tvaru. Růst je zobrazen na Obr. 19.



Obr. 19. *Pseudomonas fluorescens* – MYP

4.3 Endo Agar (EA):

Endova půda se použila pro růst mikroorganismů *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp., *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Yersinia enterocolitica*.

4.3.1 *Escherichia coli*

Laktózapozitivní *Escherichia coli* je bakterie, která roste na Endově půdě v tmavě červených koloniích s kovovým leskem, stejně je zbarvena i půda v okolí kolonií. Kolonie jsou drobné, vypouklé, okrouhlého tvaru Obr. 20. Růst se shoduje s literaturou, kde je uvedeno, že *E.coli* zde tvoří kolonie karmínově červené až růžové kolonie s kovovým leskem [4, 37, 38].



Obr. 20. *Escherichia coli* – ENDO

4.3.2 *Citrobacter* sp.

Citrobakter roste na Endově půdě v světle růžových koloniích okrouhlého tvaru se světlým zvlňným okrajem. Barva média se nemění (Obr. 21).



Obr. 21. *Citrobacter* sp. – ENDO

4.3.3 *Salmonella typhi*

Salmonella typhi roste na Endově půdě podobně jako *Citrobacter* sp. Barva kolonií je světle růžová. Kolonie jsou lesklé, hladké, okrouhlého tvaru s rovným okrajem a barva půdy se nemění (Obr. 22). Literatura uvádí stejné výsledky a to průsvitné kolonie stejně zbarvené jako půda tj. velmi světle růžové [8, 39].



Obr. 22. *Salmonella typhi* – ENDO

4.3.4 *Klebsiella* sp.

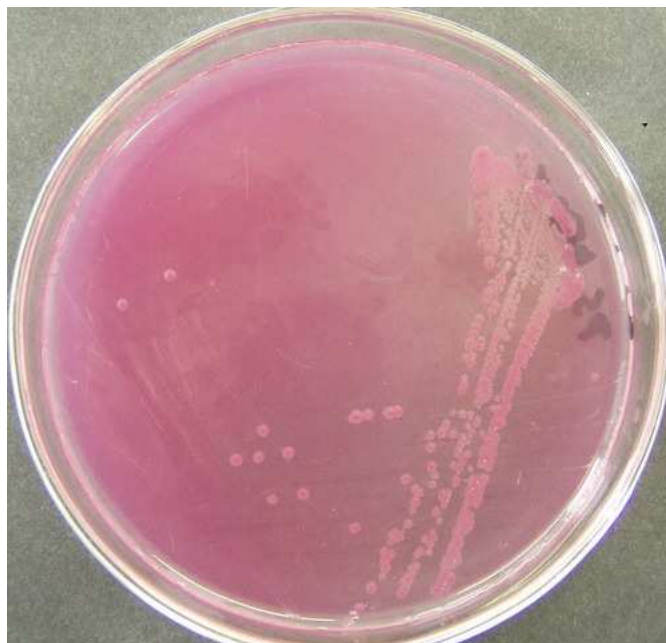
Tento mikroorganismus roste na půdě ENDO v růžových koloniích, které jsou okrouhlé se zvlněným okrajem. Barva média se nemění (Obr. 23). Dodavatelé této půdy uvádí stejný růst [8].



Obr. 23. *Klebsiella* sp. – ENDO

4.3.5 *Pseudomonas aeruginosa*

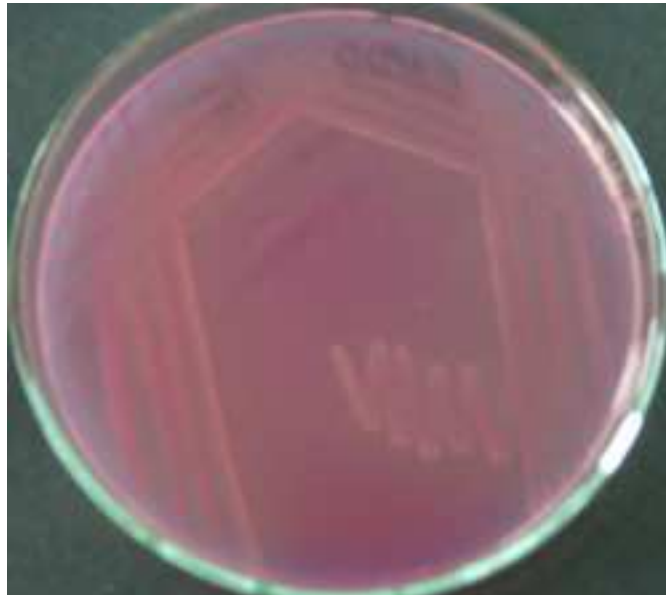
Kolonie *Pseudomonas aeruginosa* jsou okrouhlého tvaru, vypouklé, světle růžové se průhlednými okraji, což se shoduje s literaturou [8, 40]. Půda zůstává nezměněna (Obr. 24).



Obr. 24. *Pseudomonas aeruginosa*. – ENDO

4.3.6 *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica narůstá ve velmi světle růžových koloniích, některé jsou průhledné (Obr. 25).



Obr. 25. *Yersinia enterocolitica*. – ENDO

4.4 Brilliant Green Agar (BGA)

Půda Brilliant Green Agar se použila pro kultivaci mikroorganismů *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* a *Citrobacter* sp..

4.4.1 *Klebsiella* sp.

Klebsiella sp. tvoří na půdě BGA mléčné až žluté kolonie okrouhlého tvaru se zvlněným okrajem a se žlutou zónou precipitace (Obr. 26).



Obr. 26. *Klebsiella* sp. – BGA

4.4.2 *Escherichia coli*

Bakterie *Escherichia coli* tvoří na půdě BGA světle žluté kolonie okrouhlého tvaru se zvlněným okrajem a žlutou zónou precipitace (Obr.27). Literatura uvádí růst *Escherichia coli* jako ploché nebo hlenovité kolonie o průměru 2 mm, jasně žluté barvy, obklopené žlutou čirou zónou [37, 40].



Obr. 27. *Escherichia coli*. – BGA

4.4.3 *Salmonella typhi*

Salmonella typhi tvoří na půdě BGA světle růžové až průhledné kolonie. Médium se barví do tmavě růžova (Obr. 28). Autoři uvádějí růst salmonely jako průsvitné nebo růžové kolonie, v jejichž okolí se zbarví půdy do růžova až červena [6, 8, 37, 40].



Obr. 28. *Salmonella typhi* – BGA

4.4.4 *Citrobacter* sp.

Citrobakter roste ve světle růžových koloniích, které jsou drobné, hladké se zvlněným okrajem. Půda svou barvu nemění (Obr. 29).



Obr. 29. *Citrobacter* sp. – BGA

4.5 Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD)

Xylose Lysine Deoxycholate Agar se použil pro kultivaci mikroorganismů *Klebsilla* sp., *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* a *Citrobacter* sp..

4.5.1 *Klebsiella* sp.

Tento mikroorganismus roste na půdě XLD ve světle žlutých až mléčných, neprůhledných koloniích okrouhlého tvaru se žlutou zónou precipitace. Žlutá zóna značí okyselení média (Obr. 30). Srovnáním s literaturou je růst stejný. Obdobně roste i *Escherichia coli* [6, 8, 37].



Obr. 30. *Klebsiella* sp. – XLD

4.5.2 *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica na půdě XLD roste v bílých velmi drobných koloniích. Tvar je okrouhlý s rovným okrajem. Médium se mění v blízkosti kolonií na žlutou, dochází tedy k okyselení média (Obr. 31).



Obr. 31. *Yersinia enterocolitica* – XLD

4.5.3 *Escherichia coli*

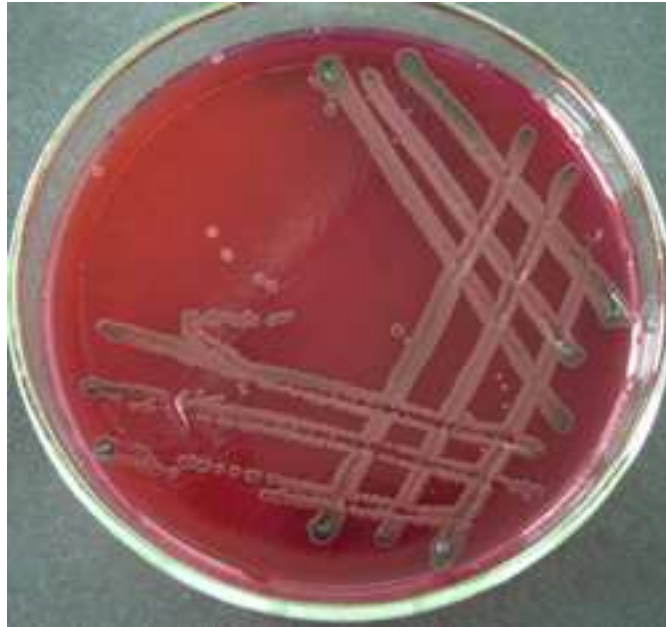
Růst *Escherichia coli* na tomto médiu je ve světle žlutých až mléčných koloniích, okrouhlého tvaru s rovným okrajem. Kolonie jsou vypouklé a hladké. Barva média se mění na žlutou (Obr. 32). Literatura uvádí růst *Escherichia coli* ve žlutých koloniích [6, 8].



Obr. 32. *Escherichia coli* – XLD

4.5.4 *Salmonella typhi*

Salmonella typhi tvoří průsvitné nebo světle růžové kolonie s černým středem. Kolonie jsou okrouhlé, lesklé se zvlněným okrajem. Půda má červenou barvu (Obr. 33). Autoři uvádějí růst v červených koloniích s černým středem nebo růst v černých koloniích. Tvorba sirovodíku indikuje citran železitoamonný, který se sirovodíkem redukuje na sulfid železnatý, který vytváří černý precipitát ve středu kolonií. Purpurové zbarvení půdy je způsobeno dekarboxylací lyzinu a tím dojde k alkalizaci půdy [31].



Obr. 33. *Salmonella typhi* – XLD

4.5.5 *Citrobacter* sp.

Citrobakter roste v černých koloniích se změnou barvy média do oranžova. Tvar kolonií je okrouhlý, kolonie jsou lesklé se zvlněným okrajem. Svým růstem se podobá růstu *Salmonella typhi* (Obr. 34). V literatuře je uvedeno, že roste s v podobě žlutých neprůhledných kolonií, někdy s černým středem, se žlutou zónou precipitace [37].



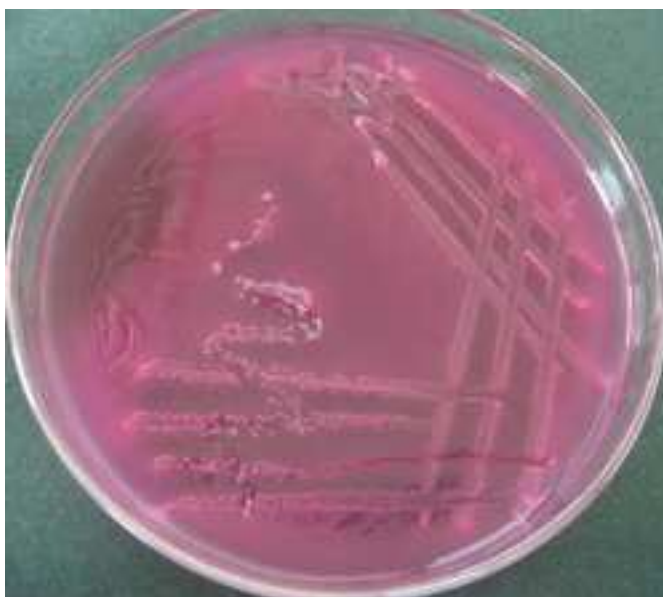
Obr. 34. *Citrobacter* sp.. – XLD

4.6 Violet Red Bile Agar (VRBA)

Violet Red Bile Agar se použil pro kultivaci mikroorganismů *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter* sp., *Proteus vulgaris*

4.6.1 *Escherichia coli*

Kolonie *Escherichia coli* na půdě VRBA rostou světle růžově, jsou velmi drobné, okrouhlé, lesklé se světlým precipitátem okolo kolonií (Obr.35). V literatuře je uvedeno, že tvoří kolonie o průměru barvy růžové, světle růžové nebo růžovo-fialové. Kolonie mají často světlejší nebo bezbarvý okraj, tvoří precipitát, který se objevuje pod koloniemi v podobě skvrn růžové barvy nebo úzké zóny kolem kolonií [37].



Obr. 35. *Escherichia coli* – VRBA

4.6.2 *Salmonella typhi*

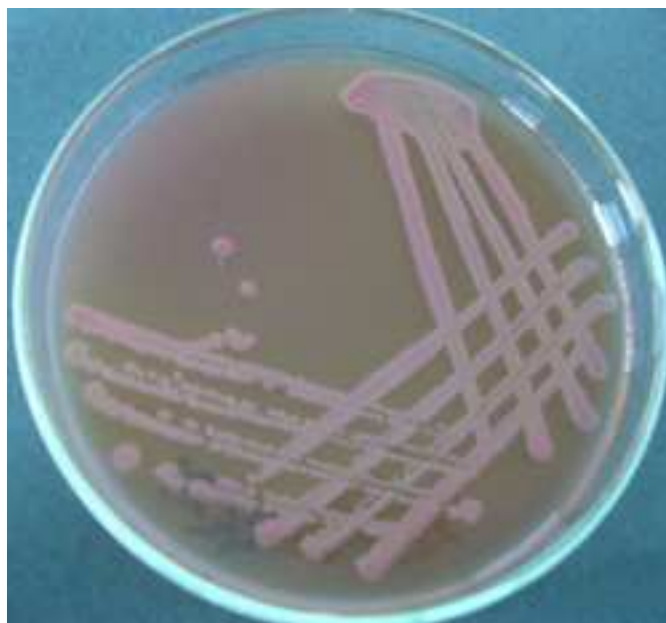
Salmonella typhi je lakózanegativní, proto tvoří na půdě VRBA světle růžové až průsvitné kolonie okrouhlého tvaru ses zvlněným okrajem (Obr. 37). Ve srovnání s literaturou je růst stejný, kolonie jsou průsvitné, bezbarvé, někdy s černým středem [40].



Obr. 36. *Salmonella typhi* – VRBA

4.6.3 *Citrobacter* sp.

Růst kolonií tohoto druhu je světle růžový, kolonie jsou okrouhlé, okraj je světlejší než střed. Půda se v okolí kolonií barví jemně růžově (Obr. 37). Autoři uvádějí růst citrobakteru světle až jasně růžové, často se světlým nebo bezbarvým okrajem [40].



Obr. 37. *Citrobacter* sp. – VRBA

4.6.4 *Proteus vulgaris*

Proteus vulgaris roste na půdě VRBA jako drobné, světle růžové kolonie okrouhlého tvaru s růžovou precipitační zónou (Obr. 38).



Obr. 38. *Proteus vulgaris*– VRBA

4.7 Violet Red Bile Glukose Agar (VRBGA)

Půda Violet Red Bile Glukose Agar se použila pro kultivaci mikroorganismů *Proteus vulgaris*, *Citrobacter* sp., *Salmonella typhi*, *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*.

4.7.1 *Proteus vulgaris*

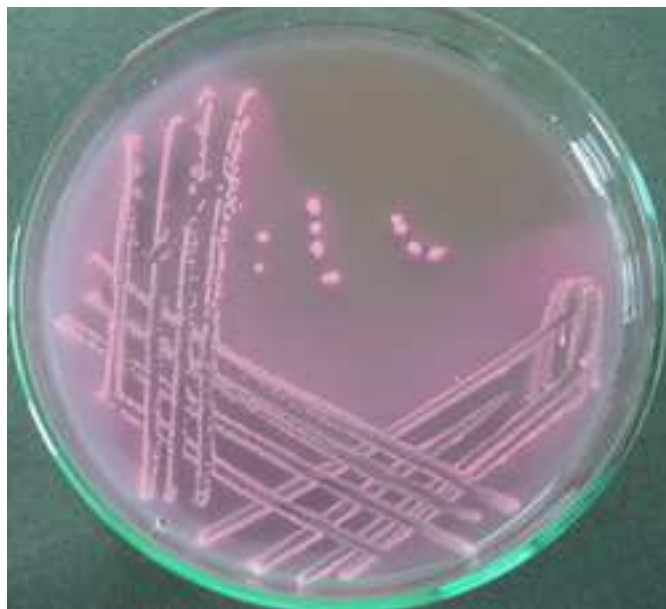
Kolonie druhu *Proteus Vulgaris* rostou na půdě VRBGA světle růžově. Jsou okrouhlého tvaru s rovným okrajem a s růžovou precipitační zónou (Obr. 39). V literatuře je uvedeno, že jsou kolonie růžové až červené nebo fialové se zónou nebo bez zóny precipitace [31].



Obr. 39. *Proteus vulgaris* – VRBGA

4.7.2 *Citrobacter* sp.

Kolonie této bakterie jsou světle růžové, neprůhledné, s růžovou zónou precipitace okolo kolonií (Obr. 40).



Obr. 40. *Citrobacter* sp. – VRBGA

4.7.3 *Salmonella typhi*

Salmonella typhi roste na tomto médiu ve světle růžových koloniích okrouhlého tvaru se zvlněnými okraji. Půda se v blízkosti růstu kolonií barví do růžova (Obr. 41).



Obr. 41. *Salmonella sp.* – VRBGA

4.7.4 *Klebsiella sp.*

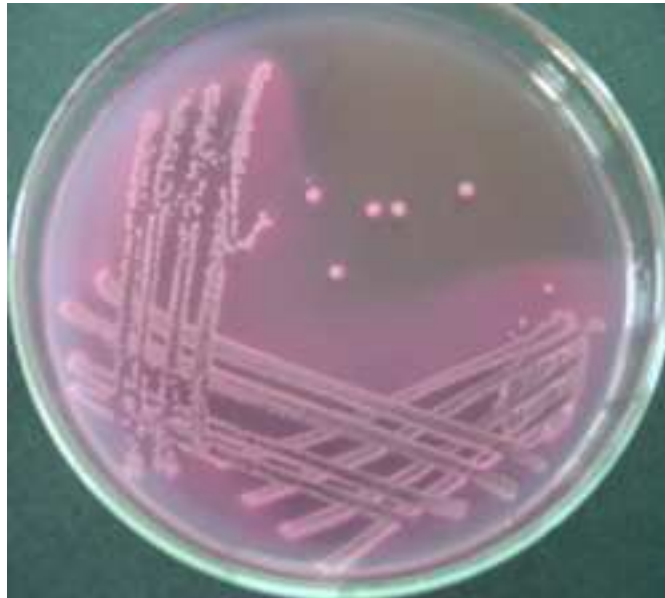
Tato bakterie roste v růžových, neprůhledných koloniích okrouhlého tvaru. *Klebsiella sp.* má větší kolonie než citrobakter, ale barva kolonií je stejná (Obr. 42).



Obr. 42. *Klebsiella sp.* – VRBGA

4.7.5 *Escherichia coli*

Růst *Escherichia coli* na této půdě je světle růžový, kolonie jsou neprůhledné a okolo nich se tvoří precipitační zóna. Kolonie jsou okrouhlé s rovným okrajem, kolonie salmonely jsou stejné barvy, ale se zvlněným okrajem (Obr. 43).



Obr. 43. *Escherichia coli* – VRBGA

5 CENOVÁ KALKULACE JEDNOTLIVÝCH LABORATORNÍCH CVIČENÍ

Ceny jsou uvedeny z ceníku ČADERSKÝ-ENVITEK spol. s.r.o. pro kultivační média a selektivní suplementy HIMEDIA s platností od 1.9.2006, z ceníku výrobků 2007 společnosti BIO-RAD spol. s.r.o. s platností od 1.4.2007 a z ceníku IPL s platností od 1.8.2008 [41, 42, 43]. Ceny jsou uvedeny s DPH. Všechny výpočty jsou zaokrouhlovány nahoru.

5.1 Příprava živných médií (1. cvičení)

V tomto laboratorním cvičení dochází k přípravě živných médií, pro následné použití těchto pūd v dalším cvičení. Připravují se pūd: Mannitol Salt Agar (MSA), Mannitol Yolk Polymyxin B (MYP), Pseudomonas Agar (PA), Violet Red Bile Agar (VRBA), Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD). Počítá se, že na jednu Petriho misku o průměru 90 mm se nalije 20 ml připravené pūd. Každý mikroorganismus se očkuje 2 krát na každou pūd a cvičení se provádí na 4 lavicích.

5.1.1 Inokulace vybraných druhů mikroorganismů (vzorový výpočet)

➤ Výpočty a příprava Mannitol Salt Agar (MSA):

Odebere se 111,0 g dehydratované komerčně dodávané kultivační pūd do 1000,0 ml destilované vody, dobře se rozmíchá a sterilizuje se v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min poté přidat 5 % žloutkové emulze. Promíchaná pūda se nalije na připravené Petriho misky.

Potřeba agarových ploten pro příslušné laboratorní cvičení je (v tomto případě 8) a nalívá-li se na Petriho misku o průměru 90 mm 20,0 ml znamená to, že je potřeba 160,0 ml tekuté živné pūd. Z množství prášku, které se suspenduje v příslušném množství rozpouštědla (destilované vody) a ceny za balení se vypočítá spotřeba materiálu a jeho finanční nákladnost na příslušné laboratorní cvičení

Vzorový výpočet množství pūd:

111,0 g.....1000,0 ml

x g.....160,0 ml

x = 17,8 g Mannitol Salt Agar

Cena půdy Mannitol Salt Agar je za 500,0 g 554,8 Kč s DPH. K laboratornímu cvičení je potřeba 17,8 g půdy MSA, která vyjde na 19,8 Kč.

Vzorový výpočet množství žloutkové emulze :

Přidává se 50,0 ml žloutkové emulze na 950,0 ml sterilizovaného média.

50,0 ml950,0 ml

x ml.....160,0ml

x = 8,5 ml žloutkové emulze

Cena žloutkové emulze je 989,3 Kč za 200,0 ml. Potřebných 8,5 ml žloutkové emulze tedy vyjde na 42,1 Kč.

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 18.

Tab. 18. Zhodnocení přípravy Mannitol Salt Agar (MSA):

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
MSA	111,0 g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/554,8 Kč	17,8 g	19,8 Kč
Žloutková emulze	50,0 ml	950,0 ml média	200,0 ml /989,3Kč	8,5 ml	42,1 Kč
Celkem					61,9 Kč

Kalkulace půdy Mannitol Salt Agar pro jedno cvičení, tedy pro čtyři lavice vyjde přibližně na 61,8 Kč.

➤ Výpočty a příprava Mannitol Yolk Polymyxin B (MYP):

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 19.

Tab. 19. Zhodnocení přípravy Mannitol Yolk Polymyxin B (MYP):

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení (Kč)	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
MYP	46,0 g	900,0 ml H ₂ O	500,0 g/1107,1 Kč	8,2g	18,2 Kč
Žloutková emulze	50,0 ml	450,0 ml média	200,0 ml/989,3 Kč	17,8 ml	88,1 Kč
Polymyxin B	1 ampule (2ml)	450,0 ml média	5 ampulí/547,7 Kč	0,7 ml	38,5 Kč
Celkem					144,8 Kč

➤ Výpočty a příprava Pseudomonas Agar (PA):

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 20.

Tab. 20. Zhodnocení přípravy Pseudomonas Agar (PA):

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
PA	24,2 g	500,0 ml H ₂ O	500,0 g/1228,2 Kč	7,8 g	19,2 Kč
Glycerol (bezvodý p.a.)	5,0 g	500,0 ml média	1000,0 ml/188,0 Kč	1,6 ml	0,3 Kč

Celkem	19,5 Kč
--------	---------

➤ Výpočty a příprava Violet Red Bile Agar (VRBA):

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 21.

Tab. 21. Zhodnocení přípravy Violet Red Bile Agar (VRBA):

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
VRBA	30,0 g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/950,9 Kč	4,8 g	10,3 Kč
Celkem					10,3 Kč

➤ Výpočty a příprava Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD):

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 22.

Tab. 22. Zhodnocení přípravy Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD):

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
XLD	55,7 g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/1070,0 Kč	8,9 g	19,1 Kč
Celkem					19,1 Kč

5.2 Stanovení koliformních mikroorganismů (2.cvičení)

V tomto laboratorním cvičení dochází k přípravě živných médií ke kultivaci koliformních mikroorganismů. Připravují se půdy: Endo Agar (EA), Violet Red Bile Agar (VRBA), Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD), Brilliant green agar (BGA), Triple sugar iron agar (TSI).

5.2.1 Stanovení koliformních mikroorganismů

Na každou půdu se očkují dvě ředění a to jednou ředění 10^{-2} a jednou ředění 10^{-3} . Potřeba agarových ploten pro příslušné laboratorní cvičení je (v tomto případě 8) a nalívá-li se na Petriho misku o průměru 90 mm 20,0 ml znamená to, že je potřeba 160,0 ml tekuté živné půdy. Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 23.

Tab. 23. Cenová kalkulace stanovení koliformních mikroorganismů

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
EA	41, g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/792,6 Kč	6,7 g	10,7 Kč
VRBA	30,0 g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/950,9 Kč	4,8 g	10,3 Kč
XLD	55,7 g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/1070,0 Kč	8,9 g	19,1 Kč
BGA	29,0 g	500,0 ml H ₂ O	500,0 g/1089,6 Kč	9,3 g	20,3 Kč
TSI	6,5 g	100,0 ml H ₂ O	500,0 g/919,6 Kč	2,6 g	4,8 Kč
Celkem					65,2 Kč

5.3 Mikrobiologické vyšetření mléčných výrobků (3. cvičení)

V tomto laboratorním cvičení se vyšetřují mléčné výrobky. Půdy, které se připravují jsou uvedeny u každého úkolu.

5.3.1 Stanovení účinku pasterační teploty na mikrobiální obraz mléka

V tomto laboratorním cvičení se zjišťuje účinnost pasterace na základě obsahu přežívajících mikroorganismů v pasterovaném mléce k jejich obsahu před pasterací. Potřeba médií pro příslušné laboratorní cvičení je v tomto případě 400 ml MPA a 400 ml TYE. Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 24.

Tab. 24. Cenová kalkulace stanovení účinku pasterační teploty na mikrobiální obraz mléka

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
masopeptonový extrakt	3,0 g	1000 ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	1,2 g	2,4 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	4,1 g	8,3 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	6,0 g	12,2 Kč
NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	1,2 g	0,1 Kč
TYE	41,5	1000 ml destil. H ₂ O	500,0 g/1152,4 Kč	16,6 g	38,3 Kč
Celkem					61,3 Kč

5.3.2 Mikrobiologické vyšetření sušeného mléka

Pro tento úkol se očkují pro každou lavici 2 misky půdy Slanetz-Bartley Medium. Připravuje se tedy 8 misek tj. 160 ml média.

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 25.

Tab. 25. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření sušeného mléka

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
SB	46,5	1000 ml destil. H ₂ O	500,0 g/1070,0 Kč	7,5 g	16,1 Kč
Celkem					16,1 Kč

5.3.3 Mikrobiologické vyšetření sýrů

Pro tento úkol se očkují pro každou lavici 2 misky živné půda MPA, Tryptone

Yeast Extract, Violet Red Bile Agar a Yeast Glukose Chloramphenicol. Připravuje se tedy 160 ml daných médií.

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 26.

Tab. 26. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření sýrů

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
masopeptonový extrakt	3,0 g	1000 ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	0,5 g	1,0 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	0,8 g	1,7 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	2,4 g	4,9 Kč
NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	0,5 g	0,1 Kč
TYE	41,5 g	1000 ml destil. H ₂ O	500,0 g/1152,4 Kč	6,7 g	15,5 Kč
IGC	41,1 g	1000 ml destil. H ₂ O	500,0 g/1416,0 Kč	6,6 g	16,0 Kč
VRBA	38,0 g	1000 ml destil. H ₂ O	500,0 g/950,9 Kč	6,1 g	11,6 Kč
Celkem					50,8 Kč

5.4 Mikrobiologický rozbor kysaných mléčných výrobků (4. cvičení)

V tomto laboratorním cvičení se stanovuje růst mikroorganismů v kysaných mléčných výrobcích.

5.4.1 Stanovení koliformních bakterií, kvasinek a plísní v kysaných výrobcích

Připravují se půdy VRBA a YGC. Připraví se od každé půdy 2 misky. Celkem tedy od každé půdy 160 ml.

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 27.

Tab. 27. *Cenová kalkulace stanovení koliformních bakterií, kvasinek a plísní v kysaných výrobcích*

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
VRBA	38,0 g	1000 ml destil. H ₂ O	500,0 g/950,9 Kč	6,1 g	11,6 Kč
YGC	41,1 g	1000 ml destil. H ₂ O	500,0 g/1416,0 Kč	6,6 g	16,0 Kč
Celkem					27,6 Kč

5.4.2 Hodnocení kvality kysaných výrobků

Připraví se dvě Petriho misky MRS agarů na jednu lavici. Je tedy potřeba 160 ml na čtyři lavice.

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 28.

Tab. 28. Cenová kalkulace hodnocení kvality kysaných výrobků

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
MRS	65,3 g	1000 ml destil. H ₂ O	500,0 g/1149,2 Kč	10,5 g	24,2 Kč
Celkem					24,2 Kč

5.5 Mikrobiologický rozbor masa a masných výrobků (5. cvičení)

V tomto laboratorním cvičení se vyšetřuje čerstvé a zkažené maso a masné výrobky.

5.5.1 Mikrobiologické vyšetření povrchu čerstvého a zkaženého masa

Požívají se půdy MPA, ENDO, MSA a CZD. Každá půda se připravuje dvakrát do lavičky.

Je tedy potřeba připravit 160 ml daného kultivačního média.

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 29.

Tab. 29. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření povrchu čerstvého a zkaženého masa

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
masopeptonový extrakt	3,0 g	1000 ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	0,5 g	1,0 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	0,8 g	1,7 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	2,4 g	4,9 Kč
NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	0,5 g	0,1 Kč
EA	41, 5g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/792,6 Kč	6,7 g	10,7 Kč
MSA	111,0 g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/554,8 Kč	17,8 g	19,8 Kč
Žloutková emulze	50,0 ml	950,0 ml média	200,0 ml/989,30 Kč	8,5 ml	42,1 Kč
CZD	49,0	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/792,6 Kč	7,9 g	12,6 Kč
Celkem					92,9 Kč

5.5.2 Mikrobiologické vyšetření hloubky čerstvého a zkaženého masa

Pro toto laboratorní cvičení je potřeba 320 ml MPA, 320 ml EA a 640 ml MSA. Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 30.

Tab. 30. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření hloubky čerstvého a zkaženého masa

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
masopeptonový extrakt	3,0 g	1000 ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	1,0 g	2,0 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	1,6 g	3,3 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	4,8 g	9,8 Kč
NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	1,0 g	0,1 Kč
EA	41,5 g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/792,6 Kč	13,3 g	21,1 Kč
MSA	111,0 g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/554,8 Kč	71,1 g	78,9 Kč
Žloutková emulze	50,0 ml	950,0 ml média	200,0 ml/989,30 Kč	33,7 ml	166,7 Kč
Celkem					281,9 Kč

5.5.3 Mikrobiologické vyšetření masných výrobků

Pro toto laboratorní cvičení je potřeba 160 ml MPA, EA a MPA s mlékem. Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 31.

Tab. 31. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření masných výrobků

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
masopeptonový extrakt	3,0 g	1000 ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	0,5 g	1,0 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	0,8 g	1,7 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	2,4 g	4,9 Kč
NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	0,5 g	0,1 Kč
EA	41,5 g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/792,6 Kč	6,7 g	10,7 Kč
masopeptonový extrakt	3,0 g	1000 ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	0,5 g	1,0 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	0,8 g	1,7 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	2,4 g	4,9 Kč
NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	0,5 g	0,1 Kč
Odtučněné mléko	3 ml mléka	15 ml média	1000ml/15 Kč	32 ml	0,5 Kč
Celkem					26,6 Kč

5.6 Mikrobiologický rozbor drůbeže a ryb (6. cvičení)

5.6.1 Mikrobiologické vyšetření povrchu drůbeže stěrem

Pro laboratorní cvičení je potřeba 160 ml MPA, ENDO, PA, MSA. Výpočty jsou v Tab. 32.

Tab. 32. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření povrchu drůbeže stěrem

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
masopeptonový extrakt	3,0 g	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	0,5	1,0 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	0,8	1,7 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	2,4	4,9 Kč
NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	0,5	0,1 Kč
EA	41,5 g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/792,6 Kč	6,7 g	10,7 Kč
PA	24,2 g	500,0 ml H ₂ O	500,0 g/1228,2 Kč	7,8 g	19,2 Kč
MSA	111,0 g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/554,8 Kč	17,8 g	19,8 Kč
Žloutková emulze	50,0 ml	950,0 ml média	200,0 ml/989,30 Kč	8,5 ml	42,1 Kč

Celkem	99,5 Kč
--------	---------

5.6.2 Mikrobiologické vyšetření povrchu drůbeže oplachem

Pro toto laboratorní cvičení je potřeba 240 ml MPA, 160 ml EA, 160 ml PA a 160 ml MSA.

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 33.

Tab. 33. *Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření povrchu drůbeže oplachem*

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
EA	41,5 g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/792,6 Kč	6,7 g	10,7 Kč
masopeptonový extrakt	3,0 g	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	0,8 g	1,6 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	1,2 g	2,5 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	3,6 g	7,4 Kč
NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	0,8 g	0,1 Kč
PA	24,2 g	500,0 ml H ₂ O	500,0 g/1228,2 Kč	7,8 g	19,2 Kč
Glycerol (bezvodý p.a.)	5,0 g	500,0 ml média	1000,0 ml/188,0 Kč	1,6 ml	0,3 Kč

MSA	111,0 g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/554,8 Kč	17,8 g	19,8 Kč
Žloutková emulze	50,0 ml	950,0 ml média	200,0 ml/989,30 Kč	8,5 ml	42,1 Kč
Celkem					103,7 Kč

5.6.3 Mikrobiologické vyšetření masa z hloubky drůbeže/ryby

Pro toto laboratorní cvičení je potřeba 240 ml MPA, 160 ml VRBA, 160 ml PA

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 34.

Tab. 34. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření masa z hloubky drůbeže/ryb

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/ suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
masopepton ový extrakt	3,0 g	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	0,8 g	1,6 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	1,2 g	2,5 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	3,6 g	7,4 Kč
NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	0,8 g	0,1 Kč
VRBA	38,0 g	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/950,9 Kč	6,1 g	11,6 Kč

PA	24,2 g	500,0 ml H ₂ O	500,0 g/1228,2 Kč	7,8 g	19,2 Kč
Glycerol (bezvodý p.a.)	5,0 g	500,0 ml média	1000,0 ml/188,0 Kč	1,6 ml	0,3 Kč
Celkem					42,7 Kč

5.7 Mikrobiologický rozbor cukrářských výrobků, lahůdek a vajec (7. cvičení)

Tohle laboratorní cvičení je zaměřeno na rozbor cukrářských výrobků, lahůdek a vajec.

5.7.1 Mikrobiologické vyšetření cukrářských výrobků a lahůdek

Pro toto laboratorní cvičení je potřeba 160 ml MPA, 160 ml VRBA, 160 ml MSA a 160 ml CZD.

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 35.

Tab. 35. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření cukrářských výrobků a lahůdek

Kultivační médiu /suplement	Předepsané množství média/ suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
masopepton ový extrakt	3,0 g	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	0,5 g	1,0 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	0,8 g	1,7 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	2,4 g	4,9 Kč

NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	0,5 g	0,1 Kč
VRBA	38,0 g	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/950,9 Kč	6,1 g	11,6 Kč
PA	24,2 g	500,0 ml H ₂ O	500,0 g/1228,2 Kč	7,8 g	19,2 Kč
Glycerol (bezvodý p.a.)	5,0 g	500,0 ml média	1000,0 ml/188,0 Kč	1,6 ml	0,3 Kč
MSA	111,0 g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/554,8 Kč	17,8 g	19,8 Kč
Žloutková emulze	50,0 ml	950,0 ml média	200,0 ml/989,30 Kč	8,5 ml	42,1 Kč
CZD	49,0	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/792,6 Kč	7,9 g	12,6 Kč
Celkem					113,3 Kč

5.7.2 Průnik mikroorganismů vejcem

Pro toto laboratorní cvičení je potřeba 160 ml RVS a 160 ml BGA a 320 ml MSA.

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 36.

Tab. 36. Cenová kalkulace průniku mikroorganismů vejcem

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
------------------------------	--------------------------------------	---	----------------	--	----------------------------------

RVS	26,8 g	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/596,2 Kč	4,3 g	5,2 Kč
BGA	29,0 g	500	500,0 g/1089,6 Kč	9,3 g	20,3 Kč
MSA	111,0 g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/554,8 Kč	35,5 g	39,4 Kč
Žloutková emulze	50,0 ml	950,0 ml média	200,0 ml/989,30 Kč	16,9 ml	83,6 Kč
Celkem					148,5 Kč

5.7.3 Stanovení celkových počtů mikroorganismů a *Staphylococcus aureus* ve vejci

Pro toto laboratorní cvičení je potřeba 160 ml MPA a 160 ml MSA.

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 37.

Tab. 37. Cenová kalkulace stanovení celkových počtů mikroorganismů a *Staphylococcus aureus* ve vejci

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/ suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
masopepton ový extrakt	3,0 g	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	0,5 g	1,0 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	0,8 g	1,7 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	2,4 g	4,9 Kč

NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	0,5 g	0,1 Kč
MSA	111,0 g	1000,0 ml H ₂ O	500,0 g/554,8 Kč	17,8 g	19,8 Kč
Žloutková emulze	50,0 ml	950,0 ml média	200,0 ml/989,30 Kč	8,5 ml	42,1 Kč
Celkem					69,6 Kč

5.8 Mikrobiologický rozbor ovoce, zeleniny a konzerv (8. cvičení)

Tohle laboratorní cvičení je zaměřeno na rozbor ovoce, zeleniny a konzerv.

5.8.1 Mikrobiologické vyšetření medu nebo džemu

Pro toto laboratorní cvičení je potřeba 160 ml MPA a 160 ml YGC a 160 ml Anaerobic agaru.

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 38.

Tab. 38. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření medu nebo džemu

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
masopeptonový extrakt	3,0 g	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	0,5 g	1,0 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	0,8 g	1,7 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	2,4 g	4,9 Kč

NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	0,5 g	0,1 Kč
YGC	41,1	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1416,0 Kč	6,6	16,0
Anaerobic agar	58,0 ml	1000ml destil. H ₂ O	500,0 ml/1129,1 Kč	9,3 ml	21,0
Celkem					44,7 Kč

5.8.2 Mikrobiologické vyšetření rajčatového protlaku nebo kečupu

Pro toto laboratorní cvičení je potřeba 160 ml MPA a 160 ml YGC a 160 ml Anaerobic agaru.

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 39.

Tab. 39. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření rajčatového protlaku nebo kečupu

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/ suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
masopepton ový extrakt	3,0 g	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	0,5 g	1,0 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	0,8 g	1,7 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	2,4 g	4,9 Kč
NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	0,5 g	0,1 Kč

YGC	41,1	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1416,0 Kč	6,6 g	16,0 Kč
Anaerobic agar	58,0 ml	1000ml destil. H ₂ O	500,0 ml/1129,1 Kč	9,3 ml	21,0
Celkem					44,7 Kč

5.8.3 Mikrobiologické vyšetření konzerv

Pro toto laboratorní cvičení je potřeba 160 ml MPA a 160 ml Anaerobic agaru.

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 40.

Tab. 40. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření konzerv

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/ suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
masopepton ový extrakt	3,0 g	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	0,5 g	1,0 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	0,8 g	1,7 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	2,4 g	4,9 Kč
NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	0,5 g	0,1 Kč
Anaerobic agar	58,0 ml	1000ml destil. H ₂ O	500,0 ml /1129,1 Kč	9,3 ml	21,0

Celkem	28,7 Kč
--------	---------

5.9 Mikrobiologický rozbor obilovin, pečiva a koření (9. cvičení)

Tohle laboratorní cvičení je zaměřeno na rozbor obilovin, pečiva a koření.

5.9.1 Mikrobiologické vyšetření mouky, pečiva a těstovin

Pro toto laboratorní cvičení je potřeba 160 ml MPA a 160 ml IGC.

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 41.

Tab. 41. *Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření mouky, pečiva a těstovin*

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
masopeptonový extrakt	3,0 g	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	0,5 g	1,0 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	0,8 g	1,7 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	2,4 g	4,9 Kč
NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	0,5 g	0,1 Kč
YGC	41,1	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1416,0 Kč	6,6	16,0
Celkem					23,7 Kč

5.9.2 Mikrobiologický rozbor koření

Pro toto laboratorní cvičení je potřeba 160 ml MPA a 160 ml IGC a 160 ml VRBA

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 42.

Tab. 42. Cenová kalkulace mikrobiologického rozboru koření

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
masopeptonový extrakt	3,0 g	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	0,5 g	1,0 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	0,8 g	1,7 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	2,4 g	4,9 Kč
NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	0,5 g	0,1 Kč
YGC	41,1	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1416,0 Kč	6,6	16,0
VRBA	38,0	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/950,9 Kč	6,1	11,6
Celkem					35,3 Kč

5.10 Mikrobiologický rozbor nápojů (10. cvičení)

Tohle laboratorní cvičení je zaměřeno na rozbor obilovin, pečiva a koření.

5.10.1 Mikrobiologické vyšetření nápojů

Pro toto laboratorní cvičení je potřeba 160 ml MPA a 160 ml IGC

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 43.

Tab. 43. *Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření nápojů*

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
masopeptonový extrakt	3,0 g	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	0,5 g	1,0 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	0,8 g	1,7 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	2,4 g	4,9 Kč
NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	0,5 g	0,1 Kč
YGC	41,1	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1416,0 Kč	6,6	16,0
Celkem					23,7 Kč

5.10.2 Mikrobiologické vyšetření nápojů metodou membránové filtrace

Pro toto laboratorní cvičení je potřeba 160 ml MPA a 160 ml IGC

Výpočty jsou zhodnoceny v Tab. 44.

Tab. 44. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření nápojů metodou membránové filtrace

Kultivační médium /suplement	Předepsané množství média/suplementu	Předepsané množství destil. H ₂ O nebo steril. média	Cena za balení	Množství média v dehydrovaném stavu/ množství suplementu	Cena za laboratorní cvičení (Kč)
masopeptonový extrakt	3,0 g	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1000,6 Kč	0,5 g	1,0 Kč
pepton	5,0 g		500,0 g/1012,8 Kč	0,8 g	1,7 Kč
agar	15,0 g		500,0 g/1019,3 Kč	2,4 g	4,9 Kč
NaCl	3,0 g		1000,0 g/80,0 Kč	0,5 g	0,1 Kč
YGC	41,1	1000ml destil. H ₂ O	500,0 g/1416,0 Kč	6,6	16,0
Celkem					23,7 Kč

5.11 Celkové zhodnocení cenové kalkulace laboratorních cvičení

Cenová kalkulace byla provedena pro deset laboratorních cvičení, ceny jednotlivých úloh jsou znázorněny v tabulkách v druhém okruhu praktické části. Pokud nebudeme počítat běžné provozní náklady a cenu za pomůcky a za spotřebu vody, ale pouze kultivační půdy, bude celková cena za všechna laboratorní cvičení pro jeden semestr 1704 Kč s DPH.

ZÁVĚR

Diplomová práce je zaměřena na stanovení potravinářsky významných mikroorganismů na vybraných kultivačních půdách. Teoretická část je věnována potravinářsky významným mikroorganismům a podmínkám jejich růstu, morfologii, fyziologickým vlastnostem, výskytu, významu a médiím, které lze použít k jejich kultivaci.

Praktická část diplomové práce se zabývá kultivací vybraných mikroorganismů významných v potravinářství. Je zde popsán růst daných mikroorganismů na vybraných kultivačních médiích a zobrazeno jejich fotografické znázornění. Kultivace byla provedena na selektivních kultivačních médiích. Výsledky růstu jsou srovnány s literaturou. Poslední část je zaměřena na cenovou kalkulaci jednoho semestru laboratorních cvičení z potravinářské mikrobiologie.

Po zpracování poznatků je možno formulovat závěry této diplomové práce takto:

1. Mikroorganismy vyskytující se v potravinách mohou způsobovat kažení potravin nebo případné alimentární onemocnění.
2. Růst kultivovaných mikroorganismů se shodoval s popisem v literárních zdrojích.
3. Zhodnocení cenové kalkulace laboratorních cvičení z Potravinářské mikrobiologie za jeden semestr vyjde přibližně na 1704Kč s DPH.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2.vyd. Praha: Victoria publishing, 1995. 361 s. ISBN: 8085605716
- [2] JAY, J.M. *Modern Food Mikrobiology*. 6th Edition. Springer – Verlag, 2000. 767 s. ISBN: 978-0-8342-1671-6
- [3] GÖRNER F., VALÍK L'. *Aplikovaná mikrobiológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004 . 528 s. ISBN: 8096706497
- [4] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1.vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN: 80-210-4207-9
- [5] OKAMOTO-KAINUMA, A., EHATA, Y., IKEDA, M., OSONO, T., ISHIAWA, M., KAGA, T., KOIZUMI, Y. Hydrogen peroxide resistance of *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 and its relationship to acetic acid fermentation. *Bioscience, biotechnologie, & biochemie*. 72. 2008, s. 2526- 2534
- [6] <http://www.oxoid.com>
- [7] BLACKBURN, C. de W. *Food spoilage microorganisms*. England: Woodhead publishing, 2006. 712 s. ISBN: 1855739666
- [8] <http://www.himedia.com>
- [9] ROBINSON, R.K. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Vol. 1-3. Elsevier, 2000. 2405 s. ISBN 978-0-12-227070-3
- [10] GARRITY, G.M., BRENNER, D.J., KRIEG, N.R., STALEY, J.R. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Springer – Verlag, 2005.
- [11] WALD, P.H., STAVE, G.M.: *Physical and Biological Hazards of the Workplace* (2nd Edition), John Wiley & Sons, 2002. ISBN: 0387241450
- [12] BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie*. 1.vyd. Praha: Marvil, 1996
- [13] MOTARJEMI, Y., ADAMS, M. *Emerging Foodborne Pathogens*. Woodhead Publishing, 2006. 634 s. ISBN: 0849334292

- [14] ICMSF. *Microorganisms in Foods 6*, 2nd edition. New York: Springer, 2005. 763 s. ISBN: ISBN 030648675X
- [15] BLACKBURN, C.W., McCLURE, P.J. *Foodborne Pathogens - Hazards, Risk Analysis and Kontrol*. Woodhead Publishing, 2002. 521 s. ISBN: 1855734540
- [16] LEHR, L., KEELEY, J., LEHR, J. *Water Encyclopedia: Water Quality And Resource Development*. Vol. 1-5. John Wiley & Sons, 2005. 717 s. ISBN: 0471736864
- [17] VACEK, V. *Alimentární infekce*, 1.vyd. Praha: Galén, 2002. 163 s. ISBN: 80-7262-166-1
- [18] MEAD, G.C. *Poultry Meat Processing and Quality*. Woodhead Publishing, 2004. 388 s. ISBN: 1855737272
- [19] SHUMWAY, S.E, ROCK, G.E. *Shellfish Safety and Duality*. Woodhead Publishing, 2009. 634 s. ISBN: 978-1-4200-7792-6
- [20] ADESIYUN, A., OFFIAH, N., SEEPERSADSINGH, N., RODRIGO, S., LASHLEY, V., MUSAI, L. Frequency and antimicrobial resistance of enteric bacteria with spoilage potential isolated from table eggs. *Food Research International*. vol. 39. 2006, s. 212-219
- [21] MASSA, S., GARDINI, F., SINIGALIA, M., GUERZONI, M.E. *Klebsiella pneumoniae* as a Spoilage Organism in Mozzarella Cheese. *Journal of Dairy Science*. vol. 75, 1992
- [22] KRAFT, A.A. *Psychrotrophic bacteria in foods: disease and spoilage*. CRC Press, 1992, 274 s. ISBN: 0849348722
- [23] SUTHERLAND, J.P., VARNAM, A.H., EVANS, M.G. *A colour atlas of food quality kontrol*. CRC Press, 1986. 272 s. ISBN: 0723408157
- [24] FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H, COGAN, T.M., GUINEE, T.P. *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology* (3rd Edition). Elsevier, 2004. 446 s. ISBN: 978-0-12-263651-6
- [25] DONGYOU, L. *Handbook of Listeria Monocytogenes*. CRC Press, 2008. 540 s. ISBN: 1420051407
- [26] <http://www.aloa-listeria.com/>

- [27] SAARELA, M. *Functional Dairy Products*. vol. 2. Woodhead Publishing, 2007. 577 s. ISBN: 978-1-84569-153-0
- [28] FLOMENBAUM, N.E., GOLDFRANK, L.R., HOFFMAN, R.S., HOWLAND, M.A., LEWIN, N.A., NELSON, L.S. *Goldfrank's Toxicologic Emergencies* (8th Edition). McGraw-Hill, 2006. 2373 s. ISBN: 978-0-07-143763-9
- [29] HUI, I.H. *Dairy Science and Technology Handbook*. vol. 1-3. John Wiley & Sons, 1993. 1304 s. ISBN: 978-1-56081-078-0
- [30] FLICKINGER, M.C., DREW, S.W. *Encyclopedia of Bioprocess Technology - Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. vol. 1-5. John Wiley & Sons, 1999. 2896 s. ISBN: 978-0-471-13822-8
- [31] BURDYCHOVÁ, R., SLÁDKOVÁ, P. *Mikrobiologická analýza potravin*, 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. 218 s. ISBN: 978-80-7375-116-6
- [32] VESELÁ, M., DRDÁK, M. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. Brno: VUT, 1999. ISBN: 8021413050
- [33] DEMNEROVÁ, K., PAZLAROVÁ, J., RUMML, T., MACKOVÁ, M., SAVICKÁ, D., ŠILHÁNKOVÁ, L. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*, 3. vyd. Praha: VŠCHT, 2001. 179 s. ISBN: 80-7080-415-7
- [34] VOTAVA, M. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. Hortus, 1999. 404 s. ISBN: 80-238-5058-X
- [35] ATLAS, R.M, SNYDER, W.J. *Handbook of media for clinical microbiology*. CRC Press, 2006. 524 s. ISBN: 084933795X
- [36] <http://www.srlchem.com/>
- [37] LUKÁŠOVÁ, J., NAVRÁTILOVÁ, P., KARPÍŠKOVÁ, R., VYHNÁLKOVÁ J., OSTRÝ, V. *Mikrobiologie potravin, praktická cvičení*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 1997. 55 s. ISBN: 8085114747
- [38] ATLAS, R.M. *Handbook of Microbiological Media for the Examination of Food*. CRC Press, 1995. 310 s. ISBN: 0849327040

- [39] DAVIES, A., BOARD, R. *Microbiology of Meat and Poultry*. Springer – Verlag, 1998. 346 s. ISBN: 0751403989
- [40] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologické zkoumání potravin*. Praha: VŠCHT, 1987. 104 s.
- [41] LUKEŠ, P. *Laboratorní potřeby a zařízení*. katalog 2008, Uherský Brod: IPL
- [42] ČADERNSKÝ-ENVITEK. *Ceník, dehydratované kultivační půdy, selektivní suplementy, agary a želatina, bílkovinné hydrolyzáty a extrakty, chemikálie, diagnostické disky, barvicí roztoky a soupravy, kapalné reagenty*, Brno, 2006. 40 s.
- [43] BIORAD. *Ceník výrobků 2007*, Praha, 36 s.

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Křížový roztěr</i>	43
<i>Obr. 2. Tvary kolonií</i>	44
<i>Obr. 3. Bacillus cereus - TYE</i>	52
<i>Obr. 4. Bacillus subtilis – TYE</i>	52
<i>Obr. 5. Bacillus brevis – TYE</i>	53
<i>Obr. 6. Bacillus sphaericus – TYE</i>	54
<i>Obr. 7. Streptococcus thermophilus – TYE</i>	54
<i>Obr. 8. Lactococcus lactis – TYE</i>	55
<i>Obr. 9. Proteus vulgaris – TYE</i>	56
<i>Obr. 10. Klebsiella sp. – TYE</i>	56
<i>Obr. 11. Salmonella typhi – TYE</i>	57
<i>Obr. 12. Citrobacter – TYE</i>	58
<i>Obr. 13. Escherichia coli – TYE</i>	58
<i>Obr. 14. Bacillus cereus – MYP</i>	59
<i>Obr. 15. Bacillus sphaericus – MYP</i>	60
<i>Obr. 16. Bacillus brevis – MYP</i>	61
<i>Obr. 17. Bacillus subtilis – MYP</i>	61
<i>Obr. 18. Staphylococcus aureus – MYP</i>	62
<i>Obr. 19. Pseudomonas fluorescens – MYP</i>	63
<i>Obr. 20. Escherichia coli – ENDO</i>	64
<i>Obr. 21. Citrobacter sp. – ENDO</i>	64
<i>Obr. 22. Salmonella typhi – ENDO</i>	65
<i>Obr. 23. Klebsiella sp. – ENDO</i>	66
<i>Obr. 24. Pseudomonas aeruginosa. – ENDO</i>	66
<i>Obr. 25. Yersinia enterocolitica. – ENDO</i>	67
<i>Obr. 26. Klebsiella sp. – BGA</i>	68
<i>Obr. 27. Escherichia coli. – BGA</i>	68
<i>Obr. 28. Salmonella typhi – BGA</i>	69
<i>Obr. 29. Citrobacter sp. – BGA</i>	70
<i>Obr. 30. Klebsiella sp. – XLD</i>	71
<i>Obr. 31. Yersinia enterocolitica – XLD</i>	71

<i>Obr. 32. Escherichia coli – XLD</i>	72
<i>Obr. 33. Salmonella typhi – XLD</i>	73
<i>Obr. 34. Citrobacter sp.. – XLD</i>	73
<i>Obr. 35. Escherichia coli – VRBA</i>	74
<i>Obr. 36. Salmonella typhi – VRBA</i>	75
<i>Obr. 37. Citrobacter sp. – VRBA</i>	75
<i>Obr. 38. Proteus vulgaris– VRBA</i>	76
<i>Obr. 39. Proteus vulgaris – VRBGA</i>	77
<i>Obr. 40. Citrobacter sp. – VRBGA</i>	77
<i>Obr. 41. Salmonella sp. – VRBGA</i>	78
<i>Obr. 42. Klebsiella sp. – VRBGA</i>	78
<i>Obr. 43. Escherichia coli – VRBGA</i>	79

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Půdy používané ke kultivaci rodu <i>Pseudomonas</i> :	14
Tab. 2. Půdy používané ke kultivaci rodu <i>Campylobacter</i> :	16
Tab. 3. Půdy používané ke kultivaci druhu <i>Escherichia coli</i> :	18
Tab. 4. Půdy používané ke kultivaci rodu <i>Salmonella</i> :	20
Tab. 5. Půdy používané ke kultivaci druhu <i>Shigella sonnei</i> :	21
Tab. 6. Půdy používané ke kultivaci druhu <i>Yersinia enterocolitica</i> :	22
Tab. 7. Půdy používané ke kultivaci rodu <i>Proteus</i> :	23
Tab. 8. Půdy používané ke kultivaci rodu <i>Enterobacter</i> :	24
Tab. 9. Půdy používané ke kultivaci rodu <i>Listeria</i> :	27
Tab. 10. Půdy používané ke kultivaci rodu <i>Lactobacillus</i> :	30
Tab. 11. Půdy používané ke kultivaci rodu <i>Streptococcus</i> :	32
Tab. 12. Půdy používané ke kultivaci rodu <i>Enterococcus</i> :	33
Tab. 13. Půdy používané ke kultivaci rodu <i>Staphylococcus</i> :	35
Tab. 14. Půdy používané ke kultivaci rodu <i>Bacillus</i> :	37
Tab. 15. Půdy používané ke kultivaci rodu <i>Clostridium</i> :	38
Tab. 16. Půdy používané ke kultivaci rodu <i>Corynebacterium</i> :	40
Tab. 17. Příprava vybraných půd:	50
Tab. 18. Zhodnocení přípravy Mannitol Salt Agar (MSA):	81
Tab. 19. Zhodnocení přípravy Mannitol Yolk Polymyxin B (MYP):	82
Tab. 20. Zhodnocení přípravy <i>Pseudomonas</i> Agar (PA):	82
Tab. 21. Zhodnocení přípravy Violet Red Bile Agar (VRBA):	83
Tab. 22. Zhodnocení přípravy Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD):	83
Tab. 23. Cenová kalkulace stanovení koliformních mikroorganismů:	84
Tab. 24. Cenová kalkulace stanovení účinku pasterační teploty na mikrobiální obraz mléka	85
Tab. 25. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření sušeného mléka	86
Tab. 26. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření sýrů:	87
Tab. 27. Cenová kalkulace stanovení koliformních bakterií, kvasinek a plísní v kysaných výrobcích:	88
Tab. 28. Cenová kalkulace hodnocení kvality kysaných výrobků	89

Tab. 29. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření povrchu čerstvého a zkaženého masa	90
Tab. 30. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření hloubky čerstvého a zkaženého masa	91
Tab. 31. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření masných výrobků.....	92
Tab. 32. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření povrchu drůbeže stěrem	93
Tab. 33. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření povrchu drůbeže oplachem	94
Tab. 34. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření masa z hloubky drůbeže/ryb.....	95
Tab. 35. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření cukrářských výrobků a lahůdek	96
Tab. 36. Cenová kalkulace průniku mikroorganismů vejcem.....	97
Tab. 37. Cenová kalkulace stanovení celkových počtů mikroorganismů a <i>Staphylococcus aureus</i> ve vejci	98
Tab. 38. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření medu nebo džemu.....	99
Tab. 39. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření rajčatového protlaku nebo kečupu.....	100
Tab. 40. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření konzerv	101
Tab. 41. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření mouky, pečiva a těstovin	102
Tab. 42. Cenová kalkulace mikrobiologického rozboru koření	103
Tab. 43. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření nápojů	104
Tab. 44. Cenová kalkulace mikrobiologického vyšetření nápojů metodou membránové filtrace	105