

Stanovení bakteriostatického účinku bioprotektorů na růst *Listeria monocytogenes*

Bc. Petra Jančíková, DiS.

Diplomová práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra Jančíková, DiS.**
Osobní číslo: **T11716**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Stanovení bakteriostatického účinku bioprotektorů na růst *Listeria monocytogenes***

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Diagnostika *Listeria monocytogenes* v potravinách
2. Technologie výroby kyselých zrajících sýrů
3. Mechanismy antimikrobiálního účinku používaných bioprotektivních faktorů v potravinářství

II. Praktická část

1. Metodika stanovení účinnosti bioprotektivních přípravků
2. Stanovení účinnosti předkládaných bioprotektivních přípravků na množení *Listeria monocytogenes* ve vzorcích zrajícího sýru

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. ČSN EN ISO 11290-1. Mikrobiologie potravin a krmiv. Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes*. Část 1: Metoda průkazu. Český normalizační institut, 1999
2. ČSN EN ISO 11290-2. Mikrobiologie potravin a krmiv. Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes*. Část 2: Metoda stanovení počtu. Český normalizační institut, 1999
3. FARBER, J. M., PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiological Reviews*, 1991, Vol. 55
4. LUKÁŠOVÁ, J. A KOL. Hygiena a technologie mléčných výrobků. 1. vydání, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2001
5. Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Úřední věstník Evropské unie, 2007
6. TOMPKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the Food-Processing Environment. *Journal of Food Protection*, 2002, Vol. 65
7. VIGNOLO, G., SAAVEDRA, L., SESMA, F., RAYA, R. Food Bioprotection: Lactic Acid Bacteria as Natural Preservatives. *Progress in Food Preservation*, First Edition, Oxford 2012

Vedoucí diplomové práce:

MVDr. Ivan Holko, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

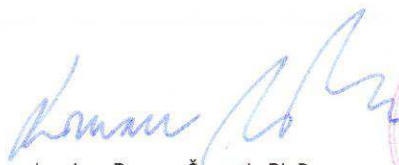
Datum zadání diplomové práce:

11. února 2013

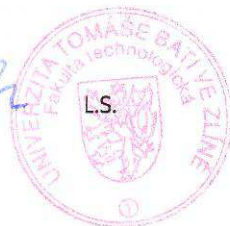
Termín odevzdání diplomové práce:

17. května 2013

Ve Zlíně dne 11. února 2013



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 30. 4. 2013

.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo zjistit účinnost předkládaných bioprotektivních přípravků na zastavení růstu a množení *Listeria monocytogenes* ve vzorcích zrajícího sýru.

Listeria monocytogenes je grampozitivní, nesporulující, mezofilní, fakultativně anaerobní, k vnějšímu prostředí poměrně odolná, ubikvitní, potraviny kontaminující bakterie. Jako patogen způsobuje u člověka alimentární onemocnění – listeriózu. U zdravých jedinců probíhá často inaparentně, ohroženy jsou spíše rizikové skupiny obyvatel, u nichž může vyvolat klinicky 3 hlavní formy listeriózy: gastrointestinální forma, systémová listerióza, a potraty a neonatální listerióza. Léčí se antibiotiky, jedinou prevencí je důkladná tepelná úprava potravin a dodržování hygienických opatření.

Jako materiál byly použity vzorky kyselého zrajícího sýru a několik bioprotektivních přípravků. Úkolem celého experimentu bylo stanovit, zda je daný bioprotektor schopen zamezit růstu záměrně naočkovaných bakterií *Listeria monocytogenes* do připravených vzorků sýru.

Klíčová slova: *Listeria monocytogenes*, listerióza, zrající sýr, bioprotektivní přípravek

ABSTRACT

The aim of diploma thesis was to find out the efficiency of submitted bioprotective preparations for discontinuance of the growth and propagation of *Listeria monocytogenes* in samples of ripening cheese.

Listeria monocytogenes is a gram-positive, non-sporebearing, mesophilic, facultative anaerobic, quite resistant in external environment, ubiquitous, food-contaminant bacterium. In population such a pathogen causes the alimentary disorder – listeriosis. In healthy persons it often proceeds as an inapparent infection, in danger are more likely risk groups of inhabitants, where it can clinically cause 3 general forms of listeriosis: gastro-intestinal form, systemic listeriosis, or abortions and neonatal listeriosis. It is medicated by antibiotics, the only one prevention is a good flameproof finish of food and keeping of an environmental hygiene.

Samples of acid curd ripening cheese and several bioprotective preparations were used as a material. The aim of whole experiment was to determine if the particular bioprotector is able to reduce a growth of bacteria *Listeria monocytogenes* purposely inoculated to prepared samples of cheese.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, listeriosis, ripening cheese, bioprotective preparation

Děkuji MVDr. Ivanu Holkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a trpělivost při zpracování mé diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat kolektivu oddělení Hygieny potravin SVÚ Olomouc, především MVDr. Jarmile Ondruškové, za vstřícnost a pomoc při praktickém zpracování zvoleného tématu.

Nemalý dík patří i mé rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

Prohlašuji, že předkládanou diplomovou práci jsem vypracovala zcela samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce, a veškeré podkladové materiály, z nichž jsem vycházela, uvádím v Seznamu použité literatury.

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

Ve Zlíně 30. 4. 2013

.....

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	13
1 LISTERIA MONOCYTOGENES	14
1.1 LISTERIÓZA	16
1.1.1 ListeriÓza v ČR.....	18
1.1.2 ListeriÓza ve svĕtĕ.....	19
1.2 LEGISLATIVA VZTAHUJÍCÍ SE K <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	21
1.3 LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> V POTRAVINÁCH.....	22
1.3.1 Odbĕr vzorků.....	22
1.3.2 Kultivační pŭdy	23
1.3.3 Kvalitativní stanovení	24
1.3.4 Kvantitativní stanovení	25
1.3.5 Konfirmační testy	26
2 KYSELÉ ZRAJÍCÍ SÝRY	31
2.1 MLÉKO JAKO SUROVINA PRO VÝROBU SÝRŮ.....	32
2.2 ČISTÉ MLÉKAŘSKÉ KULTURY	34
2.3 VÝROBA KYSELÝCH ZRAJÍCÍCH SÝRŮ	36
2.4 SENZORICKÉ POŽADAVKY NA JAKOST KYSELÝCH ZRAJÍCÍCH SÝRŮ.....	37
3 BIOPROTEKTORY	39
II PRAKTICKÁ ČÁST	44
4 MATERIÁL A METODIKA	45
4.1 MATERIÁL	45
4.2 METODIKA	47
5 VÝSLEDKY	51
5.1 BIOPROTEKTIVNÍ PŘÍPRAVEK A	51
5.2 BIOPROTEKTIVNÍ PŘÍPRAVEK B.....	52
5.3 BIOPROTEKTIVNÍ PŘÍPRAVEK C	53
5.4 BIOPROTEKTIVNÍ PŘÍPRAVEK D	54
5.5 BIOPROTEKTIVNÍ PŘÍPRAVEK E.....	55
5.6 BIOPROTEKTIVNÍ PŘÍPRAVEK F	56
5.7 BIOPROTEKTIVNÍ PŘÍPRAVEK G	57
5.8 BIOPROTEKTIVNÍ PŘÍPRAVEK H	58
6 DISKUZE	60

ZÁVĚR	62
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	70
SEZNAM OBRÁZKŮ	71
SEZNAM TABULEK.....	72

ÚVOD

Předkládaná diplomová práce se v obecném pojetí zabývá problematikou bakterií *Listeria monocytogenes* v potravinách, specializovaná je pak na experimentální vyšetřování bioprotektivních přípravků, které mají bránit jejich výskytu a pomnožování v potravinách.

Listeria monocytogenes je jediný pro člověka patogenní zástupce rodu *Listeria*. Morfologicky jde o grampozitivní, nesporulující, krátké rovné tyčinky. Jsou mezofilní, fakultativně anaerobní, velmi odolné v podmínkách okolního prostředí, citlivé k běžným dezinfekčním prostředkům. Jsou to saprofyté sliznic střevního traktu teplokrevných živočichů, včetně člověka, vyskytují se v půdě, vodě a na rostlinách. K nejčastěji kontaminovaným potravinám patří syrové maso, masné výrobky, ryby, syrové mléko, mléčné výrobky, syrová zelenina a některé lahůdkářské výrobky [6, 8, 14, 21, 25].

Listerióza je alimentární onemocnění lidí i zvířat, které se v porovnání s ostatními bakteriálními infekcemi, jako je např. salmonelóza či kampylobakterií, vyskytuje poměrně vzácně. Přesto je ročně evidováno několik desítek případů, a ohroženy jsou především následující rizikové skupiny obyvatel: děti, těhotné ženy, starší lidé a obecně osoby se sníženou imunitou. Příznaky se liší podle formy onemocnění – od inaparentního průběhu až po závažné život ohrožující zdravotní komplikace, vždy s ohledem na momentální zdravotní stav postiženého pacienta. Léčba je antibiotická [6, 21, 25, 37].

Podmínky vyšetřování *Listeria monocytogenes* v mikrobiologických laboratořích je dáno legislativou. Nejdůležitějším předpisem je Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007, které udává skupiny potravin, u nichž je povinné *Listeria monocytogenes* vyšetřovat. Obecně lze říci, že jde o všechny potraviny určené k přímé spotřebě, což jsou téměř veškeré denně lidmi užívané potraviny. Stanovení je buďto kvalitativní nebo kvantitativní, dle určených legislativních podmínek. Vlastní postup stanovení je opět určen legislativně.

Bioprotektory jsou přípravky s bakteriostatickým účinkem, které jsou přidávány v určitém množství do směsi polotovaru výrobku, a jejichž úkolem je zastavení růstu a množení bakterií *Listeria monocytogenes* během zrání sýrů. Nezabíjejí však bakterie úplně.

Experimentální část diplomové práce zahrnuje několik studií s různými typy bioprotektivních přípravků používaných při výrobě kyselých zrajících sýrů, sýry byly posléze kontaminovány kmenem *Listeria monocytogenes*, a byla zkoumána schopnost či neschopnost bioprotektorů eliminovat růst tohoto kmene.

Jako cíle diplomové práce byly stanoveny:

1. Popsat bakterie *Listeria monocytogenes* jakožto původce listeriózy.
2. Osvětlit základní principy metod stanovení *Listeria monocytogenes* v potravinách.
3. Přiblížit výrobu kyselých zrajících sýrů, které jsou použity jako pokusný materiál.
4. Popsat podstatu působení bioprotektorů.
5. Stanovit bakteriostatický účinek předložených bioprotektivních přípravků.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Taxonomické zařazení: kmen: *Firmicutes*

třída: *Bacilli*

řád: *Bacillales*

čeleď: *Listeriaceae*

rod: *Listeria*

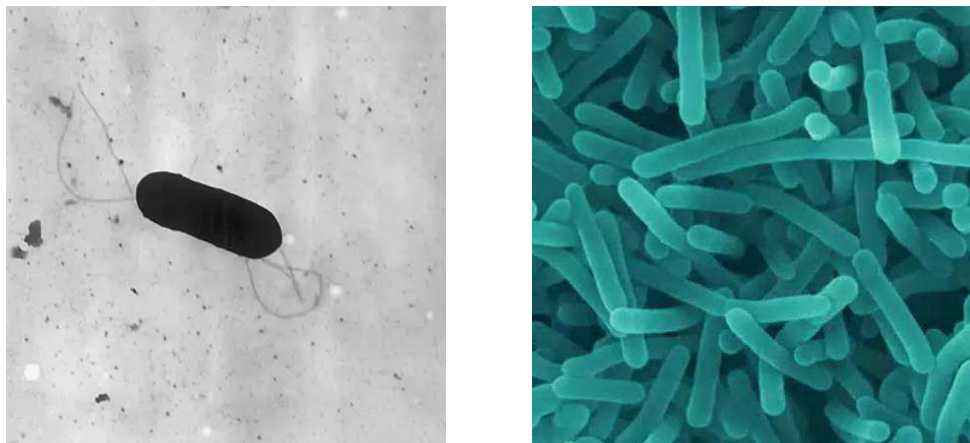
druh: *Listeria monocytogenes*

Rod *Listeria* byl poprvé popsán v roce 1927 v souvislosti s epizootiemi u dobytka. Své jméno pak dostal po britském chirurgovi Josephu Listerovi (1827 – 1912), který zavedl do chirurgie antiseptická opatření [48].

Bakterie rodu *Listeria* jsou z morfologického hlediska grampozitivní, nesporeující, krátké rovné tyčinky se zakulacenými konci, o velikosti 0,5 – 2 µm, ve starších kulturách vytvářejí vláknité formy, vyskytují se jednotlivě nebo ve dvojicích. Jsou mezofilní, tzn. že optimální teplota růstu je 30 – 37 °C, při této teplotě jsou nepohyblivé. V rozmezí teplot 20 – 25 °C tvoří peritrichální bičíky a jsou pohyblivé s charakteristickým vířivým pohybem. Jsou schopny žít při teplotách od 0 °C do 50 °C, pomalu se množit při chladírenské teplotě 4 °C, což je závažný hygienický faktor, a přežívají i mráz. Generační doba při teplotě 4 °C je 30 – 40 hodin, při teplotě 8 °C jen 10 – 13 hodin. Tolerují hodnoty pH 4,3 – 9,6 s optimem kolem pH 7. Dále jsou odolné proti vysychání, mléčnému kvašení a hnilobným procesům. *Listeria* jsou fakultativně anaerobní, kataláza pozitivní a rostou v bujónu s 10 % NaCl. Proti běžným dezinfekčním prostředkům jsou však citlivé. Spolehlivě je ničí sterilizační teploty, při pasteraci je nutné použít vyšší teploty (nad 80 °C) [6, 8, 14, 21, 25].

Listeria jsou saprofyty a epifyty sliznic střevního traktu člověka, skotu, prasat, ovcí, ptáků, ryb, korýšů, mlžů, hmyzu a hlodavců. Jsou také hojně rozšířeny ve vnějším prostředí, vyskytují se v půdě, bahně, povrchových vodách a na rostlinách, včetně zeleného krmiva [6, 8, 25]. Mohou být izolovány z různých druhů okolního prostředí včetně farem, městského prostředí, přírodního prostředí, a stejně tak z potravinářské výroby a obchodních prodejen. Výskyt v těchto prostředích může být značný, na farmách dosahuje až 20 % a v městském prostředí více než 5 % [4]. Významná je také jejich schopnost tvořit biofilmy, a proto se v provozovnách udržují poměrně dost dlouho. Charakteristické je, že se ve výrobně i přes pravidelně prováděnou sanitaci udržují měsíce až roky [23].

K nejčastěji kontaminovaným potravinám patří syrové maso a vařené masné výrobky, ryby, syrové mléko a některé druhy zrajících sýrů, syrová (mrazená) zelenina, některé lahůdkářské výrobky, zmrzliny [6, 14, 21, 25].



Obr. 1. *Listeria monocytogenes* v elektronovém mikroskopu [51].

Jediný pro člověka patogenní zástupce rodu *Listeria* – *Listeria monocytogenes* – je intracelulární patogen, za jehož schopnost proniknout do hostitelské buňky a množit se zde odpovídají faktory virulence. Za adhezi k hostitelské buňce jsou zodpovědné povrchové proteiny Ami, bakteriální adhezín a povrchový protein p104. K průniku do buňky slouží internalin A a internalin B tím, že indukují fagocytózu. Fosfolipázy C a listeriolysin O pak naruší stěnu lysozomu a umožní buňce dostat se do cytoplasmy, kde se množí, tyto zároveň působí i jako cytolytické toxiny, hemolyziny. Na svém povrchu pak vytváří protein ActA, který se váže na aktin hostitelské buňky, pomocí něhož vytvoří jakýsi "prst", výběžek obsahující živou bakterii, který se zasune do sousední buňky a *Listeria monocytogenes* do ní přestoupí, a takovýmto způsobem se šíří dále. Při oslabení imunitního systému může napadat i leukocyty, monocyty, makrofágy nebo polymorfonukleáry, a využívá je k šíření po celém organismu a do cílových orgánů. Produkuje rovněž exotoxiny a endotoxiny [51]. Sérologickými metodami se na základě odlišnosti somatických O antigenů (1 – 4) a bičíkových H antigenů (a – e) rozlišuje 13 sérotypů *Listeria monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e a "7", přičemž naprostá většina případů listeriózy (asi 89 – 96 %) je u člověka způsobena třemi sérotypy 1/2a, 1/2b a 4b [6, 21, 44, 51].

Mimo *Listeria monocytogenes* patří k významným zástupcům rodu rovněž *Listeria ivanovii* (patogenní pro zvířata – listerióza ovcí), *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* a *Listeria grayi*.

1.1 Listeri6za

Listeri6za je aliment6rn6 onemocn6n6 lid6 a zvir6at. Infekcn6 d6vka u zdrav6ch jedinc6 se pohybuje kolem 10^8 , u rizikov6ch skupin (d6ti, star66 lid6, t6hotn6 6eny, osoby se sn66zenou imunitou – onkologick6t6 pacienti, HIV pozitivn6, lid6 s onemocn6n6m ledvin, diabetici nebo pacienti po transplantac6ch) je v6razn6 ni666, asi $10^2 - 10^3$ [21, 25]. P6i nedostatecn6 6aludecn6 acidit6 v6ak infekcn6 d6vka v6znamn6 kles6 [3].

Cesta p6enosu je nej6ast6ji po6it6m kontaminovan6ch potravin 6i nedostatecn6 tepeln6 upraven6ch potravin, vz6cn6 kontaktem s nemocnou osobou 6i zvir6etem. Mo6n6y je i vertik6ln6 p6enos z matky na plod nebo na novorozence p6i porodu [6].

Inkuba6n6 doba tohoto onemocn6n6 je od n6kolika dn6 a6 po n6kolik t6dn6 (3 – 70 dn6), a to p6edev66m v 6avislosti na infekcn6 d6vce, virulenci bakteri6 a zdravotn6m stavu 6lov6ka [25]. Nej6ast6ji 6in6 20 – 35 dn6 [3].

Spektrum klinick6ch p66znak6 je velmi 6irok6. *Listeria monocytogenes* napad6 bu6ky imunitn6ho syst6mu a rozmno6uje se v nich [8]. P6i dostatecn6 funkci imunitn6ho syst6mu k onemocn6n6 bu6to v6bec nedojde, nebo prob6hne inaparentn6, eventu6ln6 v podob6 ch66ipkov6ch p66znak6 – hore6ka, bolesti kloub6 a sval6, nevolnost, zvracen6, p66jem, faryngitida, sinusitida, tonsilitida. Komplikovan666 p66pady prob6h6j6 jako meningitida, meningoencefalitida, encefalitida a sepse, v6jimkou nen6 ani 6mrt6 posti6en6 osoby. Mortalita je asi 20 – 30 %, u pacient6 nad 60 let a6 60 %. U plodu se listeri6za projevuje infekc6 placenty, plodov6ch obal6 a celkov6m generalizovan6m onemocn6n6m prov6zen6m septik6mi6, kter6 vede k potrat6m ve druh6m a t6t6m trimestru, narozen6 mrtv6ch nebo t666ce nemocn6ch novorozenc6, kter6 um6raj6 kr6tce po porodu (mortalita 30 – 50 %). Dal66 mo6n6 projevy listeri6zy jsou endokarditida, peritonitida zvl666t6 u pacient6 s cirh6zou jater, ko6n6 p66znaky jako je vyr66zka nebo puch66e, z6n6t spojivek, septick6 artritida, osteomyelitida nebo z6pal plic [6, 21].

Vlastn6 mechanismus patogeneze zahrnuje 2 f6ze – intestin6ln6 a syst6movou. Po konzumaci kontaminovan6ch potravin se *Listeria monocytogenes* dost6vaj6 do tenk6ho st6eva, kter6 kolonizuj6 a pronik6j6 skrz muk6zn6 bari6ru do krevn6ho ře6i66e a lymfatick6ho syst6mu. B6hem syst6mov6ho 6666n6 jsou bakterie pomoc6 makrof6g6 6i dendritick6ch bun6k transportov6ny do jater, sleziny, lymfatick6ch uzlin, mozku a placenty [9].

Obecně rozlišujeme následující klinické formy listeriózy [9]:

- 1) gastrointestinální forma – postihuje zejména dospělé osoby, inkubační doba 24 hodin až 10 dní; dochází k narušení absorpce nutrientů v trávicím traktu a ke zvýšení sekrece tekutin; charakteristická je horečka, bolesti hlavy, nevolnost, zvracení, abdominální bolesti a vodnatý nekrvavý průjem
- 2) systémová listerióza – onemocnění postihující zejména rizikové skupiny osob; bakterie kolonizují střevo, odtud pronikají do krve a lymfatického systému, dále do jater, sleziny, žlučníku a regionálních mízních uzlin, následně přechází hematoencefalickou bariérou do mozku, kde vyvolávají meningitidu a encefalitidu, u těhotných žen pronikají skrz placentu a infikují plod; mezi příznaky patří horečka, bolesti hlavy, malátnost, meningitida, encefalitida, bakteriémie a abscesy na játrech, může dojít až k úmrtí
- 3) potraty a neonatální listerióza – těhotné ženy jsou extrémně citlivé k *Listeria monocytogenes*, ke komplikacím dochází ve třetím trimestru těhotenství ⇒ intrauterinní infekce, průnik do plodové vody či přímo do vyvíjejícího se plodu, předčasné porody, spontánní potraty, porod mrtvého dítěte či neonatální infekce dítěte; rozeznáváme dvě formy neonatální listeriózy: 1) akutní forma projevující se infekcí plodu přímo v děloze během 1 – 2 dnů, vysoká mortalita, 2) pozdní forma s inkubační dobou asi 14 dní, při níž dochází k infekci plodu z vaginálních cest v průběhu porodu; příznaky jsou meningitida, dýchací potíže, pneumonie, zánět spojivek, vyrážka, zvracení a křeče

Přestože celosvětově jde o vzácné onemocnění (zhruba 1 – 9 případů/1 000 000 obyvatel za rok) a představuje jen asi 0,02 % všech onemocnění z potravin, je listerióza odpovědná za přibližně 28 % úmrtí vyplývajících z onemocnění z potravin. Přitom některé kmeny *Listeria monocytogenes* jsou více virulentní a pravděpodobněji odpovědné za tato onemocnění z potravin (zejména 1/2a, 1/2b, 4b) než jiné kmeny [44].

Pokud bychom chtěli hlášené případy listeriózy spojit s určitým specifickým potravinovým zdrojem, většina případů je všeobecně klasifikována jako sporadické infekce s neidentifikovaným zdrojem. Tato obtížná detekce listeriózy u lidí může být způsobena množstvím faktorů, například dlouhou inkubační dobou a vznikem provázaných případů v širokém časovém rozmezí, ojedinělým výskytem listeriózy, anebo geografickým rozptýlením jednotlivých případů [5].

Listerióza je typická svou vyšší prevalencí během letních měsíců, zřejmě kvůli zvýšené produkci *Listeria monocytogenes* a větším potížím s kontrolou hygieny prostředí [44].

K léčbě listeriózy se používají antibiotika penicilin, ampicilin, vankomycin, ciprofloxacín, lizenolidy, azithromycin, kotrimoxazol a fluorované chinolony. Betalaktamová antibiotika se používají v kombinaci s aminoglykosidy (např. gentamicinem) [21, 51]. Naopak zcela neúčinné jsou cefalosporiny [3, 21]. Léčba trvá 2 – 6 týdnů, v závislosti na formě nemoci. Proti listerióze neexistuje očkování, jedinou prevencí je důkladná tepelná úprava potravin a dodržování hygienických opatření [6, 21].

1.1.1 Listeriόza v ČR

V České republice podléhá listeriόza, stejně jako i jiná infekční onemocnění, povinnému hlášení do systému Epidat, jehož provozovatelem je Státní zdravotní ústav v Praze.

Listeriόza – oproti kamylobakteriόzám, salmonelόzám nebo shigelόzám – je poměrně málo časté onemocnění, ročně je nahlášeno jen pár desítek případů (Tab. 1). Ve skutečnosti ale může být tento počet mnohem vyšší, a to jednak proto, že u zdravých osob proběhne listeriόza inaparentně, jednak z důvodu, že do Epidatu bývá z nejrůznějších důvodů nahlášena jen část případů.

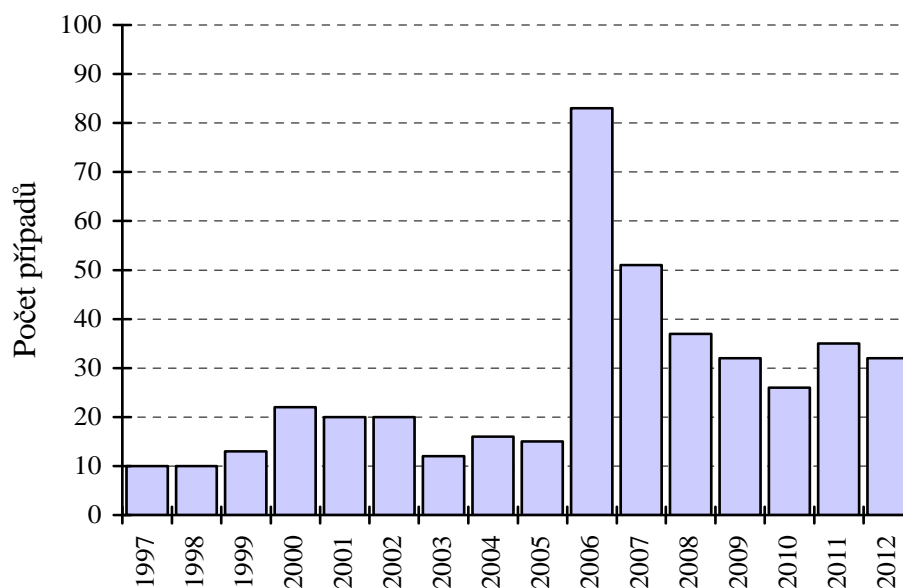
Tab. 1. Srovnání počtu případů listeriόzy a jiných bakteriálních střevních onemocnění v letech 2006 – 2012 [37].

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Kamylobakteriόza	22 713	24 254	20 175	20 371	21 164	18 811	18 387
Listeriόza	83	51	37	32	26	35	32
Jiná střevní onemocnění	2 471	2 831	3 305	3 178	3 343	4 607	5 169
Salmonelόza	25 102	18 204	11 009	10 805	8 622	8 752	10 482
Shigelόza	289	349	229	178	450	164	266

Odborná i laická veřejnost si zřejmě pamatuje jakýsi „boom“ listeriόzy z období konce roku 2006 a začátku roku 2007, kdy se na popud několika pozitivních nálezů v potravinách začala *Listeria monocytogenes* masivně vyšetřovat. To lze také vidět v Tab. 2 a Obr. 2, v těchto letech byl počet případů listeriόzy vůbec nejvyšší.

Tab. 2. Počet hlášených případů listeriόzy v letech 1997 – 2012 [37].

Rok	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Počet případů	10	10	13	22	20	20	12	16
Rok	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Počet případů	15	83	51	37	32	26	35	32



Obr. 2. Počet hlášených případů listeriózy v letech 1997 – 2012.

V České republice je dlouhodobě evidována nízká nemocnost listeriózou. V roce 2006 se nemocnost postupně zvyšovala a maxima dosáhla v listopadu a prosinci, kdy bylo nahlášeno celkem 41 případů. Celkem bylo v roce 2006 nahlášeno v České republice 83 případů onemocnění, s tím, že všechna onemocnění byla laboratorně potvrzena. Laboratorně byly všechny izoláty zařazeny k sérotypu 1/2a. V následujícím prvním čtvrtletí 2007 bylo hlášeno dalších 23 onemocnění. Z celkového počtu případů došlo ve 13 případech k úmrtí, z toho u 11 seniorů a 2 novorozenců, v 11 případech byla hlášena novorozenecká listerióza a ve dvou případech došlo v důsledku infekce gravidních žen k abortu. V anamnéze velké části nemocných byla zjištěna konzumace některých druhů zrajících sýrů a lahůdkových salátů [48]. Od té doby má listerióza v České republice opět poměrně nízkou incidenci.

1.1.2 Listeriíza ve světě

Od listopadu 1999 do března 2000 hlásilo Národní referenční centrum v Pasteurově institutu v Paříži 26 případů onemocnění způsobených *Listeria monocytogenes* sérotyp 4b. Z postižených zemřelo 5 dospělých a 2 novorozenci, a u jedné těhotné ženy proběhl spontánní potrat. Případy byly zaznamenány na 21 rozdílných místech francouzského území. K onemocnění došlo po konzumaci vepřového jazyka v aspiku [43].

V období od května do prosince 2000 bylo klinicky potvrzeno 30 případů listeriózy sérotypem 1/2a v 11 státech USA způsobených požitím krutího masa. Z toho bylo postiženo 8 těhotných žen a 22 dalších osob. Došlo ke 4 úmrtím a 3 potratům [31].

Od srpna 1998 do ledna 1999 bylo v Atlantě v USA hlášeno 50 onemocnění listeriózou. Původcem onemocnění byla *Listeria monocytogenes* sérotyp 4b zjištěná v párcích v rohlíku a delikatesách z masa. Zemřelo 6 dospělých, u 2 těhotných žen došlo k potratu [43].

Epidemie listeriózy v severní Itálii v květnu 1997 spojená s požitím studeného kukuřičného salátu s tuňákem postihla 2189 lidí. Většinu postižených tvořili děti a personál dvou soukromých škol a studenti univerzity v Turíně. Klinické příznaky byly hlášeny u 1566 osob, hospitalizováno jich bylo 292. Nato byla *Listeria monocytogenes* sérotyp 4b izolována z biologického materiálu postižených i ze vzorků kukuřičného salátu [2, 43].

Za zmínku stojí i epidemie z roku 1996 ve Finsku v souvislosti s konzumací vakuově baleného uzeného pstruha. U pěti osob došlo k horečnaté gastroenteritidě, původcem byla *Listeria monocytogenes* sérotyp 1/2 [43].

Na přehlídce holštýnských krav v červenci 1994 ve státě Illinois se vyskytlo 58 případů gastroenteritidy a horečky u osob, které konzumovali pasterované čokoládové mléko. Ze vzorku zbylého mléka byla následně izolována *Listeria monocytogenes* 1/2b [13].

Listeria monocytogenes sérotyp 1/2 způsobila v letech 1991 – 1992 na Novém Zélandu onemocnění u 15 osob. Původce byl izolován z originálního balení uzených slávek [43].

V USA v letech 1973 – 1992 bylo hlášeno 32 epidemií listeriózy způsobených konzumací sýru vyrobeného z nepasterizovaného mléka. K úmrtí došlo u 58 postižených [43].

V roce 2012 byla na farmě v Irsku při rutinním odběru syrového mléka zjištěna přítomnost *Listeria monocytogenes*, přičemž stěry z prostředí farmy byly negativní. Proto bylo všech 180 krav rozděleno do 9 skupin po 20 kravách a vyšetřen směsný vzorek každé skupiny. Pozitivní skupina byla následně individuálně odebrána a jednotlivé vzorky analyzovány. U pozitivní krávy pak byly odebrány vzorky z každé čtvrtě vemene a vyšetřeny. Byl zjištěn jediný pozitivní kus, a to z pravé přední čtvrtě vemene, zbytek stáda byl negativní [18].

1.2 Legislativa vztahující se k *Listeria monocytogenes*

Nejzásadnějším a pro provozovatele potravinářských podniků závazným předpisem je Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 (v praxi se často stále používá původní označení předpisu č. 2073/2005) o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Skupiny potravin, u kterých se *Listeria monocytogenes* vyšetřuje, jsou uvedeny v kapitole 1. Kritéria bezpečnosti potravin, konkrétně body 1.1, 1.2 a 1.3 (Obr. 3).

Kategorie potravin	Mikroorganismy/jejich toxiny, metabolity	Plán odběru vzorků (*)		Limity (†)		Analytická referenční metoda (‡)	Páze, na niž se kritérium vztahuje
		n	c	m	M		
1.1 Potraviny určené k přímé spotřebě pro kojení a potraviny určené k přímé spotřebě pro zvláštní léčebné účely (§)	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	nepřítomnost ve 25 g		EN/ISO 11290-1	produkty uvedené na trh během doby účinnosti
1.2 Potraviny určené k přímé spotřebě, které podporují růst <i>L. monocytogenes</i> , jiné než pro kojení a pro zvláštní léčebné účely	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 KTJ/g (§)		EN/ISO 11290-2 (§)	produkty uvedené na trh během doby účinnosti
		5	0	nepřítomnost ve 25 g (§)		EN/ISO 11290-1	před tím, než potravina opustí bezprostřední kontrolu provozovatele potravinářského podniku, který ji vyrábí
1.3 Potraviny určené k přímé spotřebě, které nepodporují růst <i>L. monocytogenes</i> , jiné než pro kojení a pro zvláštní léčebné účely (§)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 KTJ/g		EN/ISO 11290-2 (§)	produkty uvedené na trh během doby účinnosti

Obr. 3. Část tabulky z Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 obsahující kritéria pro vyšetřování *Listeria monocytogenes* pro jednotlivé kategorie potravin [28].

- n počet jednotek tvořících vzorek
 c počet jednotek vzorku, jejichž hodnoty leží mezi *m* a *M*
 m limit, kterému musí vyhovovat *n* vzorků
 M limit, kterému musí vyhovovat *c* vzorků } u bodu 1.1 až 1.3 se tyto limity rovnají

Další legislativní předpisy, ve kterých se setkáme s *Listeria monocytogenes*:

- ČSN 56 9609 Pravidla správné hygienické a výrobní praxe – Mikrobiologická kritéria pro potraviny – tato norma je určena jako návod pro stanovení a aplikaci mikrobiologických kritérií pro potraviny v kterémkoliv stadiu potravinového řetězce, od prvovýroby až ke konečnému spotřebiteli; součástí je kapitola B.5.2 Tolerované hodnoty pro jednotlivé druhy, skupiny nebo podskupiny potravin
- Příloha 4 Federálního zákona „Technické předpisy pro mléko a mléčné výrobky“, která udává povolené hodnoty obsahu mikroorganismů v produktech zpracování mléka při jejich uvádění do oběhu
- Vyhláška 132/2004 Sb., o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení – přesto, že je tato vyhláška již zrušená, stále je v praxi využívána
- Vyhláška 375/2003 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon), ve znění pozdějších předpisů, a o veterinárních požadavcích na živočišné produkty

1.3 Laboratorní vyšetření *Listeria monocytogenes* v potravinách

1.3.1 Odběr vzorků

Vzorky se odebírají náhodným výběrem nebo záměrným výběrem [10]:

- vzorkovaným celkem by měla být výrobní šarže, její část nebo dodávka
- v případě vyšetřování dodávky, která se skládá z více šarží, měla by se vyšetření provést odděleně pro každou šarži
- vzorky by se měly odebírat v dostatečném množství (i pro případ opakované analýzy)
- za vzorek se považuje určité množství výrobku odebrané ze vzorkovaného celku
- mikrobiologické vyšetření se provádí kontrolou jedním výběrem („výběrová kontrola“), kdy se o posouzení šarže rozhodne podle výsledku jednoho výběru v rozsahu n
- při výběrové kontrole se vyberou vzorky ze šarže v počtu n náhodným výběrem

Odběr vzorků provádí oprávněná osoba, která nese odpovědnost za správnost provedení odběru. Pro mikrobiologické vyšetření se nejčastěji odebírají vzorky výchozích surovin, pomocných látek, fázové vzorky v průběhu výroby, hotové výrobky či skladované potraviny. Pokud se současně odebírají vzorky k mikrobiologickému i chemickému vyšetření, odebírají se zásadně nejprve vzorky k vyšetření mikrobiologickému. Musí se používat sterilní náčiní a vzorky se odebírají do sterilních vzorkovnic. O odběru musí být vyhotoven protokol o odběru vzorků a vyplní se i žádanka o laboratorní vyšetření [8].

Způsoby odběru se liší podle konzistence a velikosti vzorků, např. kusové výrobky se odebírají po několika kusech z různých míst a hloubek, tekuté a kašovitě materiály se po promíchání odebírají sterilní pipetou nebo kovovou naběračkou nebo pomocí vypouštěcího ventilu apod., u materiálů smíšené konzistence se odebírají všechny složky výrobku, a to v poměru, v jakém jsou ve výrobku zastoupeny [8]. Při odběru stěrů z prostředí by měla vzorkovaná místa zahrnovat zejména povrchy různých zařízení, se kterými přicházejí potraviny do styku, a také místa, kde se *Listeria monocytogenes* může usadit a množit, a slouží tak jako rezervoáry tohoto patogenního mikroorganismu [44].

Na odběr vzorků bezprostředně navazuje jeho přeprava, uchovávání a zpracování v laboratoři. K přepravě vzorků se používají různé izotermické obaly s chladícími vložkami nebo s pevným CO₂ (suchý led), přenosné chladničky, mrazící boxy atd. Transportní teplota musí být dodržena po celou dobu přepravy do laboratoře [8].

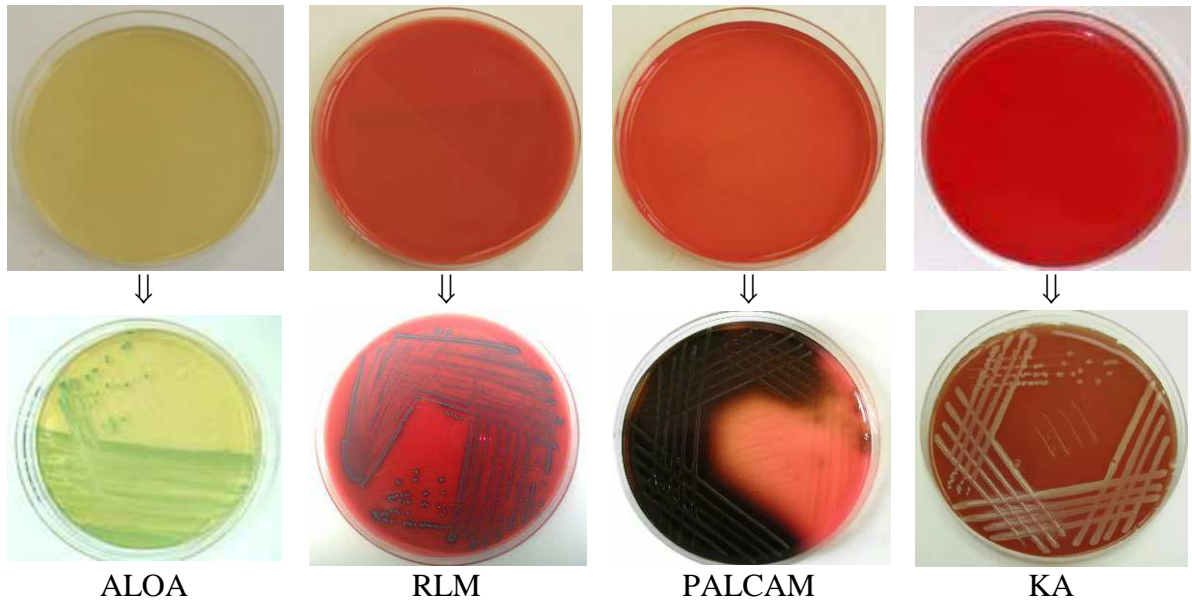
1.3.2 Kultivační půdy

Kultivační půdy používané při vyšetřování *Listeria monocytogenes*, včetně půd používaných při konfirmačních testech [11, 12]:

- poloviční bujón podle Frasera – tekutá selektivní půda pro primární pomnožení se sníženou koncentrací inhibičních složek
- celý bujón podle Frasera – tekutá selektivní půda pro sekundární pomnožení s plnou koncentrací inhibičních složek
- agar ALOA – tuhá selektivní půda
- agar RLM – tuhá selektivní půda
- agar PALCAM – tuhá selektivní půda
- agar Oxford – tuhá selektivní půda
- TSYEA – tuhá neselektivní půda
- TSYEB – tekutá neselektivní půda
- agar s ovčí krví
- bujón k testování využívání cukrů
- agar k testování pohyblivosti

Vzhled kolonií rodu *Listeria* na tuhých kultivačních půdách [8, 11, 12]:

- ALOA – *Listeria monocytogenes* tvoří modrozelené kolonie obklopené neprůhlednou kruhovou zónou precipitace, které se někdy říká tzv. halózána
- RLM – *Listeria monocytogenes* roste v modrých koloniích bez změny barvy média, *Listeria ivanovii* v modrozelených koloniích se žlutou okolní zónou, kolonie *Listeria innocua* jsou bílé, a kolonie *Listeria welshimeri* a *Listeria seeligeri* bílé někdy se žlutým okolím
- PALCAM – rod *Listeria* vytváří drobné šedozelené nebo olivově zelené kolonie o velikosti 1,5 – 2 mm, často s černým vkleslým středem, obklopené hnědočernou zónou
- agar Oxford – rod *Listeria* roste v drobných šedavých až nazelenalých koloniích s vkleslým středem, obklopených černou kruhovou zónou, průměr kolonií 1 – 2 mm
- KA – zástupci rodu *Listeria* rostou na krevním agaru jako drobné našedlé kolonie, pod koloniemi s viditelnou β -hemolýzou (s výjimkou *Listeria innocua* – bez hemolýzy)



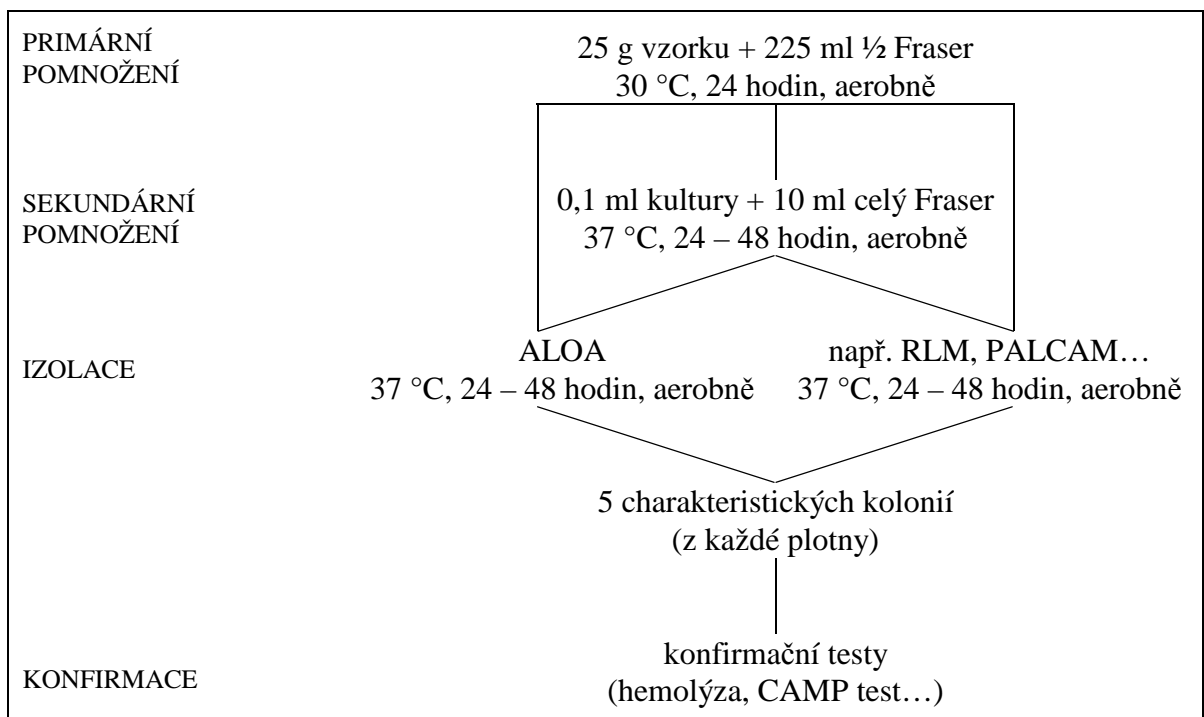
Obr. 4. Růst *Listeria monocytogenes* na tuhých kultivačních půdách [19, 46].

1.3.3 Kvalitativní stanovení

Kvalitativní stanovení neboli metoda průkazu *Listeria monocytogenes*, kdy se zjišťuje přítomnost či nepřítomnost *Listeria monocytogenes* v navážce 25 g vzorku. Výsledek se v tomto případě vyjadřuje jako negativní/25 g či pozitivní/25 g.

Schéma kvalitativního stanovení je uvedeno v Tab. 3, podrobněji bude popsáno dále.

Tab. 3. Schéma postupu stanovení průkazu *Listeria monocytogenes* [8].



Interpretace výsledků vyšetření [28]:

- vyhovující, pokud všechny zjištěné hodnoty poukazují na nepřítomnost bakterie
- nevyhovující, pokud je přítomnost bakterie určena v kterékoli jednotce vzorku

1.3.4 Kvantitativní stanovení

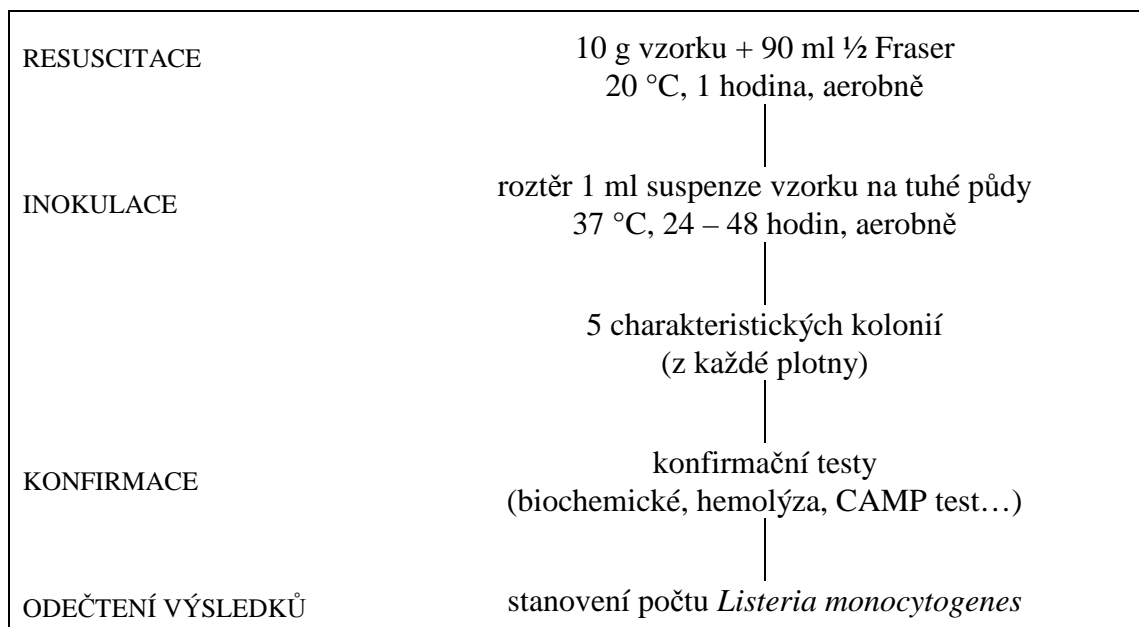
Kvantitativní stanovení neboli stanovení počtu *Listeria monocytogenes*, kdy se zjišťuje početní zastoupení bakterií *Listeria monocytogenes* v navážce 10 g vzorku, a výsledek se udává jako KTJ/g nebo KTJ/ml, přičemž stanovený limit je 100 KTJ/g, resp. 10 KTJ/ml.

Případy, kdy se vyšetřuje počet *Listeria monocytogenes* [28]:

- potravina má $\text{pH} \leq 4,4$
- potravina má $a_w \leq 0,92$
- potravina má $\text{pH} \leq 5,0$ a $a_w \leq 0,94$
- potravina s dobou údržnosti pod 5 dnů
- jiný opodstatněný důvod (např. potraviny dovezené ze zahraničních zemí)

Schéma kvantitativního stanovení je uvedeno v Tab. 4, podrobněji bude také popsáno dále.

Tab. 4. Schéma postupu stanovení počtu *Listeria monocytogenes* [8].



Interpretace výsledků vyšetření [28]:

- vyhovující, pokud jsou všechny zjištěné hodnoty ≤ 100 KTJ/g
- nevyhovující, pokud je kterákoli hodnota > 100 KTJ/g

1.3.5 Konfirmační testy

Konfirmace bakterií rodu *Listeria*

Kolonie pro konfirmaci se vybírají tak, že z každé vyočkované plotny se vybere 5 kolonií suspektních jako kolonie bakterií rodu *Listeria*, pokud jich na jedné plotně roste méně než pět, vyberou se všechny. Každá takto vybraná kolonie se rozočkuje na plotnu s TSYEA. Misky se poté inkubují při 37 °C 24 hodin nebo dle potřeby i déle. Typické kolonie mají průměr 1 – 2 mm, jsou vypouklé, bezbarvé a neprůsvitné, mají celistvý okraj. S takto vykultivovanými typickými koloniemi se pak provádějí následující konfirmační testy [11, 12]:

- průkaz katalázy – získaná kolonie se na podložním sklíčku suspenduje v kapce roztoku peroxidu vodíku, pozitivní reakci značí bezprostřední vznik bublin kyslíku
- Gramovo barvení – z jedné získané kolonie se zhotoví preparát a obarví se podle Grama, bakterie rodu *Listeria* se jeví jako grampozitivní štíhlé krátké tyčinky [11, 12] (Obr. 5); preparát přelijeme roztokem krystalové violeti a necháme působit 20 – 30 s ⇒ barvivo slijeme, ale neoplachujeme vodou ⇒ přelijeme Lugolovým roztokem a necháme působit 20 – 30 s ⇒ rychle opláchneme směsí aceton-ethanol, oplachujeme dokud odtéká barvivo (max. 30 s) a opláchneme vodou ⇒ dobarvíme roztokem safraninu nebo karbolfuchsinu 60 s ⇒ oplach vodou a usušení [7]; dělení na grampozitivní a gramnegativní bakterie je založeno na různé stavbě jejich bakteriální stěny: grampozitivní bakterie mají stěnu tvořenou proteoglykanem a polysacharidy, kterými prochází kyselina teichoová, takže při barvení se krystalová violet dostává do buněk a tvoří s Lugolovým roztokem modrou komplexní barvu, alkohol není schopný prostoupit buněčnou stěnou a rozpustit tento komplex, a dobarvení dodá bakteriím tmavě fialovou barvu, oproti tomu gramnegativní bakterie mají stěnu tvořenou tenkou vrstvou proteoglykanu a vrstvou lipopolysacharidu, takže při stejném postupu dochází k vyplavení komplexu alkoholem a k odbarvení, dobarvením se pak bakterie zbarví červeně [35]



Obr. 5. Gramovo barvení – *Listeria monocytogenes* [9].

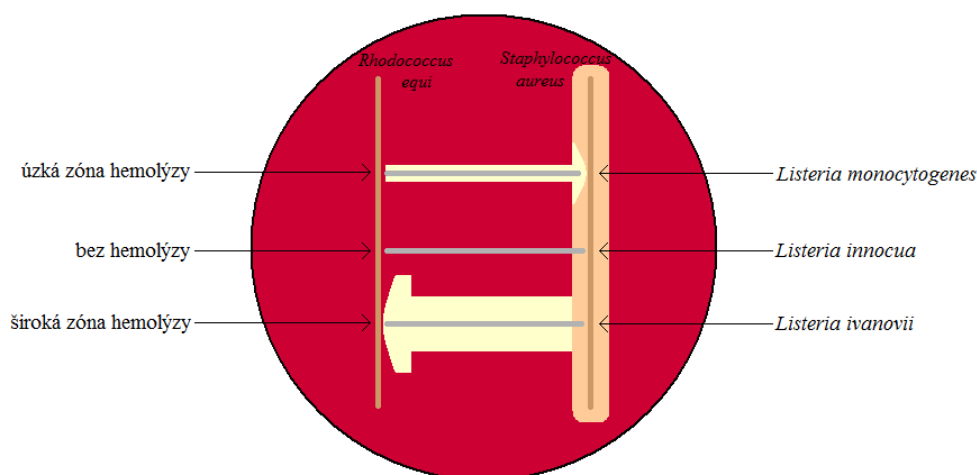
- testování pohyblivosti – získaná kolonie se suspenduje ve zkumavce s půdou TSYEB a inkubuje se při teplotě 25 °C po dobu 8 – 24 hodin, dokud se neprojeví hustý zákal, poté se kapka této suspenze přenesse na podložní sklíčko, překryje se krycím sklíčkem a prohlíží se pod mikroskopem, bakterie *Listeria* se jeví jako štíhlé krátké tyčinky s trhavým pohybem; jako další alternativu lze využít testování pohyblivosti vpichem do agarů k tomu určeného, který se pak inkubuje při teplotě 25 °C po dobu 48 hodin, hodnotí se charakter růstu podél vpichu, přičemž *Listeria* vykazuje typický deštníkovitý růst (tj. růst ve všech směrech od linie vpichu, s konvexní linií pod povrchem půdy)

Konfirmace *Listeria monocytogenes*

Dále je možno pokračovat v konfirmaci, zda se jedná o druh *Listeria monocytogenes*, těmito konfirmačními testy [11, 12]:

- test k průkazu hemolýzy – pokud morfologické a fyziologické znaky a katalázová reakce svědčí pro možnou přítomnost bakterií *Listeria*, naočkují se plotny agarů s ovčí krví ke zjištění hemolytické reakce; vždy jedna kolonie z každé zkoumané kultury izolovaná na TSYEA se naočkuje vpichem jehlou na jiné místo agarů, spolu s těmito vpichy se naočkuje i pozitivní kontrolní kultura *Listeria monocytogenes* a negativní kontrolní kultura *Listeria innocua*; po inkubaci při 37 °C po dobu 24 hodin se plotny prohlížejí proti jasnému světlu a hodnotí se hemolýza: *Listeria monocytogenes* vytváří úzké jasné průsvitné zóny β -hemolýzy, *Listeria innocua* nevytváří hemolýzu v okolí vpichu, *Listeria seeligeri* vytváří slabou zónu hemolýzy, *Listeria ivanovii* obvykle vytváří široké jasné ohraničené zóny β -hemolýzy
- využívání cukrů – bujóny k testování využívání cukrů rhamnózy a xylózy se očkují kulturou vyrostlou v TSYEB a inkubují se při 37 °C po dobu až 5 dnů; pozitivní reakce, tzn. tvorba kyseliny, se projeví žlutým zbarvením již během 24 – 48 hodin

- CAMP test – na agar s ovčí krví se v rovnoběžných čarách na opačných stranách plotny naočkují testovací kultury *Staphylococcus aureus* a *Rhodococcus equi*, testované a kontrolní kmeny (*Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* a *Listeria ivanovii*) se pak očkují podobným způsobem v rovnoběžných čarách, ovšem v kolmém směru na testovací kultury, čáry se nesmějí navzájem dotýkat, ale jsou od sebe vzdáleny asi 1 – 2 mm, plotny se inkubují při 37 °C po dobu 24 hodin; pozitivní reakce testovaného kmene s kmenem *Rhodococcus equi* se projeví 5 – 10 mm širokou β-hemolýzou ve tvaru šipky, za negativní se považuje vznik úzké zóny slabé hemolýzy o šířce cca 1 mm; pozitivní reakce testovaného kmene s kmenem *Staphylococcus aureus* se jeví jako malá zaokrouhlená zóna β-hemolýzy o šířce přesahující nárůst testovaného kmene jen asi o 2 – 4 mm a lokalizovaná uvnitř zóny slabé hemolýzy vytvořené kulturou *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* široké zóny hemolýzy v jeho okolí nevytváří (Obr. 6)



Obr. 6. Schéma CAMP testu [11, 12].

Tab. 5. Reakce konfirmačních testů k identifikaci rodu *Listeria* [8, 11, 12].

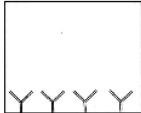
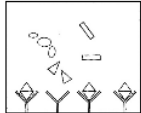
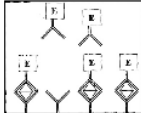
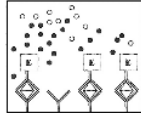
Druh	Hemolýza	Tvorba kyseliny		CAMP test	
		rhamnóza	xylóza	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	-	V	-	-	-

- (+) slabá reakce
 + pozitivní reakce
 - negativní reakce
 V variabilní reakce

V současnosti se používají také moderní konfirmační metody:

- PCR = polymerázová řetězová reakce – lze ji využít k detekci *Listeria monocytogenes* přímo v potravinách, k identifikaci izolátů, k identifikaci vybraných sérotypů či k detekci genů kódujících produkci jednotlivých faktorů virulence (např. listeriolysin O, internaliny) nebo genů rezistence k antimikrobiálním látkám [9]; princip PCR je založen na využití enzymu DNA-polymerázy pro opakované kopírování templátové molekuly DNA, syntéza je řízena krátkými oligonukleotidy (primery), které nasedají na templátovou DNA na začátku a konci amplifikovaného fragmentu, každý primer reaguje s jiným vláknem původní dvouřetězcové DNA, mnohonásobné amplifikace je dosaženo opakováním tří základních kroků: denaturace, hybridizace a syntéza nových vláken, celý proces amplifikace probíhá v termocykleru, k detekci namnožených PCR produktů je nejčastěji využívána elektroforetická separace v agarózovém gelu s následným obarvením v roztoku ethidium bromidu a vizualizací v transiluminátoru pod UV světlem, kde ethidium bromid oranžově fluoreskuje [7]
- PFGE = pulzní gelová elektroforéza – metoda založená na dělení velkých molekul DNA pomocí střídavého elektrického pole, takže je možné dosáhnout většího rozkladu molekul v porovnání s běžnou elektroforézou v agarózovém gelu, PFGE se často využívá ke stanovení patogenů jako *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* (včetně O157), *Campylobacter* a *Listeria* – v epidemiologických studiích těchto patogenů je metoda považována za „zlatý standard“ [32]; bylo prokázáno, že vykazuje vyšší rozlišovací schopnost než např. sérotypizace, kterou lze rozlišit 13 sérotypů, pomocí PFGE se podařilo rozpoznat více než 300 různých PFGE typů *Listeria monocytogenes* izolovaných z přírodních zdrojů [15]
- MALDI-TOF – typ hmotnostní spektrometrie, jejíž princip spočívá v tom, že laserové výboje o určité vlnové délce způsobí těkavost analytu vázaného na matrix, tato působící energie vyvolá vznik oblaku částic (směs nabitých iontů a nenabitých molekul), elektrické pole pak extrahuje a urychluje ionty, které jsou odděleny na základě poměru hmotnost/náboj a dále unášeny trubicí k detektoru, kde je měřen čas průletu jednotlivých částic, tento čas průletu je přímo úměrný poměru hmotnost/náboj sledovaného analytu, přičemž obecně platí, že čím menší hmotnost, tím kratší čas průletu, a naopak, čím větší hmotnost, tím delší čas průletu, veškerá nasbíraná data jsou pak přenesena do počítače, kde jsou následně vypočítány příslušné hmotnosti analytů [38]

- VIDAS imunodetekce – jde o stanovení přítomnosti bakterií *Listeria monocytogenes* po pomnožení v kultivačních médiích pomocí dvojnásobné specifické ELFA reakce přístrojem miniVIDAS, přičemž ELFA reakce přístrojem miniVIDAS je taková imunitní reakce, kde dojde k navázání antigenních struktur ve vyšetřovaném objemu vzorku na specifické protilátky a následné detekci se 4-methyl-umbelliferyl-fosfátem jako markerem fluorescence; princip: pomnožené sledované bakteriální druhy se usmrtí varem, v přístroji miniVIDAS proběhne imunologická reakce vazby specifických protilátek ve specifickém stripu a reakce s markerem fluorescence, tato fluorescence je opticky změřena, a porovnáním proti hodnotě standardu vyhodnocena [36]
- ELISA – imunochemická metoda založená na reakci antigenu s enzymaticky značenou specifickou protilátkou (např. křenová peroxidáza), kdy je značená protilátka navázána na povrch mikrotitrační destičky a dochází k reakci s antigenem, a následně konverzi bezbarvého substrátu na barevný produkt [7], takto vzniklý barevný produkt je pak snadno vyhodnotitelný vizuálně nebo spektrofotometricky [46] (Obr. 7)

<p>Krok 1</p> 	<p>Krok 2</p> 
<p>Na povrch testovací jamky jsou adsorbovány protilátky specifické pro cílový antigen.</p>	<p>Do jamky přidáme pomnožený vzorek potravin. Cílové antigeny se vážou na specifické protilátky. Následným promýváním odstraníme zbytky vzorku a nenavázaný antigen.</p>
<p>Krok 3</p> 	<p>Krok 4</p> 
<p>Do jamky přidáme enzymaticky značené protilátky. Protilátky se váží na antigen a vytváří „sandwich“. Následným promýváním odstraníme nenavázané značené protilátky.</p>	<p>Do jamky přidáme substrát. Enzym katalyzuje přeměnu substrátu na barevný produkt. Následuje vyhodnocení výsledků.</p>

Obr. 7. Schéma – hlavní kroky metody sandwich ELISA [9].

2 KYSELÉ ZRAJÍCÍ SÝRY

Podle FAO/WHO jsou sýry definovány jako mléčné výrobky vyrobené srážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky. Z pohledu svého složení patří sýry k nejhodnotnějším potravinám, neboť jsou zdrojem esenciálních aminokyselin, bílkovin, mléčného tuku, vápníku, fosforu a vitamínů skupiny B. Díky nízkému obsahu mléčného cukru – laktózy – mohou sýry konzumovat i lidé s intolerancí laktózy [17, 24].

Kyselý sýr je takový sýr, u něhož se v technologii výroby uplatňuje pouze kyselé srážení, tzn. srážení pomocí mléčných kultur [17, 24].

Zrajícím sýrem je pak sýr, u kterého po prokysání dochází k dalším biochemickým a fyzikálním procesům. Podle způsobu zrání rozeznáváme sýry zrající na povrchu, sýry zrající pod mazem (od povrchu ke středu) a sýry zrající v celé hmotě [17]. Pro experimentální část diplomové práce byl použit druh kyselého sýru zrajícího pod mazem.

Parametry, které se kromě *Listeria monocytogenes* vyšetřují u sýrů, uvádí Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 v kapitole 2. Kritéria hygieny výrobního procesu (Obr. 8), a také ČSN 56 9609 (Obr. 9).

Kategorie potravin	Mikroorganismy	Plán odběru vzorků (*)		Limity (†)		Analytická referenční metoda (‡)	Fáze, na niž se kritérium vztahuje	Opatření v případě nevyhovujících výsledků
		n	c	m	M			
2.2.2 Sýry vyrobené z tepelně ošetřeného mléka či tepelně ošetřené syrovátky	<i>E. coli</i> (‡)	5	2	100 KT/g	1 000 KT/g	ISO 16649-1 nebo 2	v takovém okamžiku během výrobního procesu, kdy se předpokládá nejvyšší počet bakterií <i>E. coli</i> (§)	zlepšení hygieny výroby a výběru surovin
2.2.3 Sýry vyrobené ze syrového mléka	Koagulázopozitivní stafylokoky	5	2	10 ⁴ KT/g	10 ⁵ KT/g	EN/ISO 6888-2	v takovém okamžiku během výrobního procesu, kdy se předpokládá nejvyšší počet stafylokoků	zlepšení hygieny výroby a výběru surovin; pokud jsou zjištěny hodnoty > 10 ⁵ KT/g, musí být příslušná partie sýra vyšetřena na stafylokokové enterotoxiny
2.2.4 Sýry vyrobené z mléka, které bylo podrobeno nižšímu tepelnému ošetření než pasteurizaci (‡), a zrající sýry vyrobené z pasteurizovaného či silněji tepelně ošetřeného mléka nebo z pasteurizované či silněji tepelně ošetřené syrovátky (‡)	Koagulázopozitivní stafylokoky	5	2	100 KT/g	1 000 KT/g	EN/ISO 6888-1 nebo 2		
2.2.5 Nezrající mléčné sýry (čerstvé sýry) vyrobené z pasteurizovaného či silněji tepelně ošetřeného mléka nebo z pasteurizované či silněji tepelně ošetřené syrovátky (‡)	Koagulázopozitivní stafylokoky	5	2	10 KT/g	100 KT/g	EN/ISO 6888-1 nebo 2	konec výrobního procesu	zlepšení hygieny výroby; pokud jsou zjištěny hodnoty > 10 ⁵ KT/g, musí být příslušná partie sýra vyšetřena na stafylokokové enterotoxiny

Obr. 8. Část tabulky z Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 obsahující kritéria pro vyšetřování sýrů [28].

- n počet jednotek tvořících vzorek
- c počet jednotek vzorku, jejichž hodnoty leží mezi *m* a *M*
- m limit, kterému musí vyhovovat *n* vzorků
- M limit, kterému musí vyhovovat *c* vzorků

B.5.2.4.9 Sýry				
B.5.5.4.9.4 Měkké sýry zrající, plísňové sýry				
	n	c	m	M
Koliformní bakterie	5	2	10 ⁴	10 ⁵
<i>Escherichia coli</i>	5	2	10 ²	10 ³
Koagulázopozitivní stafylokoky	5	2	10 ²	10 ³
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	0/25	—

Obr. 9. Tabulka z ČSN 56 9609, ve které jsou uvedeny tolerované hodnoty specifikované pro zrající sýry [10].

2.1 Mléko jako surovina pro výrobu kyselých sýrů

Mléko je sekret mléčné žlázy savců určený k prvotní výživě jejich mláďat, proto se jedná o komplexní potravinu obsahující všechny nutričně významné látky. Ve výživě člověka je významné především jako zdroj vápníku. K výrobě sýrů se používá nejčastěji mléko kravské (celosvětově asi 85 %), v menší míře mléko od jiných druhů hospodářských zvířat, např. kozí, ovčí, buvolí. Na 1 kg sýru je potřeba kolem 10 litrů mléka [22].

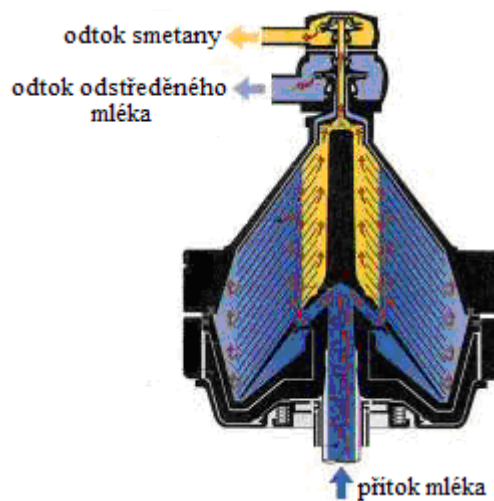
Syrové mléko musí být po přijetí do zpracovatelského závodu co nejrychleji zchlazeno na teplotu nepřesahující 6 °C a udržováno při této teplotě až do zpracování. Případně může být syrové mléko uchováno při vyšší teplotě, pokud proces zpracování začne bezprostředně po nadojení nebo do 4 hodin od přijetí ve zpracovatelském závodě, nebo pokud příslušný orgán povolí vyšší teplotu z technologických důvodů souvisejících s výrobou určitých mléčných výrobků. V syrovém kravském mléce určeném pro výrobu sýrů musí být CPM při 30 °C \leq 300 000 KTJ/ml, ve zpracovaném kravském mléce určeném pro výrobu sýrů pak CPM při 30 °C \leq 100 000 KTJ/ml [29]. Mléko musí pocházet od zdravých dojníc, nesmí obsahovat inhibiční látky a musí vykazovat typické sensorické vlastnosti [22]. Pro výrobu sýrů není vhodné mléko na začátku a na konci laktace [24].

Nejvýznamnějším požadavkem na jakost syrového mléka je mikrobiální čistota. Má vliv nejen na trvanlivost, ale také na technologické vlastnosti suroviny. Při hodnocení mikrobiální kvality mléka jsou, vedle celkového počtu mezofilních mikroorganismů, sledovány především koliformní bakterie jako indikátor fekálního znečištění, termorezistentní mikroorganismy, sporotvorné anaerobní bakterie způsobující vady sýrů, a psychrotrofní mikroorganismy zhoršující technologické a chuťové vlastnosti mléka [22].

Důležité je ale i chemické složení mléka, a to především pro výtěžnost a složení sýru. Výtěžnost určuje především obsah kaseinu. Poměr tuku a kaseinu je rozhodující pro výsledný obsah tuku v sušině. Pro syřitelnost mléka je nutná přítomnost vápenatých iontů a je rovněž ovlivněna genotypem dojnice. Přítomnost inhibičních látek, produkty lipolytických změn, nedostatek některých iontů a volných aminokyselin v mléce zhoršuje kvasnost mléka a negativně ovlivňuje i zrání sýrů [22].

Po příjmu do zpracovatelského podniku následuje základní mlékárenské ošetření mléka:

- 1) filtrace nebo centrifugace – přesto, že je mléko čištěno již v zemědělských závodech, provádí se v mlékárnách jeho opakované čištění [24] k odstranění případných mechanických nečistot [22]
- 2) odstředování – provádí se na odstředivkách, základním principem odstředování je rozdíl měrné hmotnosti částicek suspendovaných v kapalině a spojitě fáze emulze, přičemž hnací silou jsou odstředivé síly, lehčí složkou je smetana, těžší složkou pak odstředěné mléko, v němž zůstává tzv. zbytkový obsah tuku (0,01 – 0,05 %) [20, 24]; pro kyselé sýry se mléko odstřeďuje na obsah tuku 0,05 %



Obr. 10. Schéma samoodkalovací odstředivky [20].

- 3) standardizace – úprava tučnosti mléka – lze provádět těmito způsoby: smísením plnotučného mléka (nebo smetany) s odstředěným mlékem v úchovných nádržích, standardizačním zařízením, nebo kontinuální standardizací [20, 24]
- 4) pasterace – nejdůležitější technologický krok, jehož cílem je likvidace převážné části vegetativních forem mikroorganismů, redukce počtu spór a inaktivace enzymů, tzn.

minimalizace zdravotního nebezpečí za minimálních chemických, fyzikálních, organoleptických a nutričních změn mléka [20, 24]; pasterace probíhá v nejrůznějších typech pastérů (Obr. 11); při výrobě kyselých sýrů se využívá tzv. vysoká pasterace při 85 °C po dobu 15 – 20 sekund [17]



Obr. 11. Pasterační zařízení [20].

- 5) homogenizace – mechanický proces probíhající v homogenizátorech, který se používá k roztříštění tukových kuliček na jemné disperzní částice pod 1 μm , čímž je zabráněno vyvstávání mléčného tuku při skladování tekutých mléčných výrobků [20, 22, 24]
- 6) chlazení na teplotu do 6 °C – ustává schopnost růstu patogenů a přežívající mikroflóry, mléko se chladí v chladících sekcích pastéru ledovou vodou a solankou [20, 24]

2.2 Čisté mlékařské kultury

Jako čisté mlékařské kultury se označují bakteriální kultury, ze kterých se spolu se sterilním mlékem vyrábějí zákysové kultury. Zákysové kultury jsou vybrané definované a živé mikroorganismy, které se používají ve vhodné formě jako očkovací dávka v množství nejméně 10^6 buněk/g s cílem zahájení procesu fermentace, která má zlepšit vzhled, chuť, vůni a trvanlivost, případně další požadované funkční vlastnosti sýru. Podle obsažených skupin mikroorganismů se dělí na bakteriální (mezofilní nebo termofilní), kvasinkové, plísňové a smíšené, podle druhové a kmenové skladby těchto mikroorganismů pak na jednokmenové, vícekmenové, směsné vícekmenové a tradiční kultury. Další možné je dělení kultur podle funkce na startovací, protektivní a probiotické. K přímému očkování do mléka jsou určeny především zákysové kultury ve zmrazené nebo lyofilizované formě [22].

V první fázi – při výrobě průmyslového tvarohu – jsou využívány tzv. primární kyselé kultury, v tomto případě mezofilní smetanová kultura obsahující mikroorganismy *Lactococcus* a *Leuconostoc* [22].

Kyselinotvorné koky *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* při homofermentativním rozkladu laktózy produkují kyselinu mléčnou [22].

Aromatvorné koky neboli citrát využívající koky zastoupeny *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* se kromě produkce kyseliny mléčné z laktózy vyznačují rozkladem citrátů na CO₂ a směs sloučenin [22].

Kromě primárních kultur se při následné výrobě sýrů používají ještě sekundární kultury, které hrají důležitou roli při zrání a významně přispívají k organoleptickým vlastnostem sýrů. Do této skupiny jsou řazeny propionová kultura, mazové kultury a plísňové kultury [22]. Pro sýry zrající s mazem na povrchu se používá mazová kultura *Brevibacterium linens* společně s kvasinkovými kulturami [17], zejména s kulturou *Candida valida*.

Candida valida se řadí mezi kvasinky, což jsou z taxonomického hlediska jednobuněčné houby. Vykazuje proteolytické, lipolytické a sacharolytické vlastnosti [8]. Deaminuje aminokyseliny uvolněné z bílkovin na příslušné ketokyseliny a uvolňuje amoniak, který vniká do hmoty sýru a snižuje tak jeho kyselost. Kyselost snižuje i tím, že za přítomnosti kyslíku oxiduje nadbytečnou kyselinu mléčnou na oxid uhličitý a vodu. Svou metabolickou aktivitou vytváří chuť, texturu i vzhled sýru. V případě kyselých zrajících sýrů hraje úlohu růstového faktoru, který stimuluje růst kultury *Brevibacterium linens* [33].

Brevibacterium linens patří do skupiny koryneformních bakterií. Tento mikroorganismus je velmi důležitý pro správný průběh zrání procesu, může se uplatnit na povrchu sýru až poté, co je přítomná kyselina mléčná metabolizována a neutralizována přítomnými kvasinkami a koky, a pH povrchu sýra stoupne k hodnotám 5,7 – 6,0. Produkuje žlutooranžové karotenoidní pigmenty, které se podílí na charakteristickém zbarvení povrchu sýra. Nejlépe roste při neutrálním pH, daří se mu i při vysoké koncentraci soli. Vyznačuje se vysokou proteolytickou aktivitou a schopností degradovat kasein i bílkoviny syrovátky. Jeho schopnost degradovat aminokyseliny za vzniku amoniaku a methionin za vzniku methanthiolu je částečně zodpovědná za vznik velmi výrazné chuti a vůně sýrů. Ke vzniku typické chuti a vůně přispívá také kyselina máselná, kyselina kapronová, fenylmethanol, dimethyldisulfid a dimethyltrisulfid [22].

2.3 Výroba kyselých zrajících sýrů

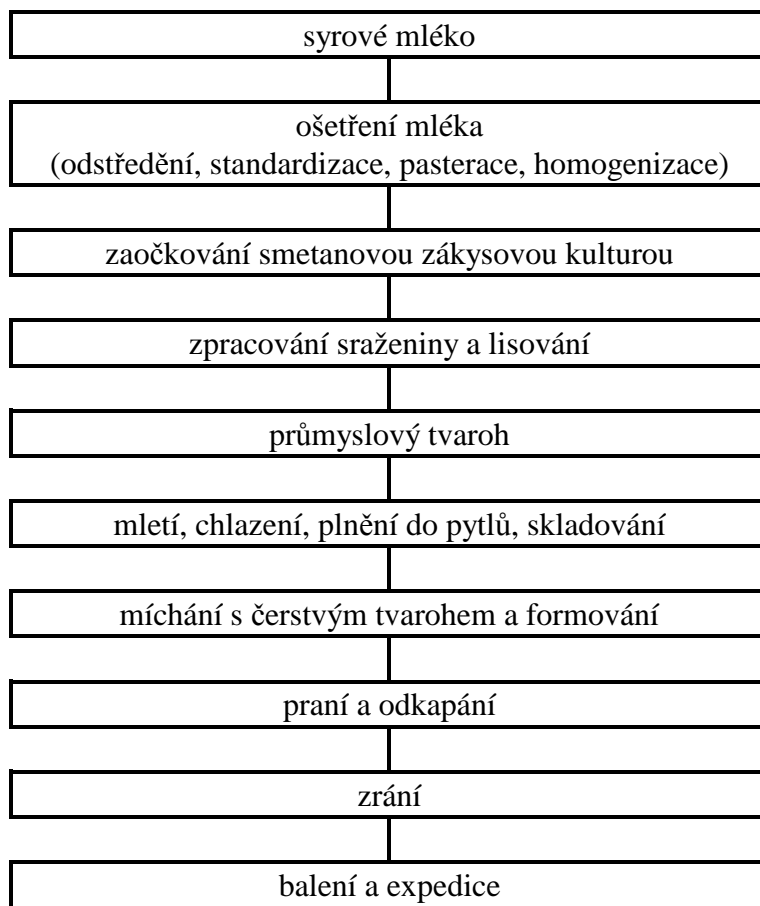
Pasterované odstředěné standardizované mléko se při teplotě 22 – 30 °C sraží zaočkováním 0,5 – 2 % mezofilní smetanové kyselkové kultury v tvarohářských vanách. Sraženina se po pokrácení a míchání dohřívá na 40 – 42 °C a lisuje se v lisovací vaně. Meziproduktem při výrobě kyselých sýrů je průmyslový tvaroh s přídavkem 3 – 4,5 % soli, který má obsah sušiny 32 %. Ten se poté rozemele, vychladí, plní do polyethylenových pytlů nebo nerezových kontejnerů, povrch se mírně prosolí a skladuje 1 – 2 týdny při 15 °C [17, 24].

Po skladování se průmyslový tvaroh mele na válcovém mlýnu, smíchá se s čerstvým tvarohem, přidají se zrací soli (směs uhličitanu sodného a uhličitanu vápenatého), které slouží ke snížení kyselosti. Následuje formování do konečného tvaru, dosoušení na sušinu 35 – 36 % při teplotě 22 – 24 °C a relativní vlhkosti 80 – 85 %, během něhož dochází působením kvasinek ke snížení kyselosti. Dalším krokem je praní a odkapání [17].

V první fázi zrání trvající 2 dny při teplotě 19 – 20 °C a relativní vlhkosti 90 % se povrch kyselých sýrů ošetří mlhovým postřikem kvasinkovou kulturou *Candida valida*. Postup vede k rychlému zvýšení pH z hodnoty 4,8 – 5,0 do neutrální oblasti, což vytváří ideální podmínky pro rozvoj mazové kultury *Brevibacterium linens*, která se nanáší namáčením sýrů do solného roztoku nebo postřikem [22, 24]. Takto vyrobené kyselé sýry zrají 4 – 8 dnů při 15 – 20 °C a relativní vlhkosti 80 – 90 % [17], během zrání je sýry nutné 2 – 3x obrátit [22]. Před koncem zrání se sýry balí, nejlépe do propustného obalu, a expedují [17].

V průběhu zrání dochází k chemickým změnám takřka všech složek sýrů [24, 33]:

- bílkoviny – proteolýza je hlavním faktorem při zrání a ovlivňuje jak chuť a vůni, tak i texturu sýrů; proteolytické enzymy pocházejí ze tří zdrojů: zbytky syřidla, plasmin, a mléčné a ostatní mikroorganismy; hlavní stupeň proteolýzy je degradace para- κ -kaseinu zbytkovým syřidlem na polypeptidy, které jsou dále štěpeny bakteriálními proteázami a peptidázami na peptidy a aminokyseliny, dalším rozkladem aminokyselin pak vznikají amoniak, aldehydy, alkoholy a aminy; plasmin a ostatní enzymy degradují β -kasein; při proteolýze vznikají také těkavé mastné kyseliny
- tuk – podléhá při zrání nejmenším změnám; rozsah lipolýzy je dán obsahem tuku v sýru, na lipolýze se podílejí mikrobiální enzymy a syřidla s vysokou lipázovou aktivitou
- laktóza – je rozkládána na kyselinu mléčnou až do úplného vymizení; kyselina mléčná má vliv na bobtnání para-kaseinu a odštěpuje vápník za vzniku mléčnanu vápenatého



Obr. 12. Schéma výroby kyselých zrajících sýrů.

2.4 Senzorické požadavky na jakost kyselých zrajících sýrů

Senzorické znaky kyselých zrajících sýrů [19, 33]:

Vzhled a barva: tvar podle druhu pravidelný či nepravidelný, podle stupně zrání nedeformovaný až deformovaný, povrch hladký nebo mírně nerovný s přiměřenou vrstvou mazu; barva stejnorodá, na povrchu žlutá až oranžová, barva se stává intenzivnější v průběhu zrání; slabý nádech bílé plísně *Geotrichum candidum* není na závadu

Konzistence: jemná a hladká, soudržná a pružná, poloměkká až měkká podle stupně zrání

Chuť: čistá, jemně pikantní, mírně slaná, charakteristická, v průběhu zrání více pikantní

Vůně: čistá, jemně pikantní, charakteristická, v průběhu zrání více výrazná

Stupeň prozrání: od povrchu ke středu, zpočátku jsou tyto sýry tužší s patrným tvarohovým jádrem, dále pomalu postupuje zrání s vývojem výraznějšího mazu a chuti, nejintenzivnější rozvoj a zrání až k jádru sýrů nastává jeden týden do konce data minimální trvanlivosti

Vady průmyslového tvarohu a kyselých zrajících sýrů [24, 33, 39]

Vady konzistence:

- lepkavá konzistence – na povrchu sýru je přebytečná vlhkost a povrch lepká
- mazlavá konzistence – vlhkost na povrchu je vyšší než u lepkavé konzistence, povrch je klouzavý a mokrá
- svlékavá konzistence – dochází k oddělování horní části povrchu kyselého sýru, která má často i hořkou chuť, tato vada nesouvisí se vzdušnou vlhkostí
- uvolňování tekutiny – vytékání tekutiny do primárního, popř. sekundárního obalu
- předčasné roztékání – příliš měkká konzistence – vadu způsobuje *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, nebo také oospóry, které pocházejí především ze špatně ošetřeného tvarohu, případně pomnožení plísně *Geotrichum candidum*
- tvarohovitost – způsobena nedostatečným prozráním za nevhodných zracích podmínek, dále může být způsobena nedostatkem kulturní proteolytické mikroflóry na povrchu, vyskytuje se také u předčasně balených zrajících sýrů, které pak vysychají a neprozrávají, neboť kulturní mikroflóra nemůže růst
- vysychání – nevhodné skladovací podmínky, nevhodné balení, popř. překročení doby uskladnění

Vady povrchu a barvy:

- černání – způsobeno vyšším obsahem železa nebo mědi v surovině – průmyslovém tvarohu, nebo růstem barevných kolonií plísní či kvasinek
- hnědavé zbarvení – způsobeno velkými dávkami dusičnanů přidaných do mléka před sýřením
- hnědé skvrny – různé druhy mikroorganismů
- bílá mazovitost – sýry neprozrávají, nepříjemně páchnou, jejich povrch se povléká šedobílým hlenovitým až řídkým mazem

Vady aromatu a chuti:

- mýdlovité aroma a chuť – kontaminace sýrů rezidui čistících přípravků
- hořká až hnilobná příchut' – bývá způsobena významnou kontaminací a aktivitou aerobně sporulujících mikroorganismů vedoucí k nekulturní proteolýze
- zatuchlá chuť – způsobena nedostatečným přístupem vzduchu při sušení sýrů nebo silným pomnožením plísně *Geotrichum candidum*

3 BIOPROTEKTORY

Bioprotektory jsou přírodní multifunkční pomocné látky, které pomáhají vylepšit texturu a chuť, a prodloužit dobu skladovatelnosti v chlazeném prostředí u mnoha druhů potravin. Jsou vhodné pro potlačování růstu nežádoucích mikroorganismů (např. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Lactobacillus* aj.). Většina bioprotektorů jsou přírodní směsi bez přídatných látek a nemusí být proto značeny na obalu [1].

Jako bioprotektory ale nemusí sloužit jen tyto vyráběné přírodní směsi, spousta látek produkovaných bakteriemi nebo samotné bakterie též vykazují bioprotektivní účinky.

Při výrobě potravin se proti růstu *Listeria monocytogenes* používají například nisin, pediocin, lactocin, lacticin, enterocin, sakacin, brevicin, divercin, pisciocin a mesentericin. Z mikroorganismů lze využít *Carnobacterium pisciola*, *Carnobacterium divergens*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc mesenteroides*... [41, 47]

Bakterie mléčného kvašení jsou již tisíce let využívány pro jejich okyselující vlastnosti, a tím jejich schopnosti inhibovat růst patogenních mikroorganismů, a také pro jejich schopnost vytvářet žádoucí chuť, vůni a texturu fermentovaných potravin. Za tyto bioprotektivní vlastnosti jsou odpovědné organické kyseliny, nízkomolekulární metabolity (reuterin, reutericyklin, diacetyl, mastné kyseliny), hydrogenperoxid, fungicidní sloučeniny (propionát, fenyl-laktát, hydroxyfenyl-laktát a 3-hydroxymastné kyseliny), bakteriociny a molekuly podobné bakteriocinům. Některé kmeny mají také zdraví-podpůrné vlastnosti [47], používají se v medicíně jako baktericidní a antivirová léčiva [41]. Mezi bakterie mléčného kvašení patří rody *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* a *Leuconostoc*. Nejvýznamnější je rod *Lactobacillus*, jehož činnosti se využívá pro konzervaci zeleniny a některých krmiv (tvorba kyselin, bakteriocinů a nízkého pH), při výrobě sýrů (*L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. casei*) a kysaných mléčných výrobků (*L. delbrueckii*, *L. kefir*, *L. plantarum*), některých druhů masných výrobků atd. Na druhou stranu ale kontaminace těmito bakteriemi způsobuje problémy při výrobě uzenin, vyznačují se proteolytickou i slabou lipolytickou aktivitou, mohou tvořit biogenní aminy a vzácně mohou být i patogenní [8].

Bakteriociny jsou antimikrobiální peptidové látky produkované bakteriemi mléčného kvašení. Na základě strukturních a funkčních vlastností se dělí do čtyř tříd \Rightarrow třída I – tzv. lantibiotika, třída II – malé termostabilní bakteriociny, třída III – velké termolabilní bakteriociny, a třída IV – komplexní bakteriociny složené z lipidů, sacharidů a proteinů. Některé z nich vykazují obrovský konzervační potenciál při uchovávání potravin a dokáží tak omezit používání chemických konzervovadel. Povědomí o bakteriocinech vzrostlo až v posledních 25 letech. Ačkoli obecně mají bakteriociny poměrně úzké spektrum inhibice a působí pouze proti grampozitivním bakteriím, některé z nich účinkují i proti gramnegativním mikroorganismům přítomným v potravinách a lidském i živočišném gastrointestinálním traktu [41, 47]. U všech bakteriálních kmenů produkujících bakteriociny musí být přítomen imunitní mechanismus, který je brání před zničením jejich vlastními antimikrobiálními peptidy [47].

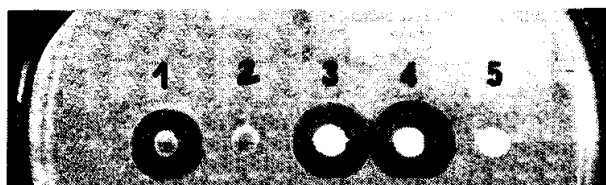
Významným zástupcem je nisin náležející k bakteriocinům třídy I, který je produkován bakterií *Lactococcus lactis*. Jeho použití je v současnosti povoleno ve více než 50 zemích [47]. Využívá se například k zabránění růstu nežádoucí mikroflóry při výrobě mléčných výrobků, k ochraně proti spórám *Clostridium botulinum* v pasterovaných sýrech, v kombinaci s lysozymem je schopen brzdit růst mléčných bakterií při kvašení piva nebo vína [41].

Pediociny – bakteriociny třídy II, produkované bakteriemi rodu *Pediococcus* – vykazují proti řadě patogenů účinnost ještě vyšší než nisin a vyznačují se stabilitou při vysokých teplotách a širokém spektru pH 3 – 8 [41].

Enterociny – bakteriociny třídy II, produkované rodem *Enterococcus* – enterokoky hrají významnou roli při zrání sýrů a vytváření aroma (acetaldehyd, acetoin, diacetyl), jsou vysoce odolné vůči vysokým teplotám a soli. Tyto jejich příznivé vlastnosti vedly k jejich začlenění do startovacích kultur, uplatňují se také jako probiotika a příznivě působí i v dalších ohledech (zmírnění laktóзовé intolerance, snižování hladiny cholesterolu, protikarcinogenní aktivita, stimulace imunitního systému, zlepšení nutriční hodnoty potravin). Jako probiotické přísady do potravin i krmiv se používají zejména *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis* [40]. Většina enterocinů produkovaných druhem *Enterococcus faecalis* zahrnují ve svém spektru inhibice *Listeria monocytogenes* [45].

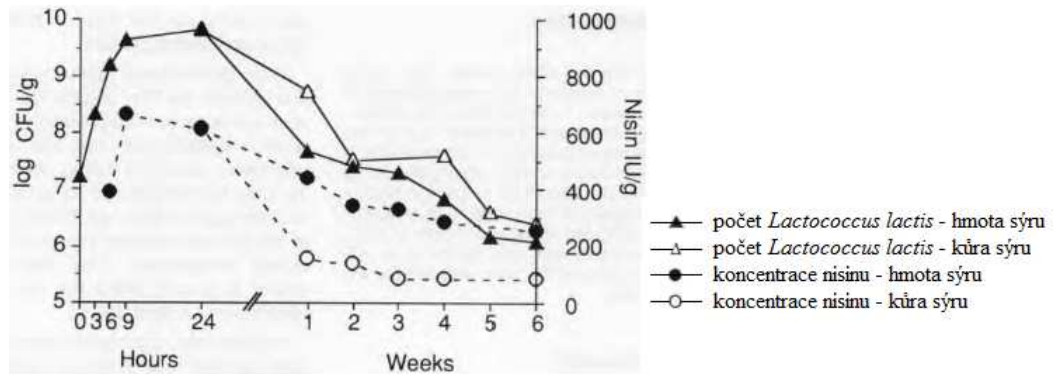
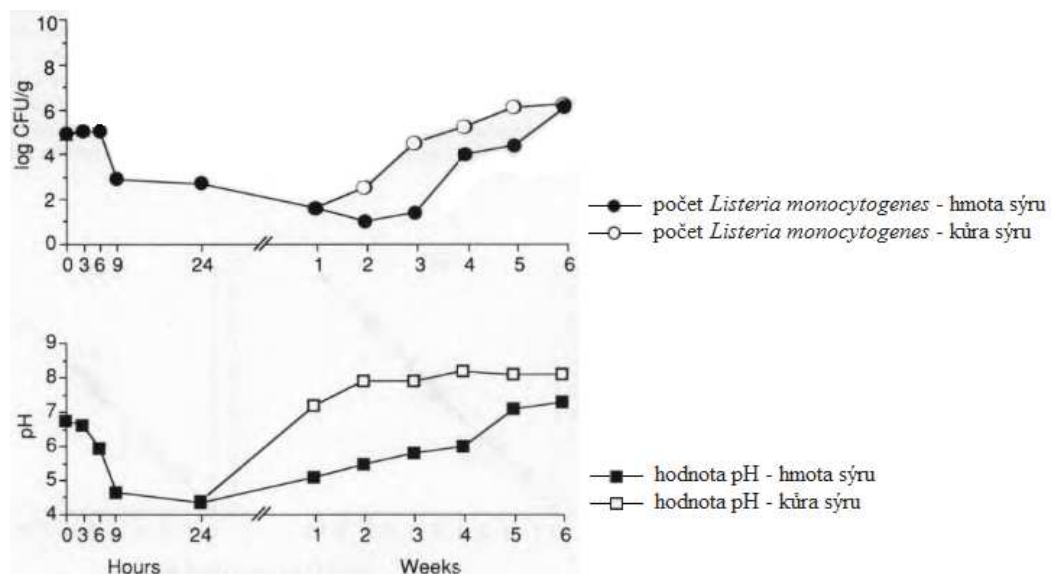
Problematikou účinnosti bioprotektivních látek se zabývaly i některé zahraniční studie:

V první z nich byla sledována antimikrobiální aktivita bakterií mléčného kvašení produkujících bakteriociny na různé kmeny *Listeria monocytogenes*. Studie probíhala tak, že kmeny *Listeria monocytogenes* byly vykultivovány v bujónu s mozkosrdcovou infúzí, a bakterie mléčného kvašení na tuhých půdách specifických pro každý použitý rod (MRS nebo Tween). Následně byly na povrch agarů s mozkosrdcovou infúzí nanášeny kultury bakterií mléčného kvašení v množství 1 – 3 μl a inkubovány při 30 °C, dokud nebyl viditelný dostatečný nárůst. Tyto plotny byly pak převrstveny agarem naočkovaným 8 μl kultury *Listeria monocytogenes*. Po inkubaci při 37 °C byly zkoumány vytvořené inhibiční zóny růstu. Na Obr. 13 můžeme vidět, že inhibiční zóny se vytvořily s kmenem *Pediococcus pentosaceus* FBB61-1 (1), *Lactococcus lactis* ATCC 11454 (3) a *Lactococcus lactis* SIK-83 (4), bez inhibičních zón je naopak test s kmenem *Pediococcus pentosaceus* FBB61-2 (2) a *Lactobacillus plantarum* C-11 (5) [16].



Obr. 13. Inhibiční aktivita bakterií mléčného kvašení na růst *Listeria monocytogenes* [16].

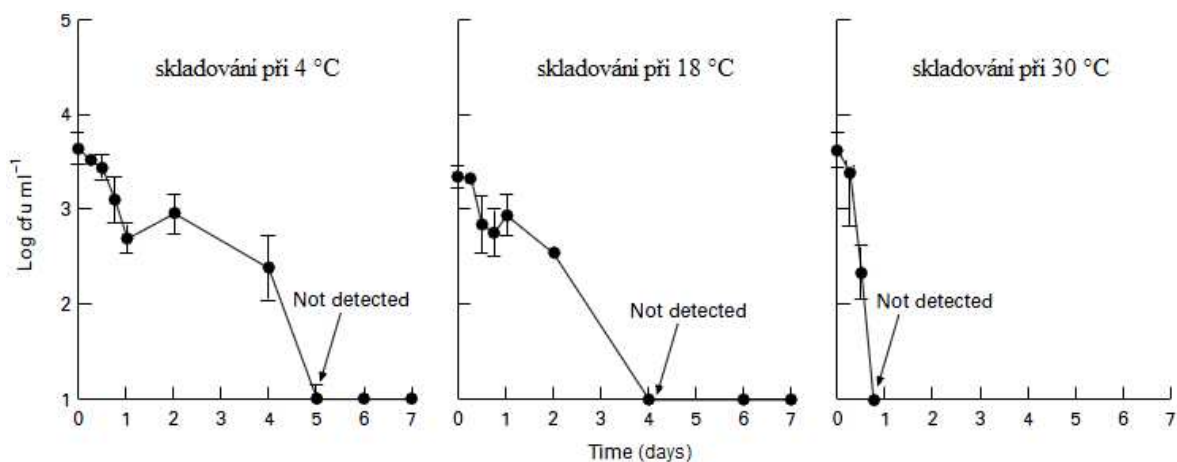
Druhá se zabývala inhibicí *Listeria monocytogenes* v sýru Camembert pomocí starterů produkujících nisin – *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Byly testovány 3 dávky Camembertu s různým datem výroby a různými počátečními kontaminacemi mléka (kontaminace *Listeria monocytogenes* $10^1/\text{ml}$ a $10^3/\text{ml}$ a $10^5/\text{ml}$). Z každé takto připravené dávky byly odebrány vzorky v době inokulace starteru do mléka a pak po 3, 6, 9 a 24 hodinách po inokulaci, a byl stanoven počet *Listeria monocytogenes*, počet bakterií *Lactococcus*, pH a koncentrace nisinu. Počet *Lactococcus lactis* a koncentrace nisinu se vyvíjely téměř paralelně (Obr. 14). V přítomnosti nisinu počet *Listeria monocytogenes* rapidně klesal mezi 6. a 24. hodinou po inokulaci, a v jádře sýru inhibiční efekt dále pokračoval až do konce druhého týdne zrání. Poté ale došlo k obnovení růstu *Listeria monocytogenes*, nejprve na povrchu Camembertu, poté i uvnitř (Obr. 15) [26]. Jelikož produkty bakterií mléčného kvašení – tedy i nisin – při svém působení potraviny okyselují, je na Obr. 15 vidět také vzestup pH korelující se snižujícím se počtem *Lactococcus lactis* a koncentrací nisinu.

Obr. 14. Vývoj počtu *Lactococcus lactis* a koncentrace nisinu [26].Obr. 15. Vývoj počtu *Listeria monocytogenes* a hodnoty pH [26].

Stejnou tématikou – působením nisinu v sýru Camembert – se zabývala i třetí studie. Zde byly testovány možnosti inhibice *Listeria monocytogenes* při použití nisin produkujícího kmene *Lactococcus lactis* jako starteru samostatně nebo v kombinaci s jinou kulturou. Ukázalo se, že pokud byl do mléka aplikován kmen *Lactococcus lactis* společně s jinou startovací kulturou, inhibice růstu se neprojevila, ale pokud byl kmen *Lactococcus lactis* použit jako jediný starter, růst *Listeria monocytogenes* byl zcela potlačen [42].

Ve čtvrté byla vyšetřována inhibice *Listeria monocytogenes* v sýru cottage lacticinemem – bakteriocinem produkovaným bakteriemi *Lactococcus lactis*. Sýr cottage byl při výrobě naočkován startovací kulturou, následně kontaminován kmenem *Listeria monocytogenes* v množství 10^4 /ml, uložen při různých skladovacích teplotách (4 °C, 18 °C a 30 °C) a byl zkoumán ochranný účinek lacticinu. Bylo prokázáno, že lacticin opravdu snižuje počet přítomných *Listeria monocytogenes* poměrně krátkou dobu po inokulaci, a to nejrychleji

při teplotě 30 °C, nejméně při teplotě 4 °C (Obr. 16). Tato studie ukázala, že lacticin je efektivním ochranným prostředkem proti růstu *Listeria monocytogenes* [27]. Současně se potvrdilo i to, že 30 °C je optimální teplotou pro mezofilní mlékařské kultury.



Obr. 16. Inhibiční účinek lacticinu při různých teplotách skladování sýru cottage [27].

Pátá z nich pak poukazyvala na inhibiční účinek enterocinu na *Listeria monocytogenes* v sýru Manchego. Při výrobě bylo syrové ovčí mléko inokulováno *Listeria monocytogenes* v množství 10^5 /ml a komerční startovací kulturou nebo kulturou *Enterococcus faecalis* nebo jejich kombinací. V sýru inokulovaném pouze *Enterococcus faecalis* nebo oběma kulturami došlo ke snížení počtu *Listeria monocytogenes* už po 8 hodinách, po 7 dnech dokonce několikanásobně, zatímco v sýru inokulovaném jen komerční kulturou nedošlo k inhibici růstu tohoto kmene ani po 60 dnech [30].

V experimentální části diplomové práce byly použity následující bioprotektory:

Fargo 37 – obsahuje kulturu *Pediococcus acidilactici*. Tento bioprotektor snižuje množství *Listeria monocytogenes* a dalších nežádoucích mikroorganismů, a lze jej využít pro tepelně opracované i neopracované masné výrobky, mléčné výrobky, dresinky, omáčky apod. [1].

Defender – obsahuje organické kyseliny, peptidy a další látky vzniklé při fermentaci. Je vhodný do tepelně opracovaných i neopracovaných výrobků, salátů, ryb, mléčných výrobků, jeho účinek spočívá v zabránění růstu nežádoucích mikroorganismů v extrémně náchylných výrobcích [1].

Enterococcus faecium S – obsahuje kulturu bakterie *Enterococcus faecium*. V podstatě jde o doplňkovou sýrařskou kulturu určenou pro přímé očkování při výrobě sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou, případně ji lze využít i jako probiotickou aplikaci do fermentovaných výrobků a krmiv [19].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

V experimentu jsme jako materiál použili kyselý zrající sýr a 8 bioprotektivních přípravků, jež měly bránit růstu inokulovaných bakterií *Listeria monocytogenes*. Pro účely diplomové práce jsou použité bioprotektory označeny A až H.

Použitý biologický materiál

- průmyslový tvaroh
- mlékařské kultury *Brevibacterium linens* a *Candida valida*
- bioprotektivní přípravky – tři různé bioprotektory, jejich různé výrobní šarže (Fargo 37 šarže L37/220611, Defender šarže L30/250711, Fargo 37 šarže L37/260711, Fargo 37 šarže L37/031011, Defender neznámé šarže, Enterococcus faecium S neznámé šarže), zakódovány písmenem abecedy pro zachování anonymity bioprotektorů a objektivnosti zkoušek během zpracování v laboratoři. Byly použity bioprotektory s bakteriostatickým účinkem, jejichž úkolem je zastavení růstu a množení bakterií *Listeria monocytogenes* během zrání sýrů (neničí ale bakterie zcela, to by šlo o účinek baktericidní). Při výrobě jsou přidávány v určitém množství do směsi polotovaru výrobku.
 - Defender – obsahuje organické kyseliny, peptidy a látky vzniklé při fermentaci
 - Enterococcus faecium S – obsahuje kulturu *Enterococcus faecium*
 - Fargo 37 – obsahuje kulturu *Pediococcus acidilactici*
- suspenze terénního kmene *Listeria monocytogenes* 1/2a (tzn. kmene izolovaného z provozu zadavatele zkoušek) – kontaminace připravených polotovarů
- kultivační půdy – tekuté i tuhé – kultivace vzorků
 - poloviční bujón podle Frasera – selektivní půda složená ze základu půdy (tj. masový pepton, trypton, masový extrakt, kvasničný extrakt, NaCl, Na₂HPO₄·2H₂O, KH₂PO₄, eskulin a voda), roztoku chloridu lithného, roztoku sodné soli kyseliny nalidixové, roztoku hydrochloridu akriflavinu a roztoku citranu železitoamonného (Obr. 17)
 - celý bujón podle Frasera – selektivní půda složená ze základu půdy (masový pepton, trypton, masový extrakt, kvasničný extrakt, NaCl, Na₂HPO₄·2H₂O, KH₂PO₄, eskulin, chlorid lithný, sodná sůl kyseliny nalidixové a voda), roztoku hydrochloridu akriflavinu a roztoku citranu železitoamonného (Obr. 17)



poloviční bujón podle Frasera



celý bujón podle Frasera

Obr. 17. Poloviční a celý bujón podle Frasera.

- agar ALOA – tuhá selektivní půda, která se skládá ze základu půdy (masový pepton, trypton, kvasničný extrakt, pyruvát sodný, glukóza, glycerolfosforečnan hořečnatý, síran hořečnatý, NaCl, chlorid lithný, Na₂HPO₄, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-gluko-pyranosid, agar a voda), roztoku kyseliny nalidixové, roztoku ceftazidimu, roztoku polymyxinu B, suplementu s antibiotikem a dalšího suplementu
- agar RLM – tuhá selektivní půda složená ze základu půdy (masový pepton, masový extrakt, kvasničný extrakt, chlorid lithný, fenolová červeň, agar a chromogenní roztok), suplementu 1 (xylóza) a suplementu 2

Použité pomůcky

- nerezová nádoba (nerezový hrnec) – míchání výchozích surovin
- sterilní nerezové nástroje – míchání surovin, navážka vzorků
- Petriho misky – formování vzorků, mikrobiologické vyšetření
- plastové bedny – uchovávání vzorků v termostatu a v lednici
- plastové jednorázové sáčky Dilubag – navážka vzorku
- Dilumat – automatické 10ti-násobné naředění navážky vzorku
- Stomacher – homogenizace vzorku ⇒ výchozí suspenze
- pipetovací nástavec a skleněné pipety o objemu 1 ml – zpracování vzorku
- plastové jednorázové hokejky – roztěr inokula po povrchu tuhých kultivačních půd
- plastové jednorázové kličky – vyočkování
- termostaty – inkubace zpracovaných vzorků
- lednice – teplota 2 – 8 °C – uchovávání vzorků

4.2 Metodika

Odběr vzorků si zajišťoval zadavatel zkoušek sám ve výrobním podniku.

Po doručení vzorků do laboratoře a zaevidování do „Knihy vzorků“ následovala příprava vzorků k mikrobiologickému zpracování.

První krok každého experimentu spočíval v přípravě vlastních vzorků zrajícího sýru. Vzorky byly do laboratoře dodány buďto v podobě naformovaného polotovaru, nebo jako jednotlivé suroviny, přičemž byl finální polotovar připravován podle přiloženého pracovního návodu. V případě jednotlivých surovin po jejich smíchání byl vzniklý polotovar pomocí lžičky pěchován do předem připravených Petriho misek po 20 g vzorku.

Pro ověřovací studie účinnosti bioprotektivních přípravků byly zvoleny dvě koncentrace mikroorganismů *Listeria monocytogenes*: 100 KTJ/20 g vzorku a 10 000 KTJ/20 g vzorku (v případě studie bioprotektorů D a E byla použita jen koncentrace 100 KTJ/20 g vzorku). Tyto suspenze byly inokulovány v objemu 50 µl na střed horního povrchu vzorku zrajícího sýru. Jednotlivě uložené vzorky v Petriho miskách byly umístěny do termostatu s teplotou 32 °C. Po 72 hodinách inkubace byly vzorky přemístěny do chladničky a dále skladovány při teplotě 8 °C [19].

Poté následovalo vlastní mikrobiologické vyšetření.

Kvalitativní i kvantitativní stanovení *Listeria monocytogenes* bylo prováděno nultý (tj. před umístěním do chladničky), první, druhý, třetí, čtvrtý a pátý týden od vložení do chladničky [19]. V případě bioprotektorů F, G a H byla studie zkrácena jen do čtvrtého týdne.

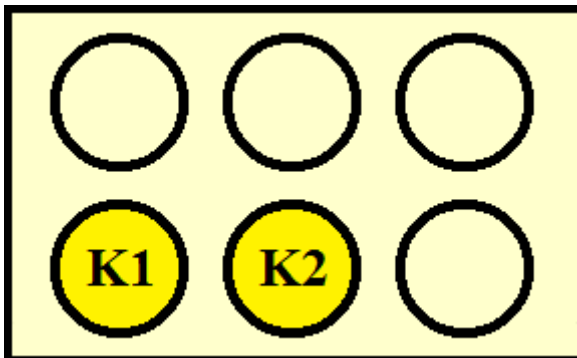
Pro účely experimentu bylo vyšetření průkazu prováděno z navážky 20 g, tedy z celého obsahu Petriho misek. Stanovení počtu bylo prováděno rovněž z navážky 20 g. Obě vyšetření se prováděla ze vzorků kontaminovaných nižší i vyšší koncentrací *Listeria monocytogenes*. Vyšetření probíhala podle ČSN EN ISO 11290-1 a ČSN EN ISO 11290-2 [19]. Stanovení průkazu *Listeria monocytogenes* → spotřeba 1 vzorek → vyočkování na ALOA a RLM. Stanovení počtu *Listeria monocytogenes* → spotřeba 2 vzorky → 1x roztěr 1 ml inokula na 3 misky ALOA a 1x roztěr 1 ml inokula na 3 misky RLM (Obr. 18).

Souběžně s vyšetřovanými vzorky sýru kontaminovanými *Listeria monocytogenes* se vyšetřovaly i vzorky bez kontaminace, které byly skladovány za stejných podmínek [19]. Vyšetření těchto kontrolních vzorků sloužilo jako kontrola falešně pozitivních výsledků.

Vždy se hodnotil růst anebo inhibice bakterií, a stanovení počtu suspektních *Listeria monocytogenes* [19].

Kolonie suspektní jako *Listeria monocytogenes* byly potvrzeny metodou PCR (metodika PCR není součástí diplomové práce).

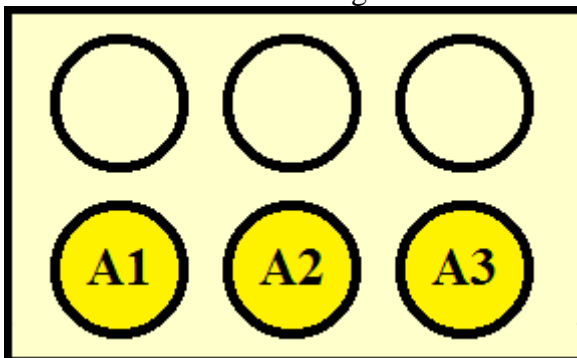
Kontrola bez kontaminace



K1 – kontrolní vzorek vyšetřený na průkaz *Listeria monocytogenes*

K2 – kontrolní vzorek vyšetřený na počet *Listeria monocytogenes* (ALOA + RLM)

Kontaminace 100 KTJ/20g

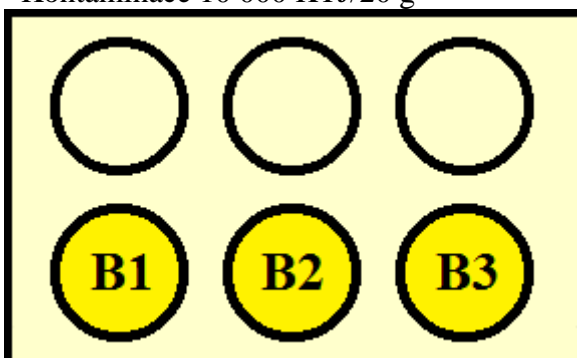


A1 – kontaminovaný vzorek vyšetřený na průkaz *Listeria monocytogenes*

A2 – kontaminovaný vzorek vyšetřený na počet *Listeria monocytogenes* (ALOA)

A3 – kontaminovaný vzorek vyšetřený na počet *Listeria monocytogenes* (RLM)

Kontaminace 10 000 KTJ/20 g



B1 – kontaminovaný vzorek vyšetřený na průkaz *Listeria monocytogenes*

B2 – kontaminovaný vzorek vyšetřený na počet *Listeria monocytogenes* (ALOA)

B3 – kontaminovaný vzorek vyšetřený na počet *Listeria monocytogenes* (RLM)

Obr. 18. Schéma postupu vyšetřování vzorků polotovaru zrajícího sýru.

Kvalitativní stanovení – stanovení průkazu *Listeria monocytogenes*

Podstata zkoušky vyžaduje čtyři po sobě následujících stupně [8, 11, 19]:

- 1) primární pomnožení v tekuté selektivní půdě, tzv. polovičním bujónu podle Frasera → 25 g zkušebního vzorku se inokuluje do 9ti-násobného množství (tzn. 225 ml) polovičního bujónu podle Frasera, a inkubuje se při 30 °C po dobu 24 hodin; v průběhu inkubace může dojít k vytvoření černého zbarvení způsobeného hydrolýzou eskulinu
- 2) sekundární pomnožení v tekuté selektivní půdě, tzv. celém bujónu podle Frasera → 0,1 ml získané kultury se inokuluje do 10 ml celého bujónu podle Frasera, a inkubuje se při 37 °C po dobu 48 hodin; v průběhu inkubace opět může dojít k vytvoření černého zbarvení, které je způsobeno hydrolýzou eskulinu
- 3) vyočkování a identifikace → vyočkování na dvě tuhé selektivní půdy ALOA a RLM, následuje inkubace při 37 °C 48 hodin; po inkubaci se zjišťuje přítomnost charakteristických kolonií suspektních jako *Listeria monocytogenes*
- 4) konfirmace → suspektní kolonie se konfirmují metodou PCR

Kvantitativní stanovení – stanovení počtu *Listeria monocytogenes*

Podstata zkoušky spočívá v šesti po sobě jdoucích krocích [8, 12, 19]:

- 1) příprava výchozí suspenze → 10 g zkušebního vzorku se inokuluje do 9ti-násobného množství (tzn. 90 ml) polovičního bujónu podle Frasera
- 2) resuscitace při 20 °C po dobu 1 hodiny → resuscitace subletálně poškozených bakterií
- 3) inokulace určeného objemu výchozí suspenze na tuhé selektivní půdy → 1 ml suspenze se rozdělí na 3 Petriho misky (tzn. cca 0,33 ml na 1 plotnu), přičemž se opět používají dvě různé tuhé selektivní půdy ALOA a RLM; inokulum se rozetře sterilní roztírací hokejkou a nechá se alespoň 15 minut zaschnout
- 4) inkubace naočkovaných ploten při 37 °C po dobu 24 – 48 hodin → po inkubaci se zjišťuje přítomnost charakteristických kolonií
- 5) konfirmace → metodou PCR
- 6) vyhodnocení → výpočtem se stanoví počet *Listeria monocytogenes* v 1 ml nebo v 1 g vzorku podle vzorců:

- výpočet počtu kolonií *Listeria monocytogenes*: $a = \frac{b}{A} \cdot C$
 - bpočet kolonií confirmovaných jako *Listeria monocytogenes*
 - Apočet kolonií pro confirmaci vybraných
 - Ccelkový počet kolonií suspektních jako kolonie bakterií rodu *Listeria*
- metoda výpočtu: $N = \frac{\Sigma a}{V \cdot (n_1 + 0,1 n_2) \cdot d}$
 - Σa součet počtu kolonií stanovených výpočtem po confirmaci ze všech ploten vybraných pro výpočet ze dvou po sobě následujících ředění, přičemž nejméně jedna z ploten obsahovala 15 suspektních kolonií
 - Vobjem inokula v ml očkovaného na každou z ploten
 - n_1 počet ploten vybraných k výpočtu z prvního zvoleného ředění
 - n_2 počet ploten vybraných k výpočtu z druhého zvoleného ředění
 - dfaktor ředění odpovídající prvnímu pro výpočet zvolenému ředění
- odhad nízkých počtů – méně než 15 kolonií: $N_E = \frac{y}{V \cdot d}$
 - yaritmetický průměr počtu kolonií získaných výpočtem počtu kolonií po confirmaci (tzn. podle první rovnice) pro každou z ploten
 - Vobjem inokula v ml očkovaného na každou z ploten
 - dfaktor ředění výchozí suspenze
- odhad nízkých počtů – žádné kolonie: $N_E = \frac{<1}{V \cdot d}$
 - Vobjem inokula v ml očkovaného na každou z ploten
 - dfaktor ředění výchozí suspenze

5 VÝSLEDKY

5.1 Bioprotektivní přípravek A

Bioprotektor A: Fargo 37, šarže L37/220611, datum výroby 22/06/2011, DMT 2012/04/30.

Složení polotovaru vzorku: směs tvarohu, regulátory kyselosti, jedlá sůl, mlékařské kultury, bioprotektor A v množství 2 g/1 kg směsi tvarohu, demineralizovaná a pitná voda.

Tab. 6 a 7. Výsledky experimentu s bioprotektorem A.

*Tab. 6.
(průběžné výsledky)*

	Kontaminace 100 KTJ/20 g				Kontaminace 10 000 KTJ/20 g			
	Průkaz LM (navážka 20 g)		Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]		Průkaz LM (navážka 20 g)		Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]	
	ALOA	RLM	ALOA	RLM	ALOA	RLM	ALOA	RLM
0. týden v chladničce	poz.	poz.	110 112 98	85 65 61	poz.	poz.	260 200 180	220 190 180
1. týden v chladničce	poz.	poz.	400 320 440	320 280 240	poz.	poz.	600 560 800	650 800 500
2. týden v chladničce	poz.	poz.	900 1 200 1 800	1 800 1 600 1 800	poz.	poz.	3 600 4 800 3 200	1 600 1 800 2 000
3. týden v chladničce	poz.	poz.	2 800 4 000 4 400	2 000 4 000 3 600	poz.	poz.	2 400 4 800 6 000	4 800 6 000 6 200
4. týden v chladničce	poz.	poz.	6 000 4 000 4 800	6 400 6 000 7 200	poz.	poz.	12 000 8 000 9 200	9 600 10 000 12 000
5. týden v chladničce	poz.	poz.	8 200 7 200 8 300	12 000 4 800 6 400	poz.	poz.	8 200 8 000 14 000	8 000 14 000 16 000

*Tab. 7.
(konečné výsledky)*

	Kontaminace 100 KTJ/20 g		Kontaminace 10 000 KTJ/20 g	
	Průkaz LM (navážka 20 g)	Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]	Průkaz LM (navážka 20 g)	Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]
0. týden v chladničce	pozitivní	2 700	pozitivní	6 200
1. týden v chladničce	pozitivní	10 000	pozitivní	20 000
2. týden v chladničce	pozitivní	46 000	pozitivní	85 000
3. týden v chladničce	pozitivní	104 000	pozitivní	150 000
4. týden v chladničce	pozitivní	172 000	pozitivní	304 000
5. týden v chladničce	pozitivní	235 000	pozitivní	340 000

Vyšetření kontrolních vzorků (tj. vzorků bez kontaminace) bylo metodou průkazu negativní a metodou stanovení počtu jsme získali výsledek < 10 KTJ/g.

Závěrečné hodnocení: Nepodařilo se prokázat bakteriostatický účinek bioprotektivního přípravku A na kmen *Listeria monocytogenes*. [19 – celá kapitola 5.1]

5.2 Bioprotektivní přípravek B

Bioprotektor B: Defender, šarže L30/250711, DMT 03/2012.

Složení polotovaru vzorku: směs tvarohu, regulátory kyselosti, jedlá sůl, mlékařské kultury, bioprotektor B v množství 2 g/1 kg směsi tvarohu, demineralizovaná a pitná voda.

Tab. 8 a 9. Výsledky experimentu s bioprotektorem B.

Tab. 8.
(průběžné výsledky)

	Kontaminace 100 KTJ/20 g				Kontaminace 10 000 KTJ/20 g			
	Průkaz LM (navážka 20 g)		Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]		Průkaz LM (navážka 20 g)		Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]	
	ALOA	RLM	ALOA	RLM	ALOA	RLM	ALOA	RLM
0. týden v chladničce	poz.	poz.	320 260 240	400 200 380	poz.	poz.	240 320 400	600 550 650
1. týden v chladničce	poz.	poz.	1 000 800 880	2 000 900 1 600	poz.	poz.	1 600 2 000 1 800	2 600 2 000 3 000
2. týden v chladničce	poz.	poz.	1 000 1 200 1 600	3 000 3 500 3 200	poz.	poz.	5 600 4 000 6 000	4 800 2 800 6 000
3. týden v chladničce	poz.	poz.	4 800 12 000 11 000	6 000 6 400 4 800	poz.	poz.	12 000 16 000 14 000	16 000 18 000 20 000
4. týden v chladničce	poz.	poz.	3 200 4 000 10 000	8 000 12 000 10 000	poz.	poz.	18 000 22 000 10 000	16 000 20 000 14 000
5. týden v chladničce	poz.	poz.	12 000 16 000 18 000	10 000 12 000 16 000	poz.	poz.	20 000 25 000 30 000	20 000 25 000 28 000

Tab. 9.
(konečné výsledky)

	Kontaminace 100 KTJ/20 g		Kontaminace 10 000 KTJ/20 g	
	Průkaz LM (navážka 20 g)	Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]	Průkaz LM (navážka 20 g)	Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]
0. týden v chladničce	pozitivní	9 000	pozitivní	14 000
1. týden v chladničce	pozitivní	36 000	pozitivní	65 000
2. týden v chladničce	pozitivní	68 000	pozitivní	145 000
3. týden v chladničce	pozitivní	230 000	pozitivní	480 000
4. týden v chladničce	pozitivní	240 000	pozitivní	500 000
5. týden v chladničce	pozitivní	420 000	pozitivní	740 000

Vyšetření kontrolních vzorků (tj. vzorků bez kontaminace) bylo metodou průkazu negativní a metodou stanovení počtu jsme získali výsledek < 10 KTJ/g.

Závěrečné hodnocení: Nepodařilo se prokázat bakteriostatický účinek bioprotektivního přípravku B na kmen *Listeria monocytogenes*. [19 – celá kapitola 5.2]

5.3 Bioprotektivní přípravek C

Bioprotektor C: Fargo 37, šarže L37/260711, datum výroby 26/07/2011, DMT 2012/04/30.

Složení polotovaru vzorku: směs tvarohu, regulátory kyselosti, jedlá sůl, mlékařské kultury, bioprotektor C v množství 10 g/1 kg směsi tvarohu, demineralizovaná a pitná voda.

Tab. 10 a 11. Výsledky experimentu s bioprotektorem C.

Tab. 10.
(průběžné výsledky)

	Kontaminace 100 KTJ/20 g				Kontaminace 10 000 KTJ/20 g			
	Průkaz LM (navážka 20 g)		Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]		Průkaz LM (navážka 20 g)		Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]	
	ALOA	RLM	ALOA	RLM	ALOA	RLM	ALOA	RLM
0. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0	poz.	poz.	0, 2, 2	7, 5, 14
1. týden v chladničce	poz.	poz.	0, 0, 0	0, 0, 0	poz.	poz.	25 15 20	11 16 22
2. týden v chladničce	poz.	poz.	0, 0, 0	0, 0, 0	poz.	poz.	400 320 240	600 800 600
3. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0	poz.	poz.	1 200 820 1 120	200 60 190
4. týden v chladničce	poz.	poz.	3, 0, 5	0, 0, 0	poz.	poz.	1 500 1 440 150	480 300 820
5. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	1, 0, 0	poz.	poz.	140 210 400	2 000 2 400 4 000

Tab. 11.
(konečné výsledky)

	Kontaminace 100 KTJ/20 g		Kontaminace 10 000 KTJ/20 g	
	Průkaz LM (navážka 20 g)	Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]	Průkaz LM (navážka 20 g)	Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]
0. týden v chladničce	negativní	< 10	pozitivní	150
1. týden v chladničce	pozitivní	< 10	pozitivní	550
2. týden v chladničce	pozitivní	< 10	pozitivní	15 000
3. týden v chladničce	negativní	< 10	pozitivní	18 000
4. týden v chladničce	pozitivní	40	pozitivní	23 500
5. týden v chladničce	negativní	< 10	pozitivní	46 000

Vyšetření kontrolních vzorků (tj. vzorků bez kontaminace) bylo metodou průkazu negativní a metodou stanovení počtu jsme získali výsledek < 10 KTJ/g.

Závěrečné hodnocení: Podařilo se prokázat bakteriostatický účinek bioprotektivního přípravku C na kmen *Listeria monocytogenes*. V koncentraci kontaminace 100 KTJ/20 g vzorku byl zjištěn počet *Listeria monocytogenes* pod limit Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005. V koncentraci kontaminace 10 000 KTJ/20 g vzorku bioprotektor nesnížil počet *Listeria monocytogenes* pod limit Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 při skladování do konce doby trvanlivosti. [19 – celá kapitola 5.3]

5.4 Bioprotektivní přípravek D

Bioprotektor D: Fargo 37, šarže L37/031011, datum výroby 03/10/2011, DMT 2012/04/30.

Složení polotovaru vzorku: směs tvarohu, regulátory kyselosti, jedlá sůl, mlékařské kultury, bioprotektor D v množství 2 g/1 kg směsi tvarohu, demineralizovaná a pitná voda.

Tab. 12 a 13. Výsledky experimentu s bioprotektorem D.

Tab. 12.
(průběžné výsledky)

	Kontaminace 100 KTJ/20 g			
	Průkaz LM (navážka 20 g)		Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]	
	ALOA	RLM	ALOA	RLM
0. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0
1. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0
2. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0
3. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0
4. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0
5. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0

Tab. 13.
(konečné výsledky)

	Kontaminace 100 KTJ/20 g	
	Průkaz LM (navážka 20 g)	Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]
0. týden v chladničce	negativní	< 10
1. týden v chladničce	negativní	< 10
2. týden v chladničce	negativní	< 10
3. týden v chladničce	negativní	< 10
4. týden v chladničce	negativní	< 10
5. týden v chladničce	negativní	< 10

Vyšetření kontrolních vzorků (tj. vzorků bez kontaminace) bylo metodou průkazu negativní a metodou stanovení počtu jsme získali výsledek < 10 KTJ/g.

Závěrečné hodnocení: Podařilo se prokázat bakteriostatický účinek bioprotektivního přípravku D na kmen *Listeria monocytogenes*. [19 – celá kapitola 5.4]

5.5 Bioprotektivní přípravek E

Bioprotektor E: Fargo 37, šarže L37/031011, datum výroby 03/10/2011, DMT 2012/04/30.

Složení polotovaru vzorku: směs tvarohu, regulátory kyselosti, jedlá sůl, mlékařské kultury, bioprotektor E v množství 5 g/1 kg směsi tvarohu, demineralizovaná a pitná voda.

Tab. 14 a 15. Výsledky experimentu s bioprotektorem E.

Tab. 14.
(průběžné výsledky)

	Kontaminace 100 KTJ/20 g			
	Průkaz LM (navážka 20 g)		Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]	
	ALOA	RLM	ALOA	RLM
0. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0
1. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0
2. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0
3. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0
4. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0
5. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0

Tab. 15.
(konečné výsledky)

	Kontaminace 100 KTJ/20 g	
	Průkaz LM (navážka 20 g)	Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]
0. týden v chladničce	negativní	< 10
1. týden v chladničce	negativní	< 10
2. týden v chladničce	negativní	< 10
3. týden v chladničce	negativní	< 10
4. týden v chladničce	negativní	< 10
5. týden v chladničce	negativní	< 10

Vyšetření kontrolních vzorků (tj. vzorků bez kontaminace) bylo metodou průkazu negativní a metodou stanovení počtu jsme získali výsledek < 10 KTJ/g.

Závěrečné hodnocení: Podařilo se prokázat bakteriostatický účinek bioprotektivního přípravku E na kmen *Listeria monocytogenes*. [19 – celá kapitola 5.5]

5.6 Bioprotektivní přípravek F

Bioprotektor F: Defender (další údaje nezjištěny)

Složení polotovaru vzorku: směs tvarohu, regulátory kyselosti, jedlá sůl, mlékařské kultury, bioprotektor F v množství 2 g/1 kg směsi tvarohu, demineralizovaná a pitná voda.

Tab. 16 a 17. Výsledky experimentu s bioprotektorem F.

Tab. 16.
(průběžné výsledky)

	Kontaminace 100 KTJ/20 g				Kontaminace 10 000 KTJ/20 g			
	Průkaz LM (navážka 20 g)		Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]		Průkaz LM (navážka 20 g)		Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]	
	ALOA	RLM	ALOA	RLM	ALOA	RLM	ALOA	RLM
0. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0
1. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0	neg.	neg.	0, 2, 0	0, 0, 2
2. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0
3. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0	poz.	poz.	0, 0, 0	0, 0, 0
4. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0	poz.	poz.	9, 9, 5	6, 8, 9

Tab. 17.
(konečné výsledky)

	Kontaminace 100 KTJ/20 g		Kontaminace 10 000 KTJ/20 g	
	Průkaz LM (navážka 20 g)	Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]	Průkaz LM (navážka 20 g)	Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]
0. týden v chladničce	negativní	< 10	negativní	< 10
1. týden v chladničce	negativní	< 10	negativní	20
2. týden v chladničce	negativní	< 10	negativní	< 10
3. týden v chladničce	negativní	< 10	pozitivní	< 10
4. týden v chladničce	negativní	< 10	pozitivní	230

Vyšetření kontrolních vzorků (tj. vzorků bez kontaminace) bylo metodou průkazu negativní a metodou stanovení počtu jsme získali výsledek < 10 KTJ/g.

Závěrečné hodnocení: Podařilo se prokázat bakteriostatický účinek bioprotektivního přípravku F na kmen *Listeria monocytogenes*. V koncentraci kontaminace 100 KTJ/20 g vzorku byl zjištěn počet *Listeria monocytogenes* pod limit Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005. V koncentraci kontaminace 10 000 KTJ/20 g vzorku bioprotektor nesnížil počet *Listeria monocytogenes* pod limit Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 při skladování do konce doby trvanlivosti. [19 – celá kapitola 5.6]

5.7 Bioprotektivní přípravek G

Bioprotektor G: Defender (další údaje nezjištěny)

Složení polotovaru vzorku: směs tvarohu, regulátory kyselosti, jedlá sůl, mlékařské kultury, bioprotektor G v množství 5 g/1 kg směsi tvarohu, demineralizovaná a pitná voda.

Tab. 18 a 19. Výsledky experimentu s bioprotektorem G.

Tab. 18.
(průběžné výsledky)

	Kontaminace 100 KTJ/20 g				Kontaminace 10 000 KTJ/20 g			
	Průkaz LM (navážka 20 g)		Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]		Průkaz LM (navážka 20 g)		Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]	
	ALOA	RLM	ALOA	RLM	ALOA	RLM	ALOA	RLM
0. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0	poz.	poz.	0, 0, 0	0, 0, 0
1. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0
2. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0
3. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0	poz.	poz.	110 150 160	210 250 200
4. týden v chladničce	neg.	neg.	0, 0, 0	0, 0, 0	poz.	poz.	0, 0, 0	0, 0, 0

Tab. 19.
(konečné výsledky)

	Kontaminace 100 KTJ/20 g		Kontaminace 10 000 KTJ/20 g	
	Průkaz LM (navážka 20 g)	Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]	Průkaz LM (navážka 20 g)	Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]
0. týden v chladničce	negativní	< 10	pozitivní	< 10
1. týden v chladničce	negativní	< 10	negativní	< 10
2. týden v chladničce	negativní	< 10	negativní	< 10
3. týden v chladničce	negativní	< 10	pozitivní	5 400
4. týden v chladničce	negativní	< 10	pozitivní	< 10

Vyšetření kontrolních vzorků (tj. vzorků bez kontaminace) bylo metodou průkazu negativní a metodou stanovení počtu jsme získali výsledek < 10 KTJ/g.

Závěrečné hodnocení: Podařilo se prokázat bakteriostatický účinek bioprotektivního přípravku G na kmen *Listeria monocytogenes*. V koncentraci kontaminace 100 KTJ/20 g vzorku byl zjištěn počet *Listeria monocytogenes* pod limit Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005. V koncentraci kontaminace 10 000 KTJ/20 g vzorku bioprotektor nesnížil počet *Listeria monocytogenes* pod limit Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 při skladování do konce doby trvanlivosti. [19 – celá kapitola 5.7]

5.8 Bioprotektivní přípravek H

Bioprotektor H: *Enterococcus faecium* S (další údaje nezjištěny)

Složení polotovaru vzorku: směs tvarohu, regulátory kyselosti, jedlá sůl, mlékařské kultury, bioprotektor H v množství 1 g/100 kg směsi tvarohu, demineralizovaná a pitná voda.

Tab. 20 a 21. Výsledky experimentu s bioprotektorem H.

Tab. 20.
(průběžné výsledky)

	Kontaminace 100 KTJ/20 g				Kontaminace 10 000 KTJ/20 g			
	Průkaz LM (navážka 20 g)		Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]		Průkaz LM (navážka 20 g)		Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]	
	ALOA	RLM	ALOA	RLM	ALOA	RLM	ALOA	RLM
0. týden v chladničce	poz.	poz.	100 70 85	90 75 100	poz.	poz.	1 600 1 800 2 000	2 000 1 500 1 900
1. týden v chladničce	poz.	poz.	70 60 70	60 80 50	poz.	poz.	> 2 500 > 2 500 > 2 500	> 2 500 > 2 500 > 2 500
2. týden v chladničce	poz.	poz.	0, 0, 0	0, 0, 0	poz.	poz.	> 2 500 > 2 500 > 2 500	> 2 500 > 2 500 > 2 500
3. týden v chladničce	poz.	poz.	0, 0, 0	0, 0, 0	poz.	poz.	> 2 500 > 2 500 > 2 500	> 2 500 > 2 500 > 2 500
4. týden v chladničce	poz.	poz.	0, 0, 0	0, 0, 0	poz.	poz.	> 2 500 > 2 500 > 2 500	> 2 500 > 2 500 > 2 500

Tab. 21.
(konečné výsledky)

	Kontaminace 100 KTJ/20 g		Kontaminace 10 000 KTJ/20 g	
	Průkaz LM (navážka 20 g)	Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]	Průkaz LM (navážka 20 g)	Počet LM (navážka 20 g) [KTJ/g]
0. týden v chladničce	pozitivní	2 600	pozitivní	54 000
1. týden v chladničce	pozitivní	1 900	pozitivní	> 75 000
2. týden v chladničce	pozitivní	< 10	pozitivní	> 75 000
3. týden v chladničce	pozitivní	< 10	pozitivní	> 75 000
4. týden v chladničce	pozitivní	< 10	pozitivní	> 75 000

Vyšetření kontrolních vzorků (tj. vzorků bez kontaminace) bylo metodou průkazu negativní a metodou stanovení počtu jsme získali výsledek < 10 KTJ/g.

Závěrečné hodnocení: Podařilo se prokázat bakteriostatický účinek bioprotektivního přípravku H na kmen *Listeria monocytogenes*. V koncentraci kontaminace 100 KTJ/20 g vzorku byl zjištěn počet *Listeria monocytogenes* pod limit Nařízení Komise (ES) č.

2073/2005 od druhého týdne skladování v chladničce. V koncentraci kontaminace 10 000 KTJ/20 g vzorku bioprotektor nesnížil počet *Listeria monocytogenes* pod limit Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 při skladování do konce doby trvanlivosti. [19 – celá kapitola 5.8]

6 DISKUZE

Praktická část diplomové práce je zaměřena na stanovení bakteriostatického účinku bioprotektorů na růst *Listeria monocytogenes* při zrání kyselých zrajících sýrů. Zahrnuje celkem 8 studií s různými typy bioprotektivních přípravků označených A – H. Použity byly bioprotektory Fargo 37 (obsahující kulturu *Pediococcus acidilactici*), Defender (obsahující organické kyseliny, peptidy a látky vznikající při fermentaci) a *Enterococcus faecium* S (obsahující kulturu *Enterococcus faecium*). Vzorky sýrů byly záměrně kontaminovány terénním kmenem *Listeria monocytogenes* 1/2a, a byla zkoumána schopnost bioprotektorů eliminovat růst tohoto kmene.

Bakteriostatický účinek na růst terénního kmene *Listeria monocytogenes* 1/2a nebyl prokázán u bioprotektorů A (Fargo 37) a B (Defender). Naopak bakteriostatický účinek byl prokázán u bioprotektorů C (Fargo 37), D (Fargo 37), E (Fargo 37), F (Defender), G (Defender) a H (*E. faecium* S), přitom ale u žádného z těchto bioprotektorů nebyl prokázán bakteriostatický účinek na obě použité koncentrace kontaminace 100 KTJ/20 g vzorku a 10 000 KTJ/20 g vzorku. V případě bioprotektorů D a E byla použita pouze koncentrace kontaminace 100 KTJ/20 g vzorku, zde byl prokázán bakteriostatický účinek na tuto zvolenou koncentraci kontaminace. U bioprotektorů C, F, G a H byl prokázán bakteriostatický účinek na koncentraci kontaminace 100 KTJ/20 g vzorku pod limit Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005, a při koncentraci kontaminace 10 000 KTJ/20 g vzorku tyto bioprotektory nesnížily počet *Listeria monocytogenes* pod limit Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005.

Otázkou zůstává, proč se u stejného bioprotektoru někdy podařilo a někdy nepodařilo bakteriostatický účinek prokázat? Prvním důvodem může být jiné použité množství při dávkování bioprotektoru do polotovaru vyšetřovaného vzorku sýru – toto ovšem vylučuje srovnání studie s bioprotektorem A a D, kdy byl použit přípravek Fargo 37 v množství 2 g/kg tvarohu, a také srovnání studie s bioprotektorem B a F, kdy byl použit přípravek Defender v množství 2 g/kg tvarohu – v těchto případech vždy u jednoho přípravku účinek prokázán nebyl, ale u druhého přípravku ano. Vysvětlením, a tedy druhým důvodem, může být použití různých šarží těchto bioprotektorů s rozdílným datem výroby a odlišnými laboratorními podmínkami při jejich výrobě – zde jakákoliv odchylka může způsobit i minimální rozdíly ve složení bioprotektorů, které ovšem mohou mít vliv na výsledek ověřování jejich kvality, a tedy ověřování bakteriostatického působení.

V případech, kdy se podařilo prokázat bakteriostatický účinek na *Listeria monocytogenes* v koncentraci kontaminace 100 KTJ/20 g vzorku, ale ne v koncentraci kontaminace 10 000 KTJ/20 g vzorku, lze uvažovat o příliš malém množství použitých bioprotektorů při výrobě kyselých zrajících sýrů. Jako možnost dosažení požadovaných výsledků bych zvolila větší přídavek bioprotektivního přípravku a zopakování experimentu. Jak se ale ukázalo u studie s bioprotektory D a E, kdy jsme použili stejný přípravek Fargo 37, jen v jiném množství (2 g/kg a 5 g/kg), a také u studie s bioprotektory F a G, kdy jsme použili stejný přípravek Defender, opět ale v jiném množství (2 g/kg a 5 g/kg), ani jeden tento přídavek nebyl dostatečný na zastavení růstu *Listeria monocytogenes* ve vyšší zvolené kontaminaci 10 000 KTJ/20 g vzorku, proto by přídavek bioprotektivního přípravku musel být ještě větší než 5 g/1 kg směsi tvarohu.

Studie autorů Harris a kol. (1989) zkoumala antimikrobiální aktivitu vybraných druhů bakterií mléčného kvašení, a je v ní mimo jiné zmíněna i inhibice růstu *Listeria monocytogenes* bakteriocinem (pediocinem), který je produkován bakterií *Pediococcus acidilactici*. Produkce pediocinu je podstatou působení bioprotektivního přípravku Fargo 37. Při srovnání námi získaných výsledků s touto studií se potvrdilo, že kultura *Pediococcus acidilactici* je schopná bránit růstu *Listeria monocytogenes*. Nepodařilo se nám ale určit, jak velký přídavek je nutný při kontaminaci vyšší než 100 KTJ/20 g.

Podobně jako námi dosažené výsledky při použití bioprotektoru *Enterococcus faecium* S, potvrdili účinnost enterocin produkujících starterů také autoři Nuñez a kol. (1997), kteří při svém experimentu použili kulturu *Enterococcus faecalis*. Obě zkoumané kultury rodu *Enterococcus* jsou účinné na potlačení růstu *Listeria monocytogenes* v sýru.

I v ostatních výše uvedených zahraničních studiích byl potvrzen účinek sledovaných bioprotektivních přípravků. Tyto ale byly založeny na jiných způsobech inhibiční aktivity, které se v námi vyšetřovaných sýrech neuplatňovaly, a tedy výsledky nelze porovnávat. Můžeme ale konstatovat alespoň to, že ve studiích autorů Maisnier-Patin a kol. (1992) a autorů Sulzera a Busseho (1991), jež se obě zabývaly inhibicí *Listeria monocytogenes* v sýru Camembert pomocí starterů produkujících nisin, se potvrdila schopnost *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* omezit anebo i zcela potlačit růst *Listeria monocytogenes*. Podobně i jiný kmen *Lactococcus lactis* produkující lacticin je podle výsledků studie autorů McAuliffe a kol. (1999) velmi účinným bioprotektorem, a to i při různých teplotách skladování vyrobeného sýru.

ZÁVĚR

Listeria monocytogenes je potravinu kontaminující patogen, který se běžně vyskytuje i ve vnějším prostředí. Z potravin jsou nejčastěji kontaminovány syrové maso a masné výrobky, ryby, syrové mléko a některé mléčné výrobky, lahůdkářské výrobky nebo zmrzlina. Po požití kontaminované potravin může, ale nemusí dojít ke vzniku alimentárního onemocnění zvaného listerióza, vždy záleží na momentálním zdravotním stavu pacienta a infekční dávce bakterií. U zdravého jedince probíhá listerióza takřka bezpříznakově nebo jen s lehkými chřipkovými příznaky. Jinak je tomu ale u rizikových skupin osob, u nichž může docházet k závažným zdravotním komplikacím, v některých případech dokonce až k úmrtí. Zatímco ve světě bylo zaznamenáno několik epidemií listeriózy, v České republice byla zatím evidována pouze jedna menší epidemie na přelomu let 2006 – 2007. Nejčastěji byly tyto epidemie způsobeny kmeny 1/2a, 1/2b a 4b.

Právě z tohoto důvodu se do potravin v určitém množství přidávají tzv. bioprotektivní přípravky neboli bioprotektory – přírodní bakteriostatické látky, které mimo jiné slouží k potlačení růstu nežádoucích mikroorganismů. Pro tyto účely lze využít jednak některé mikroorganismy (rod *Enterococcus*, rod *Lactobacillus*, rod *Lactococcus*, rod *Leuconostoc*, rod *Pediococcus*), jednak jejich metabolity (nisin, pediocin, enterocin, brevicin, divercin...), a jednak průmyslově vyráběné směsi. Princip jejich působení spočívá nejčastěji v okyselujících vlastnostech.

Evropská legislativa – Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 – dává všem provozovatelům potravinářských podniků za povinnost vyšetřovat *Listeria monocytogenes* ve všech skupinách potravin uvedených v příslušných bodech tohoto nařízení. V České republice navíc upravují vyšetřování *Listeria monocytogenes* i některé další vyhlášky a normy. Laboratorní vyšetření se provádí dle ČSN EN ISO 11290-1 (metoda průkazu) a ČSN EN ISO 11290-2 (metoda stanovení počtu). Ke konfirmaci suspektních kolonií se pak využívají následující metody a biochemické testy: průkaz katalázy, Gramovo barvení, testování pohyblivosti, test k průkazu hemolýzy, využívání cukrů, CAMP test, PCR, PFGE, hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, VIDAS imunodetekce nebo ELISA.

Bakteriostatický účinek na růst kmene *Listeria monocytogenes* nebyl prokázán pouze u dvou z testovaných bioprotektorů, a to u bioprotektorů A a B. Ostatní testované bioprotektory (C, D, E, F, G a H) účinné byly, přičemž ale u žádného z bioprotektorů nebyl

prokázán bakteriostatický účinek na obě použité koncentrace kontaminace 100 KTJ/20 g vzorku a 10 000 KTJ/20 g vzorku. V případě bioprotektorů D a E byla použita pouze koncentrace kontaminace 100 KTJ/20 g vzorku, zde byl prokázán bakteriostatický účinek na tuto zvolenou koncentraci kontaminace. U bioprotektorů C, F, G a H byl prokázán bakteriostatický účinek na koncentraci kontaminace 100 KTJ/20 g vzorku pod limit Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005, a při koncentraci kontaminace 10 000 KTJ/20 g vzorku tyto bioprotektory nesnížily počet *Listeria monocytogenes* pod limit Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005. Přehlednější zhodnocení experimentu je uvedeno v Tab. 22.

Tab. 22. Zhodnocení účinnosti testovaných bioprotektorů.

Testovaný bioprotektivní přípravek	Kontaminace 100 KTJ/20 g	Kontaminace 10 000 KTJ/20 g
bioprotektor A – Fargo 37, dávka 2 g/1 kg	účinek neprokázán	účinek neprokázán
bioprotektor B – Defender, dávka 2 g/1 kg	účinek neprokázán	účinek neprokázán
bioprotektor C – Fargo 37, dávka 10 g/1 kg	účinek prokázán	účinek neprokázán
bioprotektor D – Fargo 37, dávka 2 g/1 kg	účinek prokázán	---
bioprotektor E – Fargo 37, dávka 5 g/1 kg	účinek prokázán	---
bioprotektor F – Defender, dávka 2 g/1 kg	účinek prokázán	účinek neprokázán
bioprotektor G – Defender, dávka 5 g/1 kg	účinek prokázán	účinek neprokázán
bioprotektor H – Enterococcus faecium S, dávka 1 g/100 kg	účinek prokázán	účinek neprokázán

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Amerex Praha spol. s r.o. *Bioprotektory* [online]. Dostupné z WWW: <http://www.amerex.cz/produkty/bioprotektory.html>>. [citováno 2013-01-12]
- [2] AURELI, P., FIORUCCI, G. C., CAROLI, D., MARCHIARO, G., NOVARA, O., LEONE, L., SALMASO, S. An Outbreak of Febrile Gastroenteritis Associated with Corn Contaminated by *Listeria monocytogenes*. *The New England Journal of Medicine*, 2000, Vol. 342, p. 1236 – 1241.
- [3] BENEŠ, J. Projevy listériové infekce (pohled lékaře – infektologa). *Vědecký seminář konaný ve Státním zdravotním ústavu Praha dne 31. května 2007*.
- [4] BOOR, K. J., WIEDMANN, M. Ecology and control of *Listeria monocytogenes* in processing plants. *Vědecký seminář konaný ve Státním zdravotním ústavu Praha dne 31. května 2007*.
- [5] BOOR, K. J., WIEDMANN, M. Epidemiology and transmission of human listeriosis. *Vědecký seminář konaný ve Státním zdravotním ústavu Praha dne 31. května 2007*.
- [6] Center for Infectious Disease Research & Policy (CIDRAP), University of Minnesota. *Listeriosis* [online]. Dostupné z WWW: <http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/fs/food-disease/causes/listerioview.html>>. [citováno 2012-11-25]
- [7] CUPÁKOVÁ, Š., DUŠKOVÁ, M., KARPÍŠKOVÁ, R. *Mikrobiologie potravin – praktická cvičení I. – Obecná mikrobiologie*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2008. 55 s. ISBN 978-80-7305-043-6.
- [8] CUPÁKOVÁ, Š., KARPÍŠKOVÁ, R., NECIDOVÁ, L. *Mikrobiologie potravin – praktická cvičení II. – Metody stanovení mikroorganismů v potravinách*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2010. 108 s. ISBN 978-80-7305-126-6.
- [9] CUPÁKOVÁ, Š., NECIDOVÁ, L., KARPÍŠKOVÁ, R. *Bakteriální původci alimentárních onemocnění* [online], 2011. Dostupné z WWW: cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni>. [citováno 2012-07-12]

- [10] ČSN 56 9609. Pravidla správné hygienické a výrobní praxe – Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace. *Český normalizační institut*, 2008, 40 s.
- [11] ČSN EN ISO 11290-1. Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* – Část 1: Metoda průkazu. *Český normalizační institut*, 1999, 28 s.
- [12] ČSN EN ISO 11290-2. Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* – Část 2: Metoda stanovení počtu. *Český normalizační institut*, 1999, 28 s.
- [13] DALTON, C. B., AUSTIN, C. C., SOBEL, J., HAYES, P. S., BIBB, W. F., GRAVES, L. M., SWAMINATHAN, B., PROCTOR, M. E., GRIFFIN, P. M. An Outbreak of Gastroenteritis and Fever Due to *Listeria monocytogenes* in Milk. *The New England Journal of Medicine*, 1997, Vol. 336, p. 100 – 106.
- [14] FARBER, J. M., PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiological Reviews*, 1991, Vol. 55, p. 476 – 511.
- [15] FUGETT, E. B., SCHOONMAKER-BOPP, D., DUMAS, N. B., CORBY, J., WIEDMANN, M. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Analysis of Temporally Matched *Listeria monocytogenes* Isolates from Human Clinical Cases, Foods, Ruminant Farms, and Urban and Natural Environments Reveals Source-Associated as Well as Widely Distributed PFGE Types. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, Vol. 45, p. 865 – 873.
- [16] HARRIS, L. J., DAESCHEL, M. A., STILES, M. E., KLAENHAMMER, T. R. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 1989, Vol. 52, p. 384 – 387.
- [17] HRABĚ, J., BUŇKA, F., HOZA, I., BŘEZINA, P. *Technologie výroby potravin živočišného původu pro kombinované studium*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008. Kapitola 1, Mléko a mléčné výrobky, s. 7 – 52. ISBN 978-80-7318-521-3.

- [18] HUNT, K., DRUMMOND, N., MURPHY, M., BUTLER, F., BUCKLEY, J., JORDAN, K. A case of bovine raw milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Irish Veterinary Journal*, 2012, Vol. 65, 11 p.
- [19] Interní materiály a protokoly SVÚ Olomouc.
- [20] JANŠTOVÁ, B. *Základní technologické postupy a výrobní zařízení v mlékárenském průmyslu*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2008. 36 s.
- [21] JILICH, D., MACHALA, L. Listerióza. *Medicína pro praxi*, 2008, roč. 5 (9), s. 299 – 300.
- [22] KADLEC, P., MELZOCH, K., VOLDŘICH, M. A KOL. *Co byste měli vědět o výrobě potravin? – Technologie potravin*. 1. vyd. Ostrava: KEY Publishing s.r.o., Ostrava-Přívoz, 2009. Kapitola 4, Technologie mléka a mlékárenských výrobků, s. 227 – 294. ISBN 978-80-7418-051-4.
- [23] KARPÍŠKOVÁ, R., POSPÍŠILOVÁ, M. Význam a využití typizace listerií v praxi. *Vědecký seminář konaný ve Státním zdravotním ústavu Praha dne 31. května 2007*.
- [24] LUKÁŠOVÁ, J. A KOL. *Hygiena a technologie mléčných výrobků*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2001. 180 s. ISBN 80-7305-415-9.
- [25] Materiály z předchozího studia: přednáška na téma „Alimentární onemocnění“.
- [26] MAISNIER-PATIN, S., DESCHAMPS, N., TATINI, S. R., RICHARD, J. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait*, 1992, Vol. 72, p. 249 – 263.
- [27] McAULIFFE, O., HILL, C., ROSS, R. P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, Vol. 86, p. 251 – 256.
- [28] Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. *Úřední věstník Evropské unie*, 2007, L 322, 18 s.

- [29] Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006, kterým se mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. *Úřední věstník Evropské unie*, 2006, L 320, 10 s.
- [30] NUÑES, M., RODRÍGUEZ, J. L., GARCÍA, E., GAYA, P., MEDINA, M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 1997, Vol. 83, p. 671 – 677.
- [31] OLSEN, S. J., PATRICK, M., HUNTER, S. B., REDDY, V., KORNSTEIN, L., MACKENZIE, W. R., LANE, K., BIDOL, S., STOLTMAN, G. A., FRYE, D. M., LEE, I., HURD, S., JONES, T. F., LAPORTE, T. N., DEWITT, W., GRAVES, L., WIEDMANN, M., SCHOONMAKER-BOPP, D. J., HUANG, A. J., VINCENT, C., BUGENHAGEN, A., CORBY, J., CARLONI, E. R., HOLCOMB, M. E., WORON, R. F., ZANSKY, S. M., DOWDLE, G., SMITH, F., AHRABI-FARD, S., ONG, A. R., TUCKER, N., HYNES, N. A., MEAD, P. Multistate Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infection Linked to Delicatessen Turkey Meat. *Clinical Infectious Diseases*, 2005, Vol. 40, p. 962 – 967.
- [32] PETERS, T. M. Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Epidemiology of Food Pathogens. *Molecular Epidemiology of Microorganisms – Methods in Molecular Biology*, 2009, Vol. 551, p. 59 – 70.
- [33] PICKOVÁ, K. *Sledování vad u tvarůžků*. Brno: Mendelova univerzita, Agronomická fakulta, Ústav technologie potravin, 2010. 73 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Květoslava Šustová, Ph.D.
- [34] Příloha 4 Federálního zákona „Technické předpisy pro mléko a mléčné výrobky“
- [35] RYŠKOVÁ, O., A KOL. *Návody k praktickým cvičením z lékařské mikrobiologie*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 1997. 165 s. ISBN 80-7184-307-5.
- [36] SOP HYG 3/06. Průkaz bakterií *Listeria monocytogenes* přístrojem VIDAS imunodetekcí. *SVÚ Olomouc, Oddělení hygieny potravin*, 2006, 7 s.
- [37] Státní zdravotní ústav. *Infekce v ČR – EPIDAT* [online]. Dostupné z WWW: <<http://www.szu.cz/publikace/data/infekce-v-cr>>. [citováno 2013-01-21]

- [38] STORM, N., DARNHOFER-PATEL, B. MALDI-TOF Mass Spectrometry-Based SNP Genotyping. *Single Nucleotide Polymorphisms – Methods in Molecular Biology*, 2003, Vol. 212, p. 241 – 262.
- [39] STRATILOVÁ JERMÁŘOVÁ, M. *Hodnocení mikrobiální kvality sýrů zrajících pod mazem dle ČSN 56 9609*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, Ústav biochemie a analýzy potravin, 2011. 95 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.
- [40] SUKOVÁ, I. Enterokoky a jejich hodnocení v mlékárenské technologii. *Mliekarstvo*, 2003, č. 2, s. 42 – 45.
- [41] SUKOVÁ, I. Význam a použití bakteriocinů. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 2007, Jahr. 103, s. 505 – 511.
- [42] SULZER, G., BUSSE, M. Growth inhibition of *Listeria* spp. in Camembert cheese by bacteria producing inhibitory substances. *International Journal of Food Microbiology*, 1991, Vol. 14, p. 287 – 296.
- [43] ŠRÁMOVÁ, H., BENEŠ, Č., KARPÍŠKOVÁ, R. *Studie Centra epidemiologie a mikrobiologie – Listerióza zabíjí ve světě už mnoho let* [online], 2000. Dostupné z WWW: <<http://www.modernirodina.cz/listerioza-zabiji-ve-svete-uz-mnogo-let.html>>. [citováno 2012-09-22]
- [44] TOMPKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the Food-Processing Environment. *Journal of Food Protection*, 2002, Vol. 65, p. 709 – 725.
- [45] TORRI TARELLI, G., CARMINATI, D., GIRAFFA, G. Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy enterococci. *Food Microbiology*, 1994, Vol. 11, p. 243 – 252.
- [46] Ústav hygieny a technologie mléka VFU Brno. *Interaktivní atlas potravinářské mikrobiologie* [online], 2006. Dostupné z WWW: <<http://vfu-www.vfu.cz/mikrob-atlas/Main.html>>. [citováno 2012-07-12]
- [47] VIGNOLO, G., SAAVEDRA, L., SESMA, F., RAYA, R. *Progress in Food Preservation*. First Edition: John Wiley & Sons Ltd., Oxford, 2012. Part IV, Use of Natural Preservatives, Chapter 22, Food Bioprotection: Lactic Acid Bacteria as Natural Preservatives, p. 453 – 483. ISBN: 978-0-470-65585-6.

- [48] VÍT, M. Výskyt listerios v České republice. *Vědecký seminář konaný ve Státním zdravotním ústavu Praha dne 31. května 2007.*
- [49] Vyhláška 132/2004 Sb., o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení.
- [50] Vyhláška 375/2003 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon), ve znění pozdějších předpisů, a o veterinárních požadavcích na živočišné produkty.
- [51] Wikipedia. *Listeria monocytogenes* [online]. Dostupné z WWW: http://cs.wikipedia.org/wiki/Listeria_monocytogenes. [citováno 2012-11-12]

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ALOA	agar pro listerie podle Ottavianiho a Agostiho
CAMP test	Christie, Atkins, Munch-Petersen test
CPM	celkový počet mikroorganismů
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
ELFA	Enzyme-Linked Fluorescent Assay
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FAO	Food and Agricultural Organization
KA	krevní agar
LM	<i>Listeria monocytogenes</i>
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization-Time Of Flight
MRS	De Man, Rogosa a Sharpe agar
neg.	negativní
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-field Gel Electrophoresis
poz.	pozitivní
RLM	Rapid <i>Listeria monocytogenes</i>
SVÚ	Státní veterinární ústav
TSYEA	agar s tryptonem, sójovým peptonem a kvasničným extraktem
TSYEB	bujón s tryptonem, sójovým peptonem a kvasničným extraktem
WHO	World Health Organization

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. <i>Listeria monocytogenes</i> v elektronovém mikroskopu.	15
Obr. 2. Počet hlášených případů listeriózy v letech 1997 – 2012.	19
Obr. 3. Část tabulky z Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 obsahující kritéria pro vyšetřování <i>Listeria monocytogenes</i> pro jednotlivé kategorie potravin.	21
Obr. 4. Růst <i>Listeria monocytogenes</i> na tuhých kultivačních půdách.	24
Obr. 5. Gramovo barvení – <i>Listeria monocytogenes</i>	27
Obr. 6. Schéma CAMP testu.	28
Obr. 7. Schéma – hlavní kroky metody sandwich ELISA.	30
Obr. 8. Část tabulky z Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 obsahující kritéria pro vyšetřování sýrů.	31
Obr. 9. Tabulka z ČSN 56 9609, ve které jsou uvedeny tolerované hodnoty specifikované pro zrající sýry.	32
Obr. 10. Schéma samoodkalovací odstředivky.	33
Obr. 11. Pasterační zařízení.	34
Obr. 12. Schéma výroby kyselých zrajících sýrů.	37
Obr. 13. Inhibiční aktivita bakterií mléčného kvašení na růst <i>Listeria monocytogenes</i>	41
Obr. 14. Vývoj počtu <i>Lactococcus lactis</i> a koncentrace nisinu.	42
Obr. 15. Vývoj počtu <i>Listeria monocytogenes</i> a hodnoty pH.	42
Obr. 16. Inhibiční účinek lacticinu při různých teplotách skladování sýru cottage.	43
Obr. 17. Poloviční a celý bujón podle Frasera.	46
Obr. 18. Schéma postupu vyšetřování vzorků polotovaru zrajícího sýru.	48

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Srovnání počtu případů listeriózy a jiných bakteriálních střevních onemocnění v letech 2006 – 2012.....	18
Tab. 2. Počet hlášených případů listeriózy v letech 1997 – 2012.....	18
Tab. 3. Schéma postupu stanovení průkazu <i>Listeria monocytogenes</i>	24
Tab. 4. Schéma postupu stanovení počtu <i>Listeria monocytogenes</i>	25
Tab. 5. Reakce konfirmačních testů k identifikaci rodu <i>Listeria</i>	28
Tab. 6 a 7. Výsledky experimentu s bioprotektorem A.....	51
Tab. 8 a 9. Výsledky experimentu s bioprotektorem B.....	52
Tab. 10 a 11. Výsledky experimentu s bioprotektorem C.....	53
Tab. 12 a 13. Výsledky experimentu s bioprotektorem D.....	54
Tab. 14 a 15. Výsledky experimentu s bioprotektorem E.....	55
Tab. 16 a 17. Výsledky experimentu s bioprotektorem F.....	56
Tab. 18 a 19. Výsledky experimentu s bioprotektorem G.....	57
Tab. 20 a 21. Výsledky experimentu s bioprotektorem H.....	58
Tab. 22. Zhodnocení účinnosti testovaných bioprotektorů.....	63