

Identifikace kultivovatelných mikroorganismů z listové zeleniny

Bc. Andrea Martinková

Diplomová práce
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Andrea Martinková
Osobní číslo:	T19879
Studijní program:	N2901 Chemie a technologie potravin
Studijní obor:	Technologie potravin
Forma studia:	Kombinovaná
Téma práce:	Identifikace kultivovatelných mikroorganismů z listové zeleniny

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Mikrobiologická jakost čerstvých potravin.
2. Charakteristika jednotlivých skupin mikroorganismů.
3. Identifikace mikroorganismů hmotnostní spektrometrií MALDI TOF.

II. Praktická část

1. Izolace a identifikace mikroorganismů z listové zeleniny.
2. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] SILHANKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008, 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1.
- [2] MOGREN, Lars, Sofia WINDSTAM, Sofia BOQVIST, et al. The Hurdle Approach? A Holistic Concept for Controlling Food Safety Risks Associated With Pathogenic Bacterial Contamination of Leafy Green Vegetables. A Review. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2018, 9 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01965. ISSN 1664-302X.
- [3] Dle doporučení vedoucího.
- [4] Vědecké zdroje uvedené v databázích Web of Science.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Pavel Pleva, PhD.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **17. února 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. RNDr. Iva Burešová, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2020

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou 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);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové 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.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Mikrobiologická jakost listové zeleniny je z hlediska zdravotní nezávadnosti jednou z nejdůležitějších vlastností. Mikroorganismy jsou ovlivněny mnoha faktory jako např. relativní vlhkost vzduchu, složení atmosféry v obale, aktivita vody, složení potravin a jiné. V první části diplomové práce byl sledován celkový počet mikroorganismů a dále pak počty jednotlivých skupin mikroorganismů. Zvýšené hodnoty počtů mikroorganismů mohly být způsobeny zejména dlouhou dobou přepravy, špatných podmínkách při skladování a přepravě nebo hnojivem. Ve druhé části byly identifikovány jednotlivé kmeny bakterií a kvasinek pomocí MALDI TOF-MS, které se vyskytovaly u listové zeleniny. MALDI TOF-MS je metodou identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie, která je založena na rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém nebo magnetickém poli. Byly identifikovány významné počty patogenních rodů jako *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* a podmíněně patogenní bakterie rodu *Enterobacter* a další. Identifikovány byly i kmeny kvasinek z rodu *Candida*.

Klíčová slova: mikrobiologická jakost, MALDI TOF-MS, listová zelenina, bakterie, kvasinky

ABSTRACT

The microbiological quality of leafy vegetables is one of the most important properties in terms of health safety. Microorganisms are affected by many factors such as relative humidity, the composition of the atmosphere in the packaging, activity of water, the composition of foodstuff and others. In the first part of the diploma thesis, the total number of the microorganisms was observed and further the number of individual groups of microorganisms. The increased values of the number of microorganisms could be caused particularly by a long time of transportation, not suitable storage and transport conditions, or by fertilizers. In the second part, individual strains of bacteria and yeasts were identified by MALDI TOF-MS, which occurred in leafy vegetables. MALDI TOF-MS is an identification method by mass spectrometry, which is based on the distribution of charged particles according to their molecular weights in an electric or magnetic field. Significant numbers of pathogenic genera such as *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* and conditionally pathogenic bacteria of the genus *Enterobacter* and others have been identified. Yeast strains of the genus *Candida* have also been identified.

Keywords: microbiological quality, MALDI TOF-MS, leafy vegetables, bacteria, yeast

Poděkování:

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D. za odborné vedení, rady, konzultace a připomínky, které mi poskytoval při zpracování. Ráda bych také poděkovala Prof. Ing. Miroslavě Kačániové, PhD. ze Slovenské poľnohospodárskej univerzity v Nitre a laborantkám Ing. Olze Vlčkové a Ing. Veronice Kučabové za pomoc v mikrobiologických laboratořích. Mé zvláštní poděkování patří rovněž Ústavu inženýrství a ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 MIKROBIOLOGICKÁ JAKOST ČERSTVÝCH POTRAVIN	11
1.1 SLOŽENÍ LISTOVÉ ZELENINY	11
1.2 VNITŘNÍ A VNĚJŠÍ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ JAKOST POTRAVIN	13
1.2.1 Vnitřní faktory.....	14
1.2.2 Vnější faktory.....	14
1.3 KONTROLA A ŘÍZENÍ JAKOSTI ČERSTVÝCH POTRAVIN.....	15
1.4 TRH S ČERSTVÝMI POTRAVINAMI A MOŽNÉ CESTY KONTAMINACE ZELENINY	16
2 LEGISLATIVA VZTAHUJÍCÍ SE K ZELENINĚ	19
2.1 LEGISLATIVA ČR VZTAHUJÍCÍ SE K ZELENINĚ.....	19
2.2 LEGISLATIVA EU VZTAHUJÍCÍ SE K ZELENINĚ	20
2.2.1 Předpisy týkající se obecných hygienických pravidel	20
2.2.2 Předpisy týkající se specifických pravidel EU	21
3 CHARAKTERISTIKA JEDNOTLIVÝCH SKUPIN MIKROORGANISMŮ	22
3.1 ZDROJ KONTAMINACE ZELENINY	22
3.2 IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ POMOCÍ METODY MALDI TOF-MS	23
3.3 NEJVÝZNAMNĚJŠÍ RODY BAKTERIÍ VYSKYTUJÍCÍ SE U ZELENINY	25
3.3.1 <i>Aeromonas</i>	25
3.3.2 <i>Bacillus</i>	25
3.3.3 <i>Citrobacter</i>	25
3.3.4 <i>Clostridium</i>	25
3.3.5 <i>Enterobacter</i>	25
3.3.6 <i>Erwinia</i>	26
3.3.7 <i>Escherichia</i>	26
3.3.8 <i>Flavobacterium</i>	26
3.3.9 <i>Klebsiella</i>	26
3.3.10 <i>Lactobacillus</i>	27
3.3.11 <i>Micrococcus</i>	27
3.3.12 <i>Pseudomonas</i>	27
3.3.13 <i>Salmonella</i>	27
3.3.14 <i>Shigella</i>	28
3.3.15 <i>Staphylococcus</i>	28
3.3.16 <i>Vibrio</i>	28
3.3.17 <i>Xanthomonas</i>	28
3.4 NEJVÝZNAMNĚJŠÍ RODY KVASINEK VYSKYTUJÍCÍ SE U ZELENINY.....	28
3.4.1 <i>Candida</i>	28
3.4.2 <i>Kloeckera</i>	29
3.4.3 <i>Saccharomyces</i>	29

3.5	NEJVÝZNAMNĚJŠÍ RODY PLÍSNÍ VYSKYTUJÍCÍ SE U ZELENINY	29
3.5.1	<i>Alternaria</i>	29
3.5.2	<i>Cladosporium</i>	29
3.5.3	<i>Fusarium</i>	29
3.5.4	<i>Mucor</i>	30
3.5.5	<i>Penicillium</i>	30
3.5.6	<i>Phoma</i>	30
II	PRAKTICKÁ ČÁST.....	31
4	CÍL PRÁCE	32
5	MATERIÁL A METODY	33
5.1	MATERIÁL	33
5.1.1	Popis analyzovaných vzorků	33
5.1.2	Laboratorní přístroje	35
5.1.3	Kultivační média	36
5.1.4	Chemikálie a roztoky	36
5.2	METODY	37
5.2.1	Příprava vzorků	37
5.2.2	MALDI TOF-MS	37
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	40
6.1	POČTY MIKROORGANIZMŮ	40
6.1.1	Vzorky listové zeleniny izolované na jaře roku 2019	40
6.1.2	Vzorky listové zeleniny izolované v létě roku 2019	44
6.1.3	Vzorky listové zeleniny izolované na podzim roku 2019	49
6.2	IDENTIFIKACE MIKROORGANIZMŮ POMOCÍ MALDI TOF-MS	54
	ZÁVĚR	59
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	61
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	71
	SEZNAM OBRÁZKŮ	72
	SEZNAM TABULEK.....	73
	SEZNAM PŘÍLOH.....	74

ÚVOD

Listová zelenina je celosvětově velmi používanou a zdraví prospěšnou potravinou. Tento druh zeleniny může být však i rizikový pro lidské zdraví z hlediska obvyklé konzumace v surovém stavu. Listovou zeleninu může ovlivňovat spousta faktorů, ať už vnějších nebo vnitřních, a mohou být tak podpořeny podmínky pro růst nežádoucích mikroorganismů, ať už se jedná o bakterie, kvasinky nebo plísňe, které by mohly svou metabolickou činností ovlivnit kvalitu a zdravotní nezávadnost potravin. Mezi bakterie, které se u zeleniny mohou vyskytovat, patří rody jako *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Salmonella* a *Staphylococcus*. Dále pak kvasinky rodu *Saccharomyces* a *Candida*, plísňe rodu *Mucor*, *Fusarium* a *Penicillium*.

V rámci udržení mikrobiologické jakosti listové zeleniny je potřeba dbát na dodržování určitých pravidel (např. systém HACCP) při pěstování, sklizni, manipulaci a následném skladování, kde by mohlo dojít ke kontaminaci potravin. Zároveň je důležité, aby byly dodrženy mikrobiologické limity pro jednotlivé skupiny mikroorganismů, a to například dle Nařízení Komise č. 2073/2005/ES o mikrobiologických kritériích pro potraviny.

Úlohou mikrobiologického testování je sledovat a charakterizovat mikroorganismy, které jsou přítomné na určitých typech potravin.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MIKROBIOLOGICKÁ JAKOST ČERSTVÝCH POTRAVIN

Jakost čerstvých potravin jakožto ovoce a zeleniny je soubor různých fyzikálních a chemických vlastností ve spojení s požadavky spotřebitele. V rámci hodnocení jakosti je potřeba zohlednit charakter produktu, dále pak ale vnější vlastnosti ovlivněné socioekonomickými a marketingovými faktory, které podmiňují vnímání produktu spotřebitelem. [1]

Z hlediska mikrobiologické jakosti se mluví o třech aspektech [56]:

1. Bezpečnost – Potravina nesmí obsahovat takové množství patogenů a hladiny jejich toxinů, které by mohlo způsobit onemocnění při konzumaci této potraviny.
2. Přijatelnost/Doba použitelnosti – Potravina nesmí obsahovat mikroorganismy, které by během krátké doby mohly změnit její organoleptické vlastnosti.
3. Soulad (Jednota) – Potravina musí být konzistentní kvality a zároveň musí být respektovány zásady bezpečnosti a skladovatelnosti.

1.1 Složení listové zeleniny

Listová zelenina je široce pěstovaná a celosvětově velmi používaná potravina. Největším producentem je Čína, která produkuje zejména saláty jako např. *Lactuca sativa*, *Lactuca* var. *Angustana*, které se běžně nekonzumují v USA nebo západní Evropě. V USA se salát řadí mezi 3. nejvíce konzumovanou zeleninu. Složení jednotlivých druhů listové zeleniny se může lišit složením živin. Listová zelenina existuje v různých barvách, velikostech, tvarech a díky této rozmanitosti lze saláty seskupovat podle jejich typů. Typem je skupina potravin, které jsou morfologicky podobné. Typ jde rozdělit dále na podtypy, které sdílejí více morfologických a genetických podobností. Ačkoli v průběhu let existovaly různé klasifikační systémy, neexistuje žádný standardizovaný kvalifikační systém. Vzhledem k tomu, že se salát ve většině případů konzumuje syrový, je více živin uchováváno ve srovnání s jinými druhy zeleniny, které se vaří, nebo jinak zpracovávají (např. brambory). [13,14]

V poslední době se stále zvyšuje prevalence obezity ve světě. Dieta a snižování kalorického příjmu hraje zásadní roli při snižování tělesné hmotnosti a ke zlepšení zdravotního stavu. Listová zelenina může pozitivně přispívat k redukci hmotnosti, jelikož má nízký obsah tuku. [13]

Listová zelenina obsahuje polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), které jsou důležité pro zdraví. Z omega-6 je to kyselina linolová a z omega-3 kyselina α -linolenová. Nazývají se také jako esenciální mastné kyseliny, které musí být získány ze stravy, neboť si je lidský organismus není schopen tvořit. Např. u dospělých jedinců je doporučenou denní dávkou pro kyselinu linolovou zhruba 500–900 mg/den. [13,15,16] Kyselina linolová má protizánětlivé účinky, zvyšuje hladiny některých lipidů v těle a využívá se při biosyntéze kyseliny arachidonové. Kyselina α -linolenová snižuje hladinu cholesterolu a triacylglyceroly v těle a snižuje tak riziko kardiovaskulárních onemocnění a stejně jako kyselina linolová má i protizánětlivé účinky. [17]

Listová zelenina je také důležitým zdrojem vlákniny. Vláknina obsažená ve 100 g čerstvé listové zeleniny zaujímá až 10 % doporučeného denního příjmu. Doporučený denní příjem vlákniny se pohybuje v rozmezí 21–38 g/den. [13, 18]

Lidský organismus vyžaduje řadu důležitých minerálních látek jako je sodík a draslík, které jsou nezbytné pro řadu metabolických funkcí. Tyto minerální látky jsou součástí listové zeleniny. Doporučená denní draslíku je 2000 mg/den a sodíku 550–2400 mg/den. [18]

Mezi další obsažené minerální látky patří fosfor a hořčík. Obsahy fosforu a hořčíku se u různých druhů listové zeleniny liší. Může se tak dívat kvůli kulturním podmínkám, vlastnostech půdy atd. Ve srovnání s ostatními druhy zeleniny jako je např. penát, je listová zelenina zanedbatelným zdrojem fosforu a hořčíku. Doporučené denní dávky jsou u fosforu 700 mg/den a u hořčíku 420 mg/den. Pro veganskou stravu jsou obzvláště důležité minerální látky jako železo a zinek, protože v zelenině je obsah velmi nízký, ale existují druhy listové zeleniny, které obsahují větší množství železa a to např. římského salátu a ledového salátu. Železo je naprosto nezbytné pro správnou funkci buněk v těle. Potřebujeme jej především pro transport kyslíku po těle. [13]

Vitamíny jsou nezbytnými mikroživinami potřebnými pro metabolismus. Kromě této funkce hrají vitamíny roli potravinářských přídatných látek, zdravotních prostředků, a léčivých látek. Mezi běžné vitamíny obsažené v listové zelenině patří vitamín C, E a B9. Listová zelenina je bohatým zdrojem kyseliny listové (vitamín B9), která zabraňuje vzniku některých vrozených vývojových vad (např. spina bifida) u nenarozených dětí a předčasným porodům a potratům. [17]

Vitamín C se zapojuje do procesů resorpce železa a jeho železitých a železnatých iontů, odbourávání tyrosinu a tvorby žlučových kyselin. Dále tvoří významný antioxidační systém chránící buňky. Doporučená denní dávka vitamínu C se pohybuje v rozmezí 60–80 mg/den. Deficit vitamínu C vyvolává poruchu syntézy kolagenu, což je nemoc zvaná kurděje. Vitamín E patří mezi nejdůležitější přirozené antioxidanty a vylučuje reaktivních forem kyslíku. Při jeho deficitu v těhotenství hrozí u novorozenců nebezpečí anemie. [17]

Další důležitou složkou listové zeleniny jsou fenolické sloučeniny, které jsou odpovědné za obranný systém rostliny a ovlivňují její smyslové a nutriční vlastnosti a také jsou lepšími antioxidanty než vitamín C a E. Vykazují příznivé účinky proti stresu, zánětu, rakovině, cukrovce, neurodegeneraci související s věkem a kardiovaskulárnímu onemocnění. [13]

V listové zelenině se nachází velké množství vody (viz Tab. 1) a to zhruba 75-95 %. Voda je obsažena jak ve formě volné, tak ve formě vázané na koloidy. Obsah vody se liší v závislosti na skladování a během technologického, či kulinárního zpracování jako je sušení a vaření, zmrazování a rozmrazování. Voda hraje důležitou roli v rámci růstu mikroorganismů, které mohou negativně ovlivňovat jakost listové zeleniny. [19, 20, 21]

Tab. 1: Obsah vody ve vybraných druzích listové zeleniny v g/kg [22]

Obsah vody [g/kg]	
salát hlávkový	947
salát římský	947
salát ledový	956
zelí peking	954
řeřicha zahradní	953
štěrбак zahradní	890
špenát	915

1.2 Vnitřní a vnější faktory ovlivňující jakost potravin

Působením mikroorganismů se mění vlastnosti potravin, a to zejména jejich konzistence, textura, barva, vzhled, vůně a chuť. Změny, které vzniknou, závisí na jejich fyzikálních a chemických vlastnostech, tzn. na vnitřních a vnějších faktorech, které danou potravinu

ovlivňují. Tyto faktory ovlivňují druh mikrobiální změny a tím udávají trvanlivost potravin. Významný vliv na jakost potravin má také počet a druhové zastoupení mikroorganismů. [6]

1.2.1 Vnitřní faktory

Jednotlivé složky potravin mají významný vliv na druh a míru změn v potravine. Tyto faktory jsou ve velké míře určovány technologickými postupy při opracování, zpracování a finalizaci poživatin. [6] Mezi tyto faktory patří:

- 1) **Složení potravin** – nízkomolekulární látky se mění velmi rychle, neboť je mikroorganismy dokáží rychle metabolizovat přímo, a to bez předchozího štěpení. Potraviny s vyšším obsahem nízkomolekulárních látek se proto mění (kazí, fermentují) rychleji než potraviny, které obsahují převážně polymerní látky. [6]
- 2) **Aktivita vody** – termín, používaný k popisu množství volné nebo nevázané vody v rámci systému, která je k dispozici a které mohou jednotlivé mikroorganismy využít, neboť ji potřebují k přežití. [7]
- 3) **Koncentrace vodíkových iontů (pH)** – číslo, vyjadřující kyselost nebo zásaditost roztoku v logaritmickém měřítku, na kterém je 7 neutrální prostředí, nižší hodnoty značí kyselější prostředí a vyšší alkaličtější prostředí. [8]
- 4) **Redoxní potenciál** – redoxní reakce jsou nezbytné pro život živých organismů a pro funkci mnoho enzymů. Schopnost mikroorganismů provádět oxidačně-redukční reakce závisí na redoxním potenciálu potravin. Při záporné hodnotě redoxního potenciálu jsou schopny přežít především anaeroby a při kladném redoxním potenciálu přežívají aerobní mikroorganismy. [9]
- 5) **Textura** – mechanické, geometrické a povrchové vlastnosti výrobku, vnímatelné prostřednictvím mechanických, dotykových, případně zrakových a sluchových receptorů. [10]

1.2.2 Vnější faktory

Významný vliv mají na potraviny také vnější vlivy, které jsou formovány podmínkami při uchovávání a skladování určitých potravin a patří mezi ně tyto faktory [6]:

- 1) **Teplota prostředí** – odlišné skupiny mikroorganismů mají různé nároky na teplotu prostředí, ve kterém se mají rozmnožovat a metabolizovat a dělí se na čtyři skupiny: psychrofilní, psychrotrofní, mezofilní a termofilní. [6]
- 2) **Relativní vlhkost vzduchu** – pro potraviny bohaté na vodu jako je zelenina, je vlhkost důležitým faktorem zejména při skladování potravin. [11]
- 3) **Složení atmosféry v obale** – změnou určitých poměrů plynů v obalu lze dosáhnout zvýšení trvanlivosti. Pracuje se s plyny, jako je např. dusík, oxid uhličitý a kyslík. [12]
- 4) **Složení atmosféry ve skladovacím prostoru** – skladování za určitého složení atmosféry ve skladovacím prostoru vede k uchování jakosti, která je spotřebitel požadována. [12]
- 5) **Čas** – počet bakterií se může zdvojnásobit v řádu hodin. V průběhu hodiny může při optimální teplotě u určitých bakterií dojít k 2 až 3–násobnému zdvojení buňky. Potraviny ponechané po dlouhou dobu při pokojové teplotě tak vytvářejí velmi příznivé podmínky pro růst a pomnožování bakterií. [6]

1.3 Kontrola a řízení jakosti čerstvých potravin

Ovoce a zelenina jsou důležitým zdrojem vitamínů a minerálů ve stravě člověka. Spotřeba těchto potravin souvisí s prevencí před různými typy degenerativních chorob, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, rakovina aj. V posledních dvou desetiletích byl zaznamenán silný růst v produkci různých typů čerstvých potravin, který byl způsoben nárůstem spotřeby a prodeje. Spotřebitelé vnímají čerstvé potraviny jako zdravé a chutné a nezbytné k udržení zdraví. Vzhledem k tomuto růstu trhu čelí odvětví produkce čerstvých potravin novým výzvám, jako je zajištění bezpečnosti výrobků na ochranu spotřebitelů, vývoj nových technologií, které mohou udržet kvalitu čerstvých potravin a prodloužit jejich trvanlivost, tak aby tyto produkty byly dosažitelné i na vzdálenějších trzích. [2,77]

V rámci kontroly a řízení bezpečnosti potravin se využívají různé nástroje a iniciativy jako [59]:

- FAO – Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization)
- WHO – Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

- ISO – Mezinárodní organizace pro normalizaci (International Organization for Standardization)
- BRC (British Retail Consortium)
- IFS (International Food Standard)
- Systém RASFF – Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (Rapid Alert System for Food and Feed)
- Systém HACCP – Systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů (Hazard Analysis and Critical Control Points)

HACCP neboli Systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů je ve výrobě jeden ze základních nástrojů, jak předcházet rizikům, díky kterým by se potravina mohla stát nebezpečnou. Tento preventivní systém sedmi kroků vyžaduje, aby zpracovatelem byl analyzován produkt a proces z hlediska očekávaných rizik, identifikováno a validováno opatření pro kontrolu těchto rizik, byly specifikovány řídicí kroky a monitorovány a ověřovány informace, že bylo dosaženo správné aplikace systému HACCP.

Těchto sedm kroků je [36,38,39]:

- 1) Analýza nebezpečí
- 2) Identifikace kritických kontrolních bodů
- 3) Stanovení kritických kontrolních limitů pro každý kritický kontrolní bod
- 4) Stanovení monitorovacích postupů pro každý kritický kontrolní bod
- 5) Stanovení nápravných opatření
- 6) Stanovení postupů vedení záznamů
- 7) Stanovení postupů ověřování.

Cílem HACCP je zajistit, aby byly potraviny zdravotně nezávadné, a to kontrolou nad průběhem celého procesu výroby. [36]

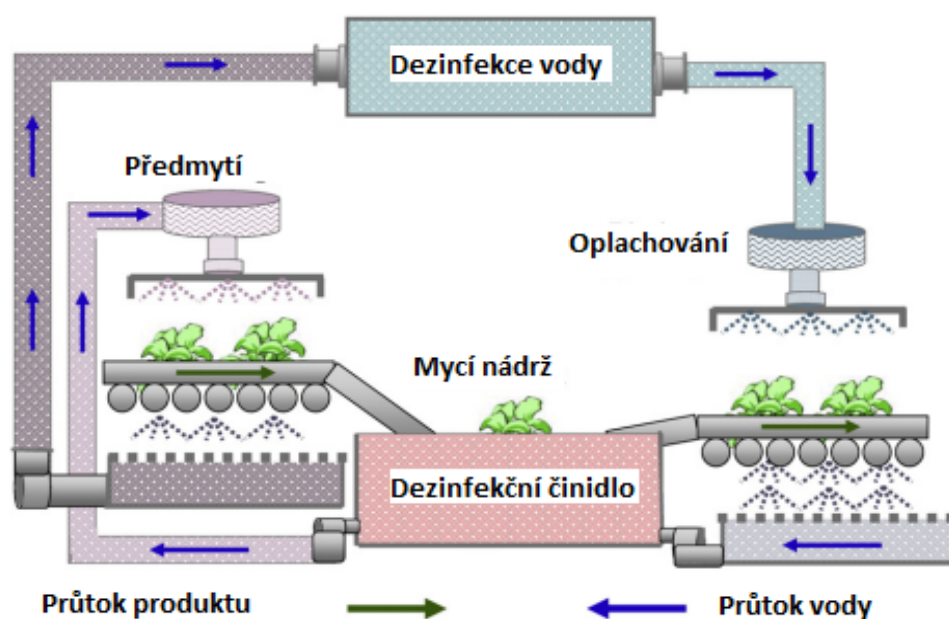
1.4 Trh s čerstvými potravinami a možné cesty kontaminace zeleniny

Pohyb a produkce na různých trzích je variabilní a různorodý. Různorodost trhu může mít dopad na bezpečnost potravin z produkce, protože v jeho rozdělení existuje mnoho kroků, čímž se zvyšuje příležitost pro potenciální kontaminaci. V dnešní době se průmysl výroby

čerstvých potravin zaměřuje hodně na školení zaměstnanců o důležitosti plánů zpětného sledování. [3]

Znalost povahy zeleniny, pokud jde o manipulaci, zpracování, balení a skladování před sklizní a po sklizni, je nezbytná pro zajištění jejich nezávadnosti a nutriční hodnoty a pro vývoj nejúčinnějších postupů a inovativních technologií pro udržování jejich kvality a bezpečnosti. [23]

Čištění a mytí (Obr. 1) jsou často jedinými konzervačními postupy používanými na syrové zemědělské komodity. Jako první krok ve zpracování je čištění formou separace, která se týká odstraňování cizích materiálů, jako jsou větvičky, stonky, nečistoty, písek, zemina, hmyz, rezidua pesticidů a hnojiv ze surovin, jakožto i z nádob a zařízení. Proces čištění také zahrnuje oddělení lehkých od těžkých materiálů pomocí gravitace, flotace, prosévání, odvodnění a dalších. Mnoho stávajících metod čištění a dezinfekce čerstvých produktů však není schopno dosáhnout snížení hladin patogenů a zajištění bezpečnosti produktů. [23] Chemické metody čištění a dezinfekce obvykle zahrnují použití mechanického praní v přítomnosti dezinfekčních prostředků, následované opláchnutím pitnou vodou. K odstranění organických látek a dekontaminaci čerstvých produktů se používá kombinace chemických metod čištění a fyzikálních metod čištění, a to použití UV záření a peroxidu vodíku. [42]



Obr. 1: Efektivní proces dezinfekce vody s recirkulačním systémem navrženým jako alternativa k tradičnímu mytí. [42]

Po sklizni jsou obvykle přepravovány do zpracovatelského průmyslu, hospodářských podniků atd. Dopravní prostředky jsou tedy nedílnou součástí potravinového řetězce, kde může dojít ke kontaminaci. Většina produktů musí být sklizena a odeslána do 12 až 72 hodin, takže v distribučních místech mohou být tyto produkty skladovány cca 10 dní. Teplota je velmi důležitým faktorem z hlediska kvality a bezpečnosti jednotlivých potravin. Nejčastější chybou při skladování potravin je tedy nedodržování správné teploty. [23]

Tržní životnost většiny čerstvé zeleniny lze prodloužit rychlým skladováním v prostředí, které udržuje kvalitu produktu. Požadované prostředí lze získat v zařízeních, kde lze regulovat teplotu, cirkulaci vzduchu, relativní vlhkost a někdy i složení atmosféry. [41]

Některé z komodit mohou být baleny přímo na poli, aby se zabránilo během manipulace poškození, ztrátě vody, znečištění atd. během přepravy a skladování. Před zabalením mohou být některé komodity upraveny a odstraněny nepoživatelné části. Všechny obalové materiály by měly být vyrobeny z materiálu pro styk s potravinami, aby nedošlo ke znehodnocení dané potraviny. Stejně jako při skladování, tak i při balení je důležité udržovat určité teploty. Mezi balicí materiály patří flexibilní pytle (vyrobené z plastové juty, jako jsou tašky a sítě), dřevěné bedny, kartony (dřevovláknité krabice), plastové bedny, paletové boxy a přepravní kontejnery, koše z tkaných proužků listů, bambusu, plastu atd. [23,41]

Spotřebitelé si stále více uvědomují důležitost konzumace čerstvé zeleniny, nicméně i tyto druhy potravin se opakovaně stávají zdrojem potravinových nemocí ve světě. Většina komerčně používané intervence k ochraně produktů před kontaminací je používání 2 % chlorované vody k mytí, která přispívá k inaktivaci patogenů. Tento způsob má ale i nežádoucí účinek jako je zhoršení organoleptických vlastností potravin. Protože tepelné zpracování čerstvých produktů není možné, zavádějí se nové techniky pro údržbu kvality jako např. mytí s použitím chemikálií (ClO_2 , organické kyseliny, peroxid vodíku) a fyzikální metody (UV-C světlo, ultrazvuk, magnetické pole, vysoký tlak atd.). [23]

2 LEGISLATIVA VZTAHUJÍCÍ SE K ZELENINĚ

2.1 Legislativa ČR vztahující se k zelenině

Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, ve znění pozdějších předpisů definuje jakost jako soubor charakteristických vlastností jednotlivých druhů, skupin a podskupin potravin a tabákových výrobků, jejichž limity jsou stanoveny tímto zákonem, prováděcím právním předpisem anebo přímo použitelným předpisem Evropské unie. Dále jsou v zákonu popsány povinnosti provozovatelů potravinářských podniků, ať už se jedná o značování potravin, dodržování požadavků pro jakost potravin, oznámení zahájení výroby nebo požadavky na výrobní proces. [24]

Zákon č. 252/1997 Sb., o zemědělství, ve znění pozdějších předpisů definuje podmínky k zajištění schopnosti českého zemědělství zabezpečit základní výživu obyvatel, potravinovou bezpečnost, potřebné nepotravinářské suroviny a jiné. Dalším účelem je podpora mimoprodukčních funkcí zemědělství, které přispívají k ochraně životního prostředí, a to zejména půdy, vody a ovzduší. [25]

Zákon č. 242/2000 Sb., o ekologickém zemědělství, ve znění pozdějších předpisů upravuje podmínky hospodaření v ekologickém zemědělství a k němu se vztahující osvědčování a označování bioproduktů, biopotravin a ostatních bioproduktů. Upravuje podmínky výkonu kontroly a dozoru nad dodržováním povinností s tím spojených. [26]

Zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči, ve znění pozdějších předpisů zapracovává příslušné předpisy Evropské unie a zároveň navazuje na přímo použitelné předpisy Evropské unie. V zákoně jsou stanovena práva a povinnosti fyzických a právnických osob, které se týkají např. uvádění na trh, omezování nepříznivého vlivu škodlivých organismů atd. [27]

Zákon č. 408/2000 Sb., o ochraně práv k odrůdám rostlin a o změně zákona č. 92/1996 Sb., o odrůdách, osivu a sadbě pěstovaných rostlin, ve znění pozdějších předpisů upravuje práva a povinnosti k odrůdám rostlin chráněným podle tohoto zákona, pravomoc a působnost orgánů vykonávajících státní správu v oblasti ochranných práv k odrůdám, řízení o udělení ochranných práv, kontrolu udržování odrůd a ukládání trestů za nedodržení povinností. [28]

Zákon č. 219/2003 Sb. o uvádění do oběhu osiva a sadby pěstovaných rostlin a o změně některých zákonů (zákon o oběhu osiva a sadby), ve znění pozdějších předpisů upravuje

uvádění do oběhu osiva a sadby pěstovaných rostlin, registraci odrůd pěstovaných rostlin uvedených v druhovém seznamu a odrůd okrasných druhů, dozor nad dodržováním povinností a správní tresty za jejich porušení. [31]

Zákon č. 156/1998 Sb., zákon o hnojivech, pomocných půdních látkách, pomocných rostlinných přípravcích a substrátech a o agrochemickém zkoušení zemědělských půd, ve znění pozdějších předpisů zpracovává podmínky uvádění do oběhu, skladování a používání hnojiv, pomocných půdních látek, pomocných rostlinných přípravků a substrátů. [30]

Zákon č. 477/2001 Sb., o obalech, ve znění pozdějších předpisů definuje obal jako výrobek zhotovený z materiálu jakékoli povahy a určený k pojmutí, ochraně, manipulaci, dodávce, popřípadě prezentaci výrobku nebo výrobků určených spotřebiteli nebo jinému konečnému uživateli. Účelem tohoto zákona je snižování škodlivosti obalů a chemických látek v těchto obalech. [29]

Zákon č. 395/2009 Sb. o významné tržní síle při prodeji zemědělských a potravinářských produktů a jejím zneužití, ve znění pozdějších předpisů upravuje způsob posuzování a zamezení zneužití významné tržní síly v souvislosti s nákupem potravin za účelem jejich dalšího prodeje na území České republiky, nebo službami s tímto nákupem nebo prodejem potravin souvisejícími a dozor nad dodržováním tohoto zákona. [32]

2.2 Legislativa EU vztahující se k zelenině

2.2.1 Předpisy týkající se obecných hygienických pravidel

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 (8) ze dne 28. ledna 2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin (všeobecně nazývané „obecné potravinové právo“), obsahuje základní ustanovení umožňující zajistit vysokou úroveň ochrany lidského zdraví a zájmů spotřebitelů, a současně zajišťovat účinné fungování vnitřního trhu. Stanoví jednotné zásady, povinnosti a prostředky pro vytvoření silné vědecké základny, účinná organizační opatření a postupy, z nichž se má vycházet při rozhodování v otázkách bezpečnosti potravin a krmiv. [37]

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004 o hygieně potravin stanovuje obecná pravidla pro hygienu potravin vztahující se na provozovatele potravinářských podniků, přičemž přihlíží především k zásadám, týkající

se např. odpovědnosti za bezpečnost potravin provozovatelem potravinářského podniku a všeobecného používání postupů založených na zásadách HACCP spolu s používáním správné hygienické praxe. [35]

2.2.2 Předpisy týkající se specifických pravidel EU

Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny stanovuje mikrobiologická kritéria pro některé mikroorganismy a prováděcí pravidla, která musí provozovatelé potravinářských podniků dodržovat při provádění obecných a zvláštních hygienických opatření. [33]

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005 ze dne 23. února 2005 o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu a o změně směrnice Rady 91/414/EHS stanovuje v souladu s obecnými zásadami uvedenými v nařízení (ES) č. 178/2002, zejména s potřebou zajistit vysokou úroveň ochrany spotřebitele, harmonizovaná ustanovení Společenství týkající se maximálních limitů reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu. [34]

Codex Alimentarius je řada potravinových standardů a souvisejících textů, které si kladou za cíl zajistit vysokou úroveň ochrany spotřebitele a spravedlivé postupy v mezinárodním obchodu s potravinami a zemědělskými produkty. Organizace pověřena vývojem norem Codex a souvisejících textů je komise Codex Alimentarius Commission (CAC), která je mezinárodním subjektem společně sponzorovaným Organizací pro výživu a zemědělství (FAO) a Světovou zdravotnickou organizací (WHO). [40]

3 CHARAKTERISTIKA JEDNOTLIVÝCH SKUPIN MIKROORGANISMŮ

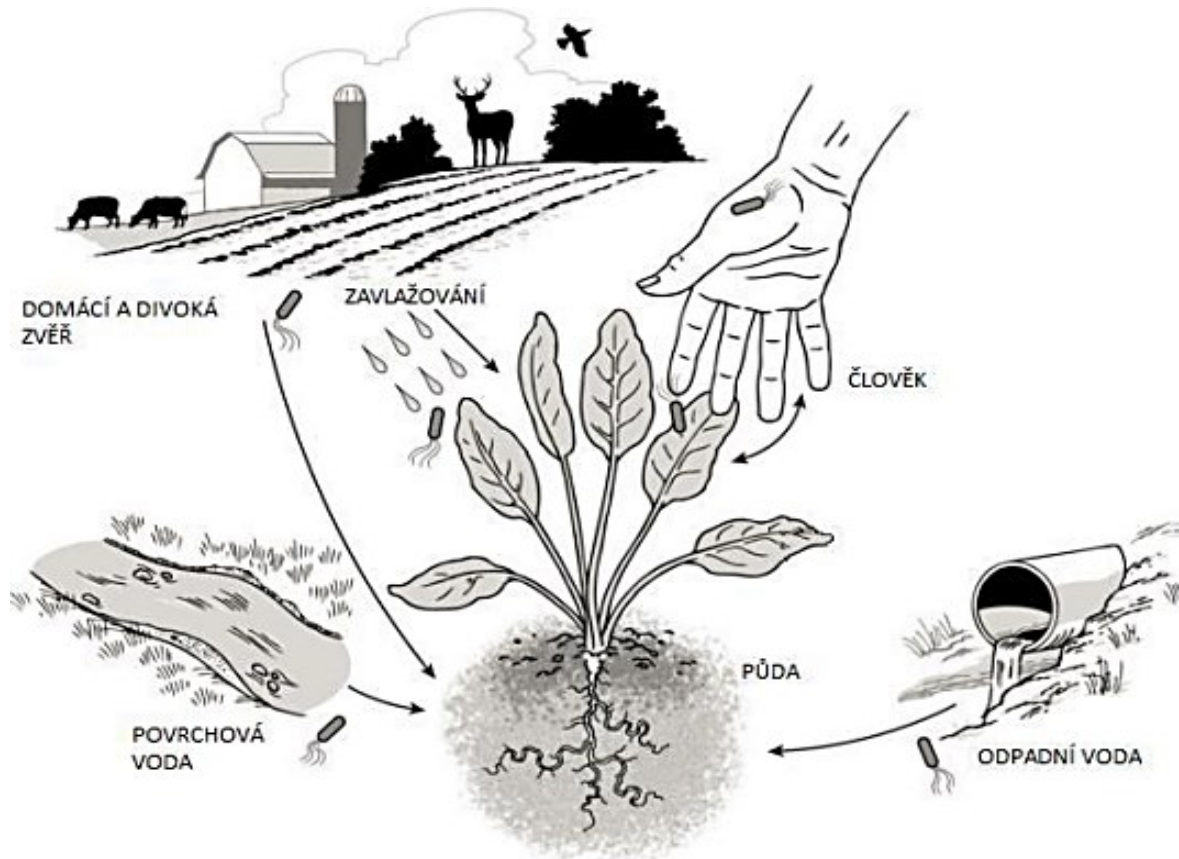
Studie naznačují, že zvyšování povědomí o zdraví vede k významnému nárůstu poptávky po čerstvých potravinách, kde majoritní složku tvoří zelenina. Zároveň byl zaznamenán vznik ohnisek nemocí přenášených potravinami, zejména u zeleniny a ovoce, proto se dnešní studie zaměřují na identifikaci mikrobiální kontaminace. [4]

Mikrobiální růst mikroorganismů je faktorem ovlivňující bezpečnost čerstvých potravin. Zelenina se skládá převážně z vody, a proto mají tyto produkty i vysokou aktivitu vody ($> 0,99$). Intracelulární pH je dalším důležitým vnitřním faktorem v zelenině a pohybuje se obvykle od 4,9 do 6,5. Tyto vlastnosti umožňují za přítomnosti živin růst mikroorganismů. [2]

3.1 Zdroj kontaminace zeleniny

Běžnou skupinou kontaminantů vyskytující se na povrchu zeleniny jsou patogenní mikroorganismy. Problémem jsou zejména produkty, které se konzumují v syrovém stavu, kde spadá zejména listová zelenina, která se nijak tepelně neupravuje, tudíž nemůže zajistit devitalizaci přítomných patogenů. Mimo patogenní mikroorganismy se u zeleniny běžně vyskytují bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Ke kontaminaci dochází ve všech fázích produkce (viz Obr. 2), a to při růstu, při sklizni, po sklizni, při manipulaci se zeleninou, a při jejich konečné úpravě v domácnostech. [46]

Mikroorganismy rostou rychleji v poškozené nebo řezané zelenině. Přítomnost vzduchu, vysoká vlhkost a vyšší teplota během skladování zvyšuje šance na znehodnocení. [45]



Obr. 2: Zdroje kontaminace zeleniny v průběhu růstu. [46]

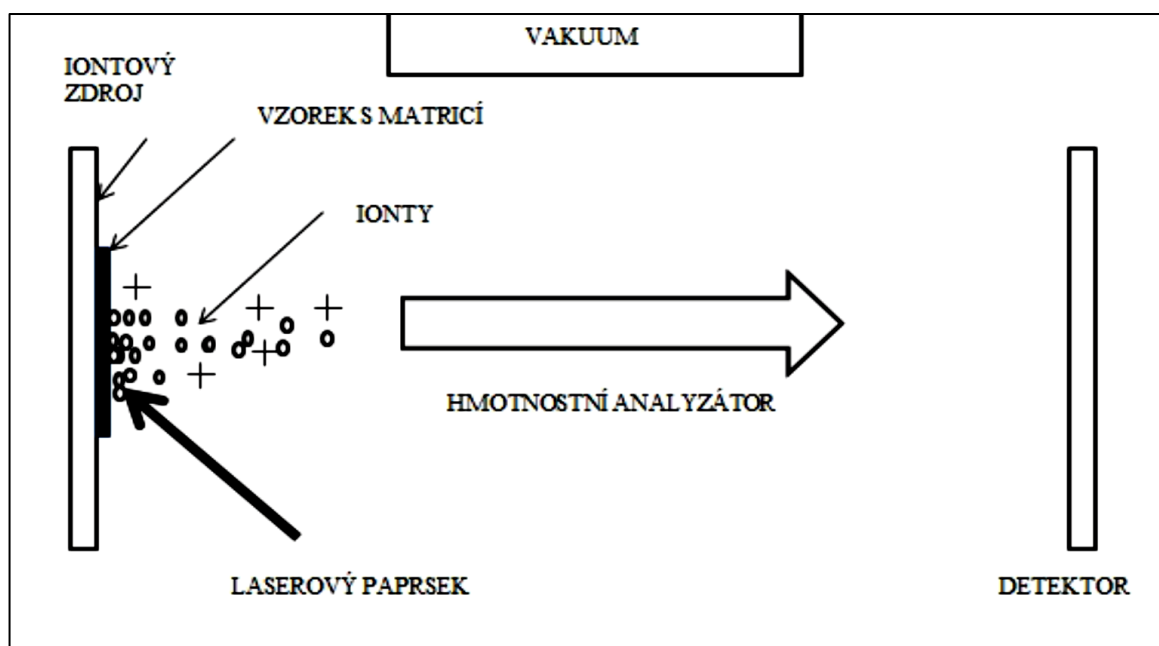
V půdě se většinou vyskytují sporulující bakterie *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, a *C. perfringens*, dále listerie včetně *Listeria monocytogenes*. Zvýšený výskyt bývá zaznamenán v letních měsících. Druhová rozmanitost je zvýšena hnojením pomocí organických hnojiv živočišného původu. Mezi bakterie, které se v těchto hnojivech vyskytují, jsou např. salmonely, patogenní kmeny *Escherichia coli* či *Campylobacter jejuni*. Tyto bakterie mohou v půdě přežít měsíce až roky. Významným zdroje kontaminace je voda, zejména v období před sklizní. V kontaminovaných zdrojích vody, kterou se zelenina zavlažuje, se mohou objevovat stejně jako v půdě střevní bakterie. Mezi velmi rizikové kroky lze zařadit i ruční sklizeň a další manipulace s potravinou, neboť při těchto operacích může docházet ke křížové kontaminaci a množení nežádoucích mikroorganismů. [46]

3.2 Identifikace mikroorganismů pomocí metody MALDI TOF-MS

Hmotnostní spektrometrie je analytická technika, při které se chemické sloučeniny ionizují na nabitě molekuly a měří se poměr jejich hmotnosti k náboji (m/z). Ačkoli byla MS

objevena na počátku 20. století, její rozsah byl omezen na chemické vědy. Vývoj ionizace elektronovým sprejem (ESI) a laserové desorpční ionizace pomocí matrice (MALDI) v 80. letech však zvýšilo použitelnost MS na velké biologické molekuly, jako jsou proteiny. V ESI i MALDI jsou peptidy přeměněny na ionty buď přidáním nebo ztrátou jednoho nebo více než jednoho protonu. Oba jsou založeny na metodách „měkké ionizace“, kdy tvorba iontů nevede k významné ztrátě integrity vzorku. MALDI-TOF MS má oproti ESI-MS určité výhody. MALDI-TOF MS produkuje jednotlivě nabitě ionty, takže interpretace dat je snadno srovnatelná s ESI-MS, avšak pro analýzu pomocí ESI-MS je nutná předchozí separace chromatografií, která není nutná pro analýzu MALDI-TOF MS. [60]

MALDI TOF-MS je metodou, která funguje na principu hmotnostní spektrometrie laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem. Tato metoda je velice přesná, aplikovatelná pro široké spektrum mikroorganismů a rychlejší než spousta tradičních metod. Na obr. 3 je jednoduché schéma MALDI-TOF. Laserové záření je aplikováno na krystaly matrice se vzorkem. Toto záření způsobí desorpci molekul matrice i s molekulami vzorku předáním H^+ od molekul matrice. Poté je aplikováno extrakční napětí mezi MALDI destičku a vstupní štěrbinu průletového analyzátozem, čímž dojde k extrakci nabitých molekul podle zvolené polarizace napětí a k jejich analýze v průletovém hmotnostním analyzátozem. V závislosti na době letu molekul analyzátozem k detektoru se vypočítá poměr m/z . [43]



Obr. 3: Schéma MALDI – TOF hmotnostního spektrometru. [43]

3.3 Nejvýznamnější rody bakterií vyskytující se u zeleniny

3.3.1 *Aeromonas*

Aeromonas je členem čeledi *Vibrionaceae*, který zahrnuje čtyři další rody, jmenovitě *Vibrio*, *Phobobacterium*, *Plesiomonas* a *Enhydrobacter*. *Aeromonas* jsou chemoorganotrofní fakultativní anaerobní gramnegativní tyčinky, které prokazují dýchací i fermentační metabolismus. Bakterie tohoto rodu mohou růst v širokém spektru podmínek prostředí, např. pH od 4 do 10 a optimální hodnotou kolem 7 a koncentraci solí až 6,5 %. Většina z těchto bakterií jsou mezofilní bakterie s optimální teplotou růstu kolem 28 °C. Tato aerobní bakterie bývá přítomna v kazícím se ovoci a zelenině, nevyvolává však onemocnění z potravin. [47]

3.3.2 *Bacillus*

Jednou z nejdůležitějších vlastností pro taxonomii je tvorba spór, protože je snadno detekovatelná. Spóry mohou být detekovány mikroskopicky a poskytují jednoduchou charakteristiku čeledi *Bacillaceae*. Rod *Bacillus* obsahuje mnoho kmenů grampozitivních, tyčinkovitých bakterií, které jsou schopné růst v aerobních a fakultativně anaerobních podmínkách a liší se tak od rodu *Clostridium*, který je přísně anaerobní. V přírodě jsou značně rozšířené a na povrch zeleniny se dostává z půdy. [47]

3.3.3 *Citrobacter*

Jedná se o gramnegativní tyčinky z čeledi *Enterobacteriaceae*. Vyskytují se jako součást mikroflóry trávicího ústrojí lidí a jiných obratlovců, avšak nejsou považovány za střevní patogeny. Vyskytují se taktéž ve splaškové a půdní vodě. Jednotlivé kmeny se nacházejí v mléčných výrobcích, syrovém drůbežím masu a v čerstvé, syrové zelenině. [48]

3.3.4 *Clostridium*

Jedná se o gramnegativní tyčinky, které rostou za přísně anaerobních podmínek a jsou schopny tvořit endospory. [49] Vyskytují se v půdě a ve střevech lidí a zvířat. Některé kmeny jsou patogeny jako např. *Clostridium botulinum* a *C. perfringens*. [48]

3.3.5 *Enterobacter*

Rod *Enterobacter* patří do čeledi *Enterobacteriaceae* a je tvořen kmeny *E. cloacae* a *E. aerogenes*. Jedná se o gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky. Tento rod se

často objevuje ve stolici lidí a zvířat a taktéž je běžně přítomný v potravinách jako jeden z typických členů skupiny koliformních mikroorganismů, avšak není původcem onemocnění z potravin. [44]

3.3.6 *Erwinia*

Rod fakultativně anaerobních tyčinkovitých gramnegativních bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*. Vyskytují se na rostlinách. Mohou vyvolávat nekrózy, nebo jiná poškození rostlin a bývají příčinou kažení plodů a zeleniny během skladování. [48]

3.3.7 *Escherichia*

Rod *Escherichia* je gramnegativní anaerobní tyčinka. Stovky různých kmenů rodu *Escherichia* žijí v lidském trávicím systému, a některé z kmenů jsou schopné produkovat silné toxiny. Enterotoxigenní *Escherichia coli* produkují dva typy enterotoxinu, a to jeden, který je tepelně stabilní a druhý z nich je tepelně labilní. Tepelně stabilní toxin není ničen ani zahříváním na 100 °C po dobu 35 minut. Tepelně labilní toxin, který je však běžnější, je zničen, pokud je vystaven působení 65 °C po dobu 30 min. Některé kmeny *E. coli* jsou známy jako enterohemoragické *E. coli*, také známé jako verotoxin-pozitivní *E. coli*. Jiné kmeny *E. coli* jsou enteropatogenní a enteroinvazivní. *E. coli* vyžaduje pH v rozmezí 4,5 - 8,8 a aktivitu vody nad 0,95. Optimální růst pro *E. coli* nastává při 37 °C a také přežívá zmrazení. [50,76]

3.3.8 *Flavobacterium*

Rod aerobních gramnegativních tyčinek čeledi *Flavobacteriaceae*. Vyskytují se v půdě, vodě, syrovém masu a mléce. Některé kmeny z tohoto rodu byly překlifikovány na *Chryseobacterium*. [48]

3.3.9 *Klebsiella*

Jsou to gramnegativní, obvykle zapouzdřené tyčinky patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Rod *Klebsiella* zahrnuje nejméně sedm v současnosti uznávaných kmenů a 72 sérotypů. Většina z těchto organismů je ekologického původu bez významného dopadu na lidské zdraví, zatímco jiné kmeny stejného rodu pocházejí ze střevního traktu teplokrevných zvířat. Nacházejí se v půdě a vodě a dále jsou rostlinnými patogeny. Pět z nich (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. rhinoscleromatis*, *K. planticola* a *K. ozaenae*) jsou známy jako

klinicky významné z hlediska jejich patogenity. Stejně jako jiné koliformní bakterie i bakterie rodu *Klebsiella* fermentují laktózu. [51]

3.3.10 *Lactobacillus*

Jedná se o dlouhé, grampozitivní, nesporulující tyčinky. Rostou anaerobně až mikroaerofilně při teplotách v rozmezí 5 °C až 53 °C. Většina bakterií rodu *Lactobacillus* důležité v potravinách pravděpodobně pocházejí z rostlinných materiálů. Obvykle jsou spojeny s prostředími obsahujícími velké množství fermentovatelných uhlohydrátů. Kmeny rodu *Lactobacillus* se nacházejí v různých potravinách, zejména v mléčných výrobcích, vakuově baleném masu, konzervované nebo fermentované zelenině a ovoci. [52]

3.3.11 *Micrococcus*

Rod aerobních grampozitivních koků čeledi *Micrococcaceae*. Vyskytují se v půdě, vodě, syrovém mléce, mléčných výrobcích, pivu a na kůži savců. Varianty mikrokoků se používají jako startér při zrání suchých kvašených klobás. Jiné kmeny mohou způsobit kažení masa a vajec. [48]

3.3.12 *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* je zařazen do třídy *Gammaproteobacteria*, která představuje jednu z největších skupin bakterií. Rod *Pseudomonas* je skupinou nesporotvorných pohyblivých gramnegativních tyčinek. Většina těchto bakterií může snadno přežívat v různých potravinách jako ovoce, zelenina, obilí, nebo v krmivech pro zvířata. Vzhledem k tomu, že docela dobře snášejí vlhké prostředí, jsou přítomné ve vodě a v půdě. Některé kmeny rodu *Pseudomonas* jsou tolerantní k široké škále fyzikálně-chemických podmínek. [53]

3.3.13 *Salmonella*

Salmonella je gramnegativní tyčinkovitá bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. *Salmonella* je fakultativně anaerobní, kataláza-pozitivní, oxidáza-negativní, a obecně je pohyblivé s peritrichózní bičíkem. Optimální teplota růstu je při 37 °C, ale tento rod bakterií je schopen růst při teplotách od 5 °C do 47 °C. Tyto bakterie se primárně nacházejí v gastrointestinálním traktu. Mohou být stolicí šířeny do půdy, vody, potravin a krmiv. [56]

3.3.14 *Shigella*

Jedná se o gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky, které jsou pozitivní na katalázu a oxidáza-negativní. Bakterie rodu *Shigella* jsou obecně považovány za spíše ne příliš odolné organismy, které nepřežívají mimo jejich přirozené prostředí, které je ve střevech lidí a jiných primátů. Jsou to typické mezofilní mikroorganismy s rozsahem růstové teploty mezi 10–45 °C s citlivostí na teplo. Nejlépe rostou v rozmezí pH 6-8 a nepřežívají při pH pod 4,5. [56]

3.3.15 *Staphylococcus*

Grampozitivní koky, vyskytující se v shlucích. Tyto bakterie se běžně nacházejí na kůži a sliznicích a některé kmeny mohou způsobovat onemocnění u lidí i zvířat. *S. aureus* může produkovat toxiny, které dráždí gastrointestinální zažívací trakt. Některé kmeny jsou rezistentní k antibiotikům a znesnadňují léčbu stafylokokové infekce. Například některé kmeny meticilin–rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) jsou nyní rezistentní na téměř všechna antibiotika a představují vážnou hrozbu jak pro pacienty v nemocnicích, tak pro jednotlivce v širší komunitě. [57]

3.3.16 *Vibrio*

Jedná se o gramnegativní tyčinky. Patří sem *Vibrio cholerae*, původce alimentárního infekčního onemocnění. Může se nacházet v potravinách zejména z tropických zemí. [44]

3.3.17 *Xanthomonas*

Xanthomonas jsou gramnegativní aerobní tyčinky a koky a původci onemocnění rostlin. Některé kmeny jsou rostlinnými patogeny jako např. *Xanthomonas campestris*, *X. fragariae*, *X. ampelina* a *X. abilineans*. *X. campestris* způsobuje černou hnilobu zelí a kvěťáku. Několik kmenů může způsobit znehodnocení syrového chlazeného masa, ryb a vaječných výrobků. [44,48]

3.4 Nejvýznamnější rody kvasinek vyskytující se u zeleniny

3.4.1 *Candida*

Buňky se objevují v různých formách: kulovité, elipsovité, válcové nebo protáhlé a příležitostně např. trojúhelníkové. Reprodukce probíhá holoblastickým pučením. Většina bakterií rodu *Candida* je mezofilních a rostou dobře při teplotách 25 °C až 30 °C,

s extrémí v rozmezí 0 °C až 48 °C. *Candida*, stejně jako ostatní kvasinky, fotosyntetizuje nebo fixuje dusík. Obecně nemohou růst anaerobně. Některé kmeny přežívají a rozmnožují se při mikroaerofilních podmínkách. Některé kmeny, například *C. apicola*, *C. bombicola*, *C. famata*, *C. magnoliae* a *C. lactis-condensi* jsou osmotolerantní a např. *C. glukosophila* je osmofilní. [47]

3.4.2 *Kloeckera*

Rod mitosporických kvasinek kmene *Ascomycota*, což jsou anamorfy rodu *Hanseniaspora*. Vyskytují se u ovoce a v půdě. *Kloeckera apiculata* se používá při výrobě vína. [57]

3.4.3 *Saccharomyces*

Jedná se o průmyslově důležitý rod kvasinek. Nejméně 1000 kmenů *Saccharomyces cerevisiae* se používá při pečení, vaření, výrobě vína a piva. Další kvasinky používané při výrobě piva zahrnují *S. uvarum* (nebo *S. carlsbergensis*), které se odlišují od *S. cerevisiae* svou schopností k fermentaci disacharidové melibózy pomocí α -galaktosidázy, což je enzym, který *S. cerevisiae* neprodukuje. [57]

3.5 Nejvýznamnější rody plísní vyskytující se u zeleniny

3.5.1 *Alternaria*

Rod *Alternaria* je charakterizován výraznými velkými mnohobuněčnými dictyosporami, které jsou produkovány v řetězcích. Plíseň rodu *Alternaria* se vyskytují jako parazité na řadě plodin, kde způsobují skvrny. [58]

3.5.2 *Cladosporium*

Plísně tohoto rodu se vyskytují u ovoce a zeleniny. *Cladosporium herbarum* může způsobit znehodnocení chlazeného masa. Jiné kmeny mohou být zodpovědné za znehodnocení másla, margarínů, ovoce, zeleniny, vajec a hroznů. [48]

3.5.3 *Fusarium*

Rod *Fusarium* je jedním z nejškodlivějších důležitých plísní díky svým rostlinným patogenům a produkce silných mykotoxinů, které ovlivňují zvířata a lidi. Některé kmeny mohou infikovat lidi. Rod se vyskytuje celosvětově, nicméně ne všechny kmeny jsou kosmopolitní, jako jiné kmeny. Některé převládají v chladnějších mírných oblastech a jiné zase v tropických a subtropických oblastech. Obecně platí, že kmeny rodu *Fusarium* dávají

přednost vlhkosti, tj. aktivita vody vyšší než 0,86, a rostou dobře při teplotách kolem 0 °C až 37 °C. Rod *Fusarium* je termofilní plíseň. Plíseň *F. equiseti* je známá jako sekundární útočník v zemědělství, napadající plodiny po kontaminaci půdy, ve které může přežívat roky, protože hojně produkuje odolné chlamydostry. [47]

3.5.4 *Mucor*

Rod *Mucor* je velmi běžný rod, který se vyznačuje extrémně rychlým růstem na laboratorních médiích. Vytváří velké, vlhké kolonie, které jsou viditelné pouhým okem. Většina kmenů jsou pouze saprofytické nebo slabé patogeny. Jsou zvláště běžné u ovoce a zeleniny. Je známo asi 20 kmenů, které způsobují kažení jídla, a to zejména *Mucor hiemalis* a *M. plumbeus*, které jsou velmi typické. *M. hiemalis* může růst od 0 do 5 °C až do 37 °C. *M. plumbeus* může růst od 4–5 °C do 25 °C a 37 °C, s optimem od 24 °C do 25 °C. Nejnižší aktivita vody pro růst je 0,93. Může také růst za přítomnosti za méně než 1 % kyslíku. [52]

3.5.5 *Penicillium*

Penicillium je velký rod obsahující 150 uznaných kmenů, z toho 50 se vyskytuje běžně. Izolovaných je mnoho kmenů *Penicillium* z potravin, kde způsobují kažení a navíc některé kmeny mohou produkovat bioaktivní sloučeniny s antibiotickými vlastnostmi. Některé kmeny mohou produkovat více než jeden toxin. Jedny z nejdůležitějších toxigenních kmenů v potravinách jsou *P. expansum*, *P. citrinum*, *P. crustosum* a *P. verrucosum*. Plísňe rodu *Penicillium* obvykle rostou optimálně při relativně nízkých teplotách, jsou tedy přítomné v půdě, obilných zrnech a jiných potravinách v mírném podnebí a také v chladírnách a chlazených potravinách po celém světě. Přestože většina těchto plísní upřednostňuje kyslík, tak například *P. roqueforti* je stimulován vysokou (15 %) hladinou oxidu uhličitého a může tolerovat hladiny kyslíku v 1–2 %. [52]

3.5.6 *Phoma*

Některé kmeny (např. *Phoma herbarum* a *P. sorghina*) mohou způsobit znehodnocení ovoce (např. melouny, papája a banány), zelenina (např. řepa), sýr a obiloviny (např. širok, ječmen, kukuřice) a rýže. [48]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

1. stanovení celkových počtů určitých skupin mikroorganismů na selektivně diagnostických půdách,
2. stanovení jednotlivých mikroorganismů vyskytujících se u vzorků listové zeleniny pomocí metody MALDI TOF-MS.

Vzorky, které byly podrobeny analýze, byly získány v obchodních sítích na území Zlínského kraje. V návaznosti na výsledky tohoto testování byla provedena diskuze, kdy jednotlivé vzorky byly porovnávány mezi sebou, s odbornou literaturou, a zároveň s platnou legislativou České republiky a Evropské unie.

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Materiál

5.1.1 Popis analyzovaných vzorků

V praktické části této diplomové práce byly analyzovány vzorky vybraných druhů listové zeleniny, které pocházely z obchodních sítí na území Zlínského kraje. Celkem bylo použito 54 vzorků, kde vzorky č. 1 až 15 byly analyzovány v dubnu roku 2019 (viz Tab. 2), vzorky č. 16 až 35 v srpnu roku 2019 (viz Tab. 3) a vzorky č. 36 až 54 v listopadu roku 2019 (viz Tab. 4).

Tab. 2: Seznam použitých vzorků – jaro 2019

Číslo vzorku	Druh	Původ	Distributor
1	zelí peking	Maďarsko	Velkoobchod (okres Zlín)
2	salát římský	Španělsko	
3	salát hlávkový	Maďarsko	
4	salát Lollo Rosso	Maďarsko	
5	salát Lollo Biondo	Maďarsko	
6	salát bio ledový	Španělsko	
7	salát ledový	Španělsko	
8	salát bio rucola	Itálie	
9	salát bio polníček	Itálie	
10	bio baby špenát	Itálie	
11	salát hlávkový	Česká republika	Maloobchod (okres Vsetín)
12	salát ledový	Česká republika	
13	salát rucola	Itálie (S. Paolo)	Velkoobchod (okres Zlín)
14	baby špenát	Itálie (S. Paolo)	
15	salát polníček	Itálie (S. Paolo)	

Tab. 3: Seznam použitých vzorků – léto 2019

Číslo vzorku	Druh	Původ	Distributor
16	salát Little Gem - červený	Česká republika (Stratov - Polabí)	Velkoobchod (okres Zlín)
17	salát Little Gem - zelený	Česká republika (Stratov - Polabí)	
18	salát Crispy - zelený	Česká republika	
19	salát Crispy - červený	Česká republika	
20	salát Little Gem - zelený	Česká republika	
21	salát Insalatina	Itálie	
22	salát hlávkový	Česká republika	
23	salát ledový	Česká republika	
24	salát Tendita	Česká republika	
25	salát římský	Česká republika	
26	salát Little Gem - zelený	Česká republika (Semice)	
27	Salát ledový	Česká republika (Semice)	
28	Zelí peking	Maďarsko	Maloobchod (okres Vsetín)
29	Zelí peking	Maďarsko	
30	salát ledový	Německo	
31	salát ledový	Slovensko	
32	salát Lollo Rosso	Česká republika (Brno)	
33	salát polníček	Itálie (Bozen)	
34	salát rucola	Itálie (Bozen)	
35	salát polníček	Itálie	Velkoobchod (okres Vsetín)

Tab. 4: Seznam použitých vzorků – podzim 2019

Číslo vzorku	Druh	Původ	Distributor
36	salát rucola	Itálie	Velkoobchod (okres Vsetín)
37	baby špenát	Itálie	
38	salát římský	Španělsko	
39	salát hlávkový	Itálie	
40	salát Lollo Rosso	Itálie	
41	salát Lollo Biondo	Itálie	
42	salát římský	Španělsko	
43	salát římský	Česká republika (Polabí - Na Brůdku)	
44	salát Little Gem - zelený	Španělsko	Velkoobchod (okres Zlín)
45	salát Little Gem - zelený	Španělsko	
46	salát Little Gem - zelený	Španělsko	
47	salát ledový	Španělsko	
48	zelí peking	Česká republika	
49	zelí peking	Česká republika	
50	salát ledový	Česká republika	
51	salát Little Gem - červený	Česká republika (Stratov - Polabí)	
52	salát Little Gem - zelený	Česká republika (Stratov - Polabí)	
53	salát polníček	Maďarsko	
54	salát Tendita	Česká republika	

5.1.2 Laboratorní přístroje

- Automatické mikropipety – (Nichiryo, Japonsko; Eppendorf, Německo)
- Laboratorní sklo a pomůcky
- AURA PCR pracovní box – (BioAir Instruments, Itálie)
- Bio Vortex V1 – (Biotech, Česká republika)
- Homogenizátor Stomacher – (Labsystem Kft, Maďarsko)
- Centrifuga – Hermle Z100M (Labnet Inc., Korea)
- Digitální váha – (Kern & Sohn GmbH, Německo)
- Box laminární, Telstar Bio II – A (KRD, Velká Británie)

- Termostat BT 120 – (LABO-MS spol. s.r.o., Česká republika)
- Autokláv H+P Varioklav – (H+P Labortechnik AG, Německo)
- MALDI TOF hmotnostní spektrometr Microflex LT systém – (Bruker Daltonics, Německo)
- software: MALDI Biotyper 3.0 – (Bruker Daltonics, Německo)

5.1.3 Kultivační média

- Masopeptonový agar (MPA) – (HiMedia Laboratories GmbH, Indie)
- Plate Count Agar (PCA) – (HiMedia Laboratories GmbH, Indie)
- MRS agar (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie)
- Mannitol Salt Agar Base (MSA) – (HiMedia Laboratories GmbH, Indie)
- Violet Red Bile Agar (VRBA) – (HiMedia Laboratories GmbH, Indie)
- Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (CHYGA) – (HiMedia Laboratories GmbH, Indie)

Příprava půd: Předepsaná množství jednotlivých půd byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody. Poté následovala sterilace půd v autoklávu při teplotě 121°C. Půdy byly poté rozlity do Petriho misek.

5.1.4 Chemikálie a roztoky

- Ethanol 98 % (Lach-Ner s.r.o., Česká republika)
- Fyziologický roztok
- Destilovaná voda
- 70 % roztok ethanolu
- 80 % roztok kyseliny trifluoroctové (TFA)
- 70 % kyselina mravenčí
- 100 % acetonitril

5.2 Metody

5.2.1 Příprava vzorků

Z jednotlivých druhů listové zeleniny bylo odebráno $5,0 \pm 0,1$ g vzorku, který byl smíchán s fyziologickým roztokem v poměru 1:9 a homogenizován ve stomacheru po dobu 5 minut. U homogenizovaného vzorku bylo provedeno desítkové ředění a jednotlivá ředění byla použita k očkování v množství 100 μ l na různé druhy půd a to PCA, MSA, VRBA, CHYGA, MRS, BP, M17 a PSE. V rámci práce byl stanoven celkový počet fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů na půdě PCA (podle normy ISO č. 4833-1; 2013), stafylokoků na MSA (dle Chapmana z roku 1945; kultivace na agaru s mannitolem, chloridem sodným a fenolovou červení při 37 °C), koliformních mikroorganismů na půdě VRBA (podle normy ISO č. 21528-2; 2017), plísní a kvasinek na půdě CHYGA (podle normy ISO č. 6611; 2004) a laktobacilů na MRS (podle normy ISO 15214; 2000). Misky s příslušnými půdami byly kultivovány při určitých teplotách (viz Tab. 5). [54,55,61,78,79]

Tab. 5: Sledované mikroorganismy a podmínky jejich kultivace

Kultivační půda	Sledovaná skupina mikroorganismů	Kultivace (teplota, čas)
PCA	celkový počet mikroorganismů	30 °C, 48 h
MSA	stafylokoky	37 °C, 48 h
VRBA	koliformní mikroorganismy	37 °C, 48 h
CHYGA	plísně a kvasinky	pokojeová teplota, 72 h
MRS	laktobacily	anaerostat 30 °C, 72 h
BP	stafylokoky	37 °C, 48 h
M17	laktokoky	30 °C, 48 h
PSE	enterokoky	30 °C, 48 h

Po kultivaci jednotlivých půd byly spočítány počty kolonií a následně vypočítána hodnota kolonie tvořících jednotek (CFU) v 1 g.

5.2.2 MALDI TOF-MS

5.2.2.1 Příprava vzorků na identifikaci pomocí MALDI TOF-MS

Po výpočtu CFU/g byly vybrané kolonie nabrány sterilní kličkou a očkovány křížovým roztěrem na různé typy půd. Izoláty byly dále uchovávány a přeočkovávány pro získání co nejčistší kultury pro další identifikaci. Každý izolát byl přeočkován nejméně 8x.

Příprava izolátů pro identifikaci probíhala tak, že v Eppendorf zkumavce se do 150 μ l sterilní destilované vody, vyžíhanou kličkou rozsuspendovaly kolonie z čerstvě narostlého 24-hodinového agaru a následně bylo přidáno 450 μ l 96 % ethanolu. Takto připravené eppendorfy byly dále použity pro identifikaci pomocí MALDI TOF-MS.

5.2.2.2 Příprava MALDI Matrice

Byl připraven zásobní roztok (ZR) o složení: 50 % acetonitril (AN), 47,5 % voda a 2,5 % trifluoroctová kyselina (TFA). Pro přípravu jednoho ml ZR bylo napipetováno 500 μ l 100 % AN, 475 μ l destilované vody a 25 μ l 100 % TFA do Eppendorf zkumavky a obsah byl důkladně promíchán. Vlastní příprava roztoku MALDI Matrice byla provedena tak, že do jedné Eppendorf zkumavky s „HCCA matrix portioned“ bylo přidáno 250 μ l ZR, a celý obsah byl vortexován, dokud nebyly krystaly matrice úplně rozpuštěny.

Předem připravený vzorek byl centrifugován po dobu 2 minut a následně byl slit supernatant. Poté byl znovu centrifugován a nakonec byl odstraněn zbytek ethanolu pipetováním. K peletu bylo po několika minutovém schnutí při pokojové teplotě přidáno 50 μ l 70 % kyseliny mravenčí a obsah byl důkladně promíchán pipetováním a vortexováním. Dále bylo přidáno 50 μ l AN a směs byla opět důkladně promíchána. Následně byl vzorek centrifugován po dobu dvou minut. Na závěr byl 1 μ l supernatantu nakapán na MALDI destičku. Ihned po zaschnutí supernatantu byl supernatant překryt 1 μ l roztoku MALDI matrice. Po zaschnutí, byl vzorek připraven k identifikaci.

5.2.2.3 Analýza pomocí MALDI TOF-MS

Analýza byla provedena pomocí systému MALDI TOF s hmotnostním spektrometrem Microflex LT. Identifikace mikroorganismů a hmotnostní spektra byly zpracována pomocí systému MALDI Biotyper 3.0. Tento výpočet vychází z porovnání podobnosti profilů naměřených hmotnostním spektrometrem u neznámého vzorku s kmeny, které jsou zaznamenány v referenční knihovně.

5.2.2.4 Interpretace výsledků

Na základě hodnot skóre je později určena rodová a druhová identifikace vzorku. Mezní hodnoty skóre při identifikaci byly v rozmezí 1 až 3, kdy v rozmezí 0,000 – 1,699 šlo o nespolehlivou identifikaci, v rozmezí 1,700 – 1,999 šlo o pravděpodobnou identifikaci na úrovni rodu, v rozmezí 2,000 – 2,299 šlo o s jistotou identifikovaný rod, pravděpodobně i druh a v rozmezí 2,300 – 3,000 šlo o vysokou pravděpodobnost druhové identifikace.

Softwarem byly zaznamenávány dva druhy výsledku v případě nesprávné identifikace a to: nespolehlivá identifikace, nebo žádné píky nenalezeny (nepřítomné měřicí spektrum).

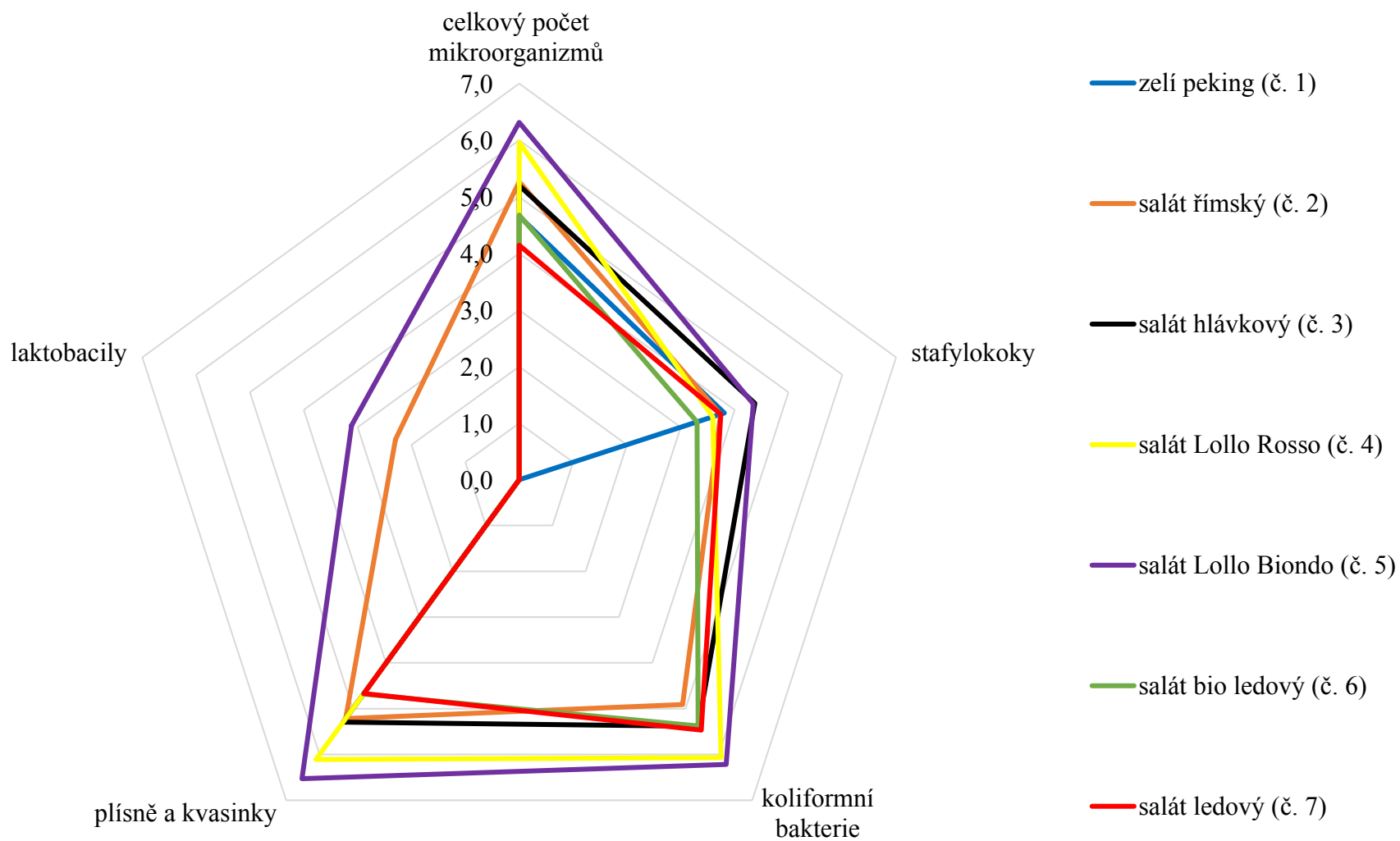
6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Počty mikroorganismů

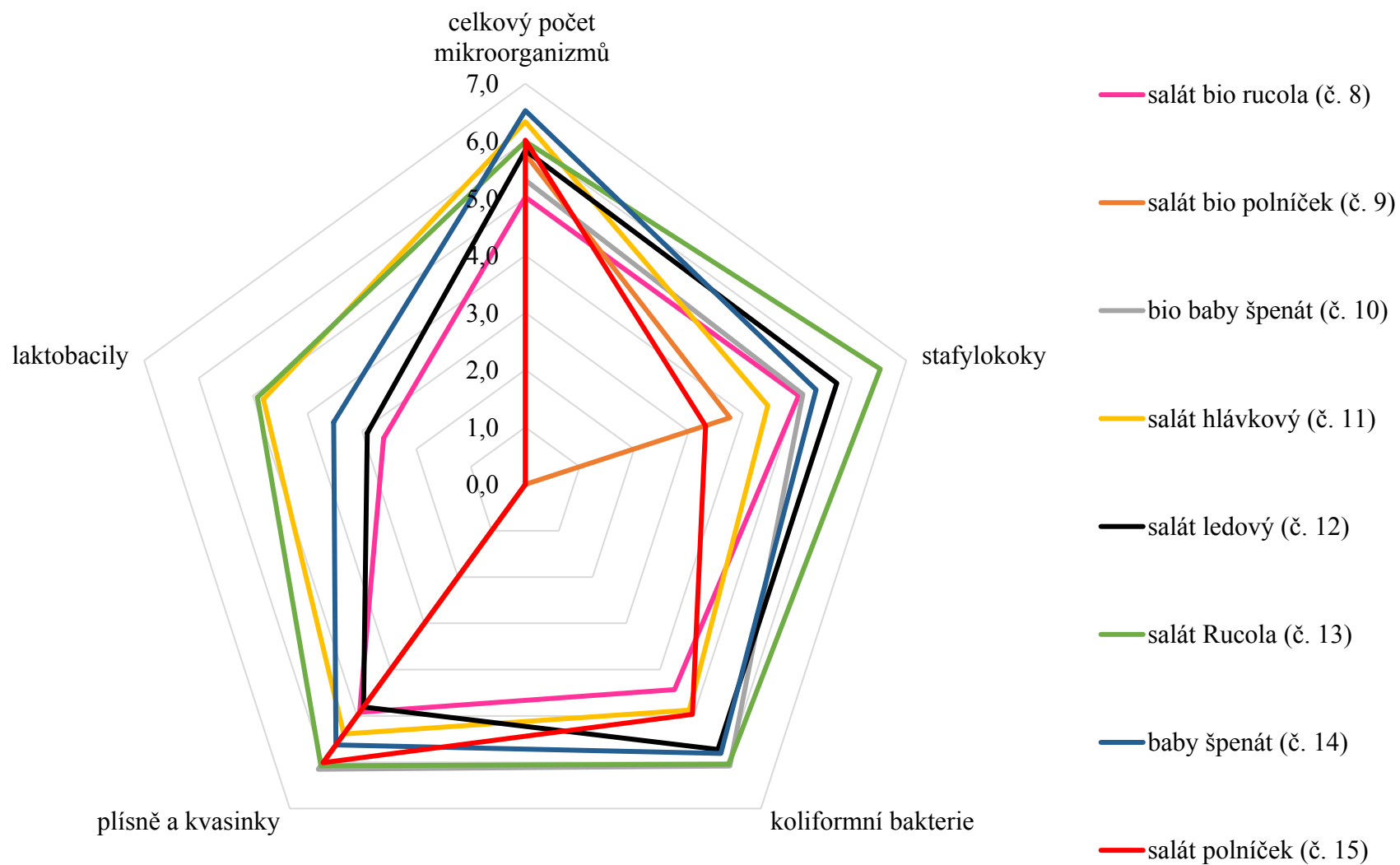
První částí této diplomové práce bylo stanovení počty jednotlivých druhů mikroorganismů vyskytujících se u listové zeleniny celkem 54 vzorků. V příloze č. 1 jsou v souhrnu uvedeny jednotlivé hodnoty CFU/g. Hodnoty byl stanoven celkový počet fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů na půdě PCA, stafylokoků na MSA, koliformních mikroorganismů na půdě VRBA, plísni a kvasinek na půdě CHYGA a laktobacilů na půdě MRS.

6.1.1 Vzorky listové zeleniny izolované na jaře roku 2019

Na jaře roku 2019 bylo shromážděno celkem 15 vzorků listové zeleniny, kdy 13 z nich bylo získáno ve velkoobchodech na území Zlínského okresu a 8 vzorků v maloobchodech na území Vsetínského okresu.



Obr. 4: Izolované skupiny mikroorganismů z jednotlivých půd v log CFU/g (jaro 2019 – 1. polovina)



Obr. 5: Izolované skupiny mikroorganismů z jednotlivých půd v log CFU/g (jaro 2019 – 2. polovina)

Celkový počet mikroorganismů – PCA

Na Obr. 4 a Obr. 5 jsou graficky znázorněny hodnoty log CFU/g u jednotlivých vzorků, které byly izolovány na jaře roku 2019. Nejvyšší celkový počet mikroorganismů byl u vzorku číslo 14, kdy se jednalo o baby špenát s hodnotou $3,4 \cdot 10^6$ CFU/g. Vysoké celkové počty mikroorganismů byly zjištěny u vzorků salát Lollo Biondo (vzorek č. 5), salát hlávkový (vzorek č. 11). U salátu hlávkového byla vypočtena hodnota $2,1 \cdot 10^6$ CFU/g a u salátu Lollo Biondo $2,1 \cdot 10^6$. Nejnižší hodnota byla zjištěna u salátu ledového (vzorek č. 7) a to $1,4 \cdot 10^4$. Celkový počet mikroorganismů může být ovlivněn zejména způsobem balení. Salát hlávkový a salát Lollo Rosso byly distribuovány nebalené, zatímco ledový salát byl zabalen ve fólii. Barros-Velázquez (2016) popisuje balení jako jeden z klíčových prvků pro zachování kvality, prodloužení životnosti a zajištění mikrobiální bezpečnosti čerstvé a minimálně zpracované produkty. [62]

Počet stafylokoků – MSA

Nejvyšší počet stafylokoků z prvních 15 vzorků (viz Obr. 4, Obr. 5) byl zjištěn u vzorku číslo 13. Jedná se o vzorek salátu rucoly původem z Itálie, kde byla vypočtena hodnota $3,3 \cdot 10^6$ CFU/g. Podle normy ČSN 56 9609, která popisuje mikrobiologická kritéria pro potraviny, je stanovena nejvyšší mezní hodnota 10^4 v g pro *Staphylococcus aureus* a další kmeny koaguláza-pozitivních stafylokoků v potravinách určených k přímé spotřebě. [63] Tato hodnota byla překročena i u dalších 3 vzorků, kterými jsou bio baby špenát (vzorek č. 10) s hodnotou $1,3 \cdot 10^5$ CFU/g, salát ledový (vzorek č. 12) s hodnotou $5,3 \cdot 10^5$ CFU/g a baby špenát (vzorek č. 14) s hodnotou $2,2 \cdot 10^5$ CFU/g. Nejnižší hodnota byla zjištěna u salátu bio ledového (vzorek č. 6) s hodnotou $2,0 \cdot 10^3$ CFU/g.

Počet koliformních bakterií - VRBA

Počet koliformních bakterií u prvních 15 vzorků (viz Obr. 4, Obr. 5) byl velmi variabilní. U vzorků zelí peking (vzorek č. 1) a vzorku salát bio polníček (vzorek č. 9) na selektivní půdě VRBA nebyla zjištěna přítomnost této skupiny mikroorganismů. Podle normy ČSN 56 9609, která popisuje mikrobiologická kritéria pro potraviny, definuje potraviny určené k přímé spotřebě takto: „potraviny určené k přímé spotřebě, kterými se rozumějí potraviny v nezměněném stavu, potraviny tepelně opracované, které se spotřebují v teplém nebo studeném stavu nebo po mikrovlnném ohřevu, potraviny upravené ke spotřebě očištěním, omytím, oloupáním, okrájením, usušením, okyselením, fermentací a potraviny, které mají být podle návodu výrobce před spotřebou smíchány s teplou nebo studenou tekutinou“.

Pro tuto skupinu potravin je určena přípustná hodnota pro koliformní bakterie jako *Escherichia coli* a to 10^4 v 1 g vzorku. [63] Vzhledem k tomu, že celkové počty koliformních bakterií zahrnují různé kmeny koliformních bakterií, nelze s jistotou tvrdit dle použité půdy, zda některé vzorky tuto hodnotu překročily. Nejvyšší hodnota byla zjištěna u salátu Lollo Biondo (vzorek č. 5) a to $1,7 \cdot 10^6$ CFU/g. Naopak nejnižší u salátu bio rucoly (vzorek č. 8) a to $2,7 \cdot 10^4$ CFU/g.

Počet plísní a kvasinek - CHYGA

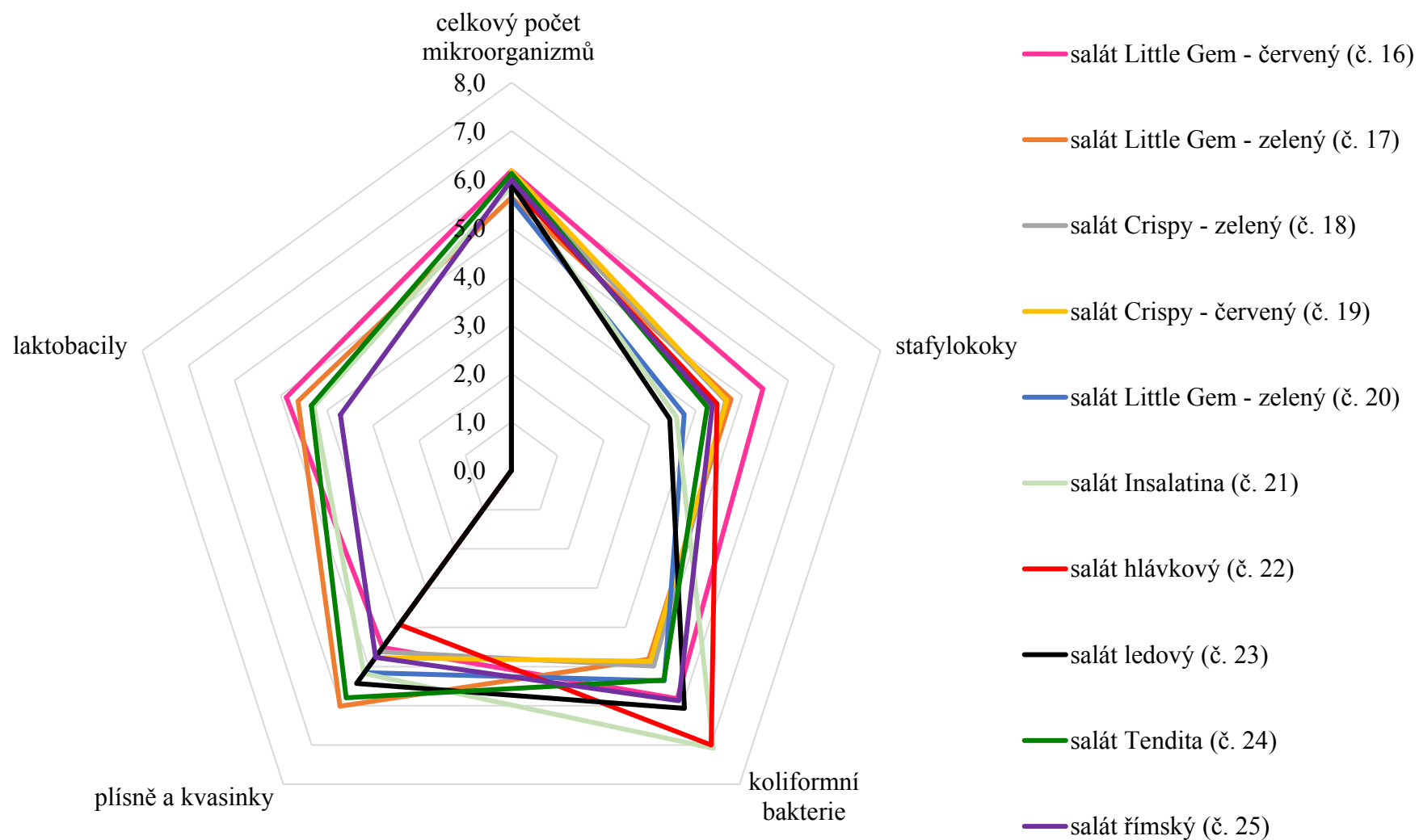
Nejnižší počet plísní a kvasinek (viz Obr. 4, Obr. 5) byl zjištěn u zelí peking a to hodnota $1,1 \cdot 10^4$ CFU/g. Jde o vzorek č. 1. Nejvyšší hodnota byla u salátu Lollo Biondo (vzorek č. 5) a to $3,4 \cdot 10^6$ CFU/g. Quansah a kol. (2018) uvádějí výsledky studie pro městskou oblast v Accra Metropolis, Ghana, kde byla popsána mikrobiální jakost listové zeleniny izolací salmonely a stanovením aerobních bakterií, kvasinek a plísní, fekálních koliformních bakterií a enterokoků. Počet plísní a kvasinek byl u této zeleniny stanoven na hodnotu $1,8 \cdot 10^4$ CFU/g. [66] Výsledky z této studie jsou řádově shodné, jako výsledky této diplomové práce.

Počet laktobacilů – MRS

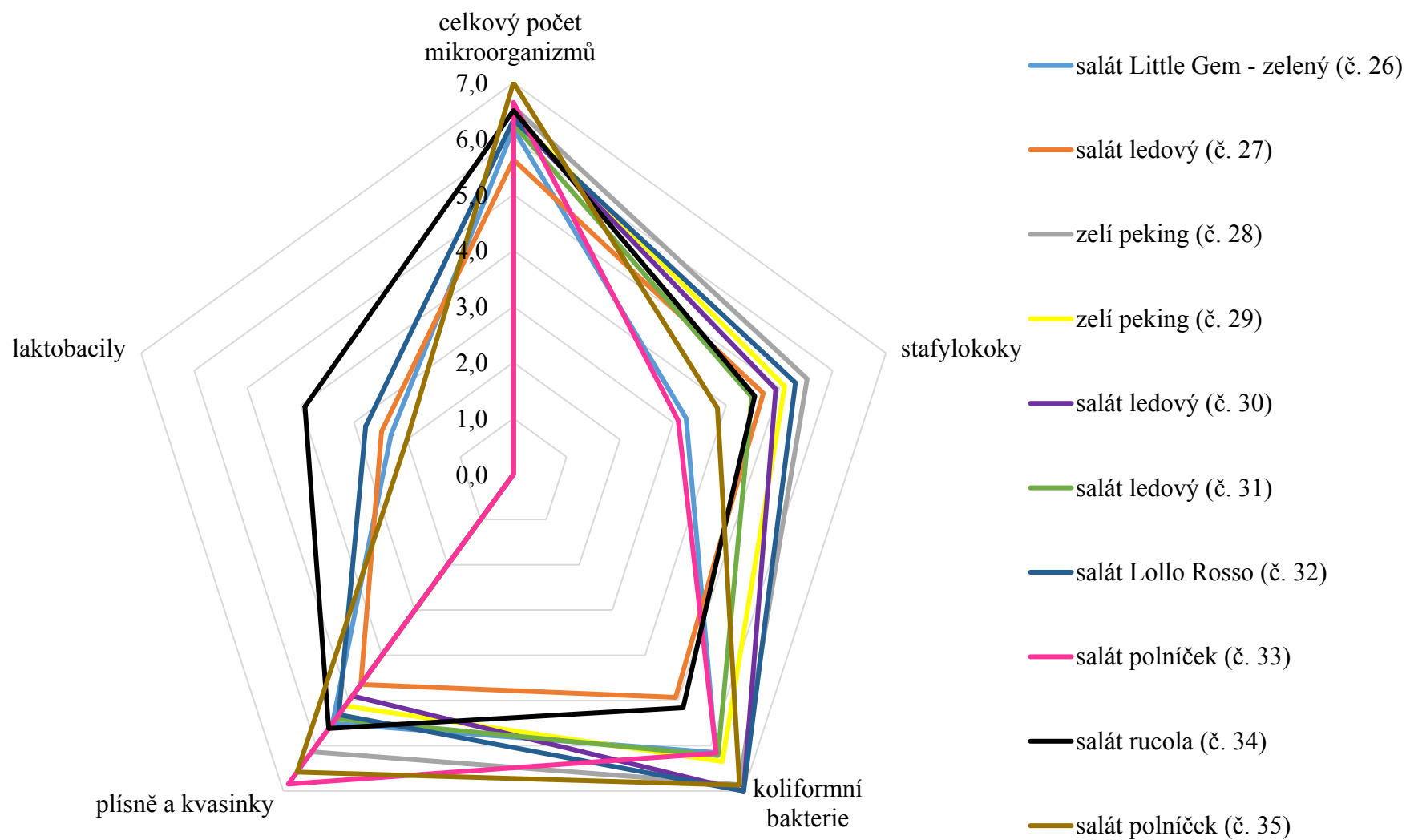
Hodnoty počtu laktobacilů byly zjištěny pouze u 7 vzorků, kterými jsou salát římský (vzorek č. 2) s hodnotou $2,0 \cdot 10^2$ CFU/g, salát Lollo Biondo (vzorek č. 5) s hodnotou $1,3 \cdot 10^3$ CFU/g, salát bio rucola (vzorek č. 8) s hodnotou $4,0 \cdot 10^2$ CFU/g, salát hlávkový (vzorek č. 11) s hodnotou $6,4 \cdot 10^4$ CFU/g, salát ledový (vzorek č. 12) s hodnotou $8,0 \cdot 10^2$ CFU/g, salát rucola (vzorek č. 13) s hodnotou $8,3 \cdot 10^4$ CFU/g a baby špenát (vzorek č. 14) s hodnotou $3,3 \cdot 10^3$ CFU/g. Nejvyšší hodnota byla zjištěna u vzorku salát rucola (vzorek č. 13) a nejnižší u vzorku salát římský (vzorek č. 2). Počet laktobacilů je mnoha studii stanoven u různých druhů zeleniny, a to zejména u fermentovaných druhů, ne však u zeleniny listové. Bylo by proto velmi zajímavé v této problematice pokračovat a provést analýzy zaměřené zejména na přítomnost laktobacilů u listové zeleniny.

6.1.2 Vzorky listové zeleniny izolované v létě roku 2019

V létě roku 2019 bylo shromážděno celkem 20 vzorků listové zeleniny, kdy 10 z nich bylo získáno ve velkoobchodech na území Zlínského okresu, 8 vzorků v maloobchodech na území Vsetínského okresu a 2 vzorky byly získány ve velkoobchodech na území Vsetínského okresu.



Obr. 6: Izolované skupiny mikroorganismů z jednotlivých půd v log CFU/g (léto 2019 – 1. polovina)



Obr. 7: Izolované skupiny mikroorganismů z jednotlivých půd v log CFU/g (léto 2019 – 2. polovina)

Celkový počet mikroorganismů – PCA

Z Obr. 6 a Obr. 7 je zřejmé, že hodnota celkového počtu mikroorganismů se příliš neliší a pohybuje se v řádech 10^5 – 10^6 CFU/g. Pingulkar a kol. (2009) uvádějí výsledky studie z města Bombaj v Indii, kde bylo testováno 26 vzorků listové zeleniny, se hodnota celkového počtu mikroorganismů pohybovala v rozmezí 10^6 – 10^8 CFU/g. [64] Tato hodnota byla vyšší, což může být způsobeno podmínkami při skladování a distribuci. Nejvyšší hodnota byla zjištěna u vzorku salát polníček (vzorek č. 35) původem z Itálie a to $4,5 \cdot 10^6$ CFU/g. Nejnižší hodnota byla u salátu ledového (vzorek č. 27) a to $4,2 \cdot 10^5$ CFU/g. Ve srovnání se vzorkem č. 7 (viz Obr. 4), kde se jednalo také o salát ledový, je tato hodnota o řád vyšší. Může to být způsobeno ročním obdobím, ve kterém byly vzorky zakoupeny. Vzorek č. 27 byl zakoupen v létě roku 2019, zatímco vzorek č. 7 byl zakoupen na jaře roku 2019, kde je teplota obecně nižší, a ne příliš přívětivá pro růst některých skupin mikroorganismů.

Počet stafylokoků – MSA

Z Obr. 6 a Obr. 7 je patrné, že nejvyšší hodnota stafylokoků byla zjištěna u vzorku zelí peking (vzorek č. 28) původem z Maďarska. Vypočtená hodnota u tohoto vzorku byla $3,3 \cdot 10^5$ CFU/g. Další vysokými hodnotami byly hodnoty u salátu Little Gem – červený (vzorek č. 16) $2,8 \cdot 10^5$ CFU/g, zelí peking (vzorek č. 29) $1,2 \cdot 10^5$ CFU/g a u vzorku salátu Lollo Rosso (vzorek č. 32) $2,0 \cdot 10^5$ CFU/g. U těchto tří vzorků byla překročena přípustná hodnota 10^4 CFU/g, která je uvedena v normě ČSN 56 9609, která popisuje mikrobiologická kritéria pro potraviny. [63] Faour-Klingbeil a kol. (2016) sledovali mikrobiologickou jakost 90 vzorků salátové zeleniny z farem v rozvojových zemích. Byl stanoven počet stafylokoků na $2,5 \cdot 10^8$ CFU/g. [65] Ve srovnání s výsledky analyzovaných vzorků této diplomové práce byly v rámci studie dle Faour-Klingbeil a kol. (2016) zjištěny poměrně vysoké počty stafylokoků.

Počet koliformních bakterií - VRBA

Nejnižší hodnota byla zjištěna u vzorku salátu Little Gem - zelený (vzorek č. 17) s hodnotou $6,5 \cdot 10^4$ CFU/g. Dále je zřejmé, že nejvyšší hodnota byla u vzorku salátu Insalatina (vzorek č. 21) a to $1,2 \cdot 10^7$ CFU/g. Quansah a kol. (2018) porovnávali vzorky listové zeleniny získané z farem a z různých marketů. Počet fekálních koliformních bakterií u vzorků, které byly získány přímo z farem byla hodnota nižší než u vzorku z marketů. CFU/g u vzorků z farem se pohybovalo kolem $2,1 \cdot 10^4$ CFU/g. A vzorky

z marketů měly CFU/g kolem $1,8 \cdot 10^5$. V různých studiích bylo zjištěno, že půdy kontaminované v důsledku předchozí expozice nedostatečně nebo nekompostovaným hnojem mohou vést ke kontaminaci zeleniny. Byly analyzovány fekální koliformní formy v nedostatečně kompostovaném drůbežím hnoji a salátu pěstovaném na půdě obohacené hnojem. Hladina fekálních koliformních bakterií v nedostatečně kompostovaném drůbežím hnoji byla shledána srovnatelnou s úrovní bakterií na listové zelené zelenině. [66]

Počet plísní a kvasinek - CHYGA

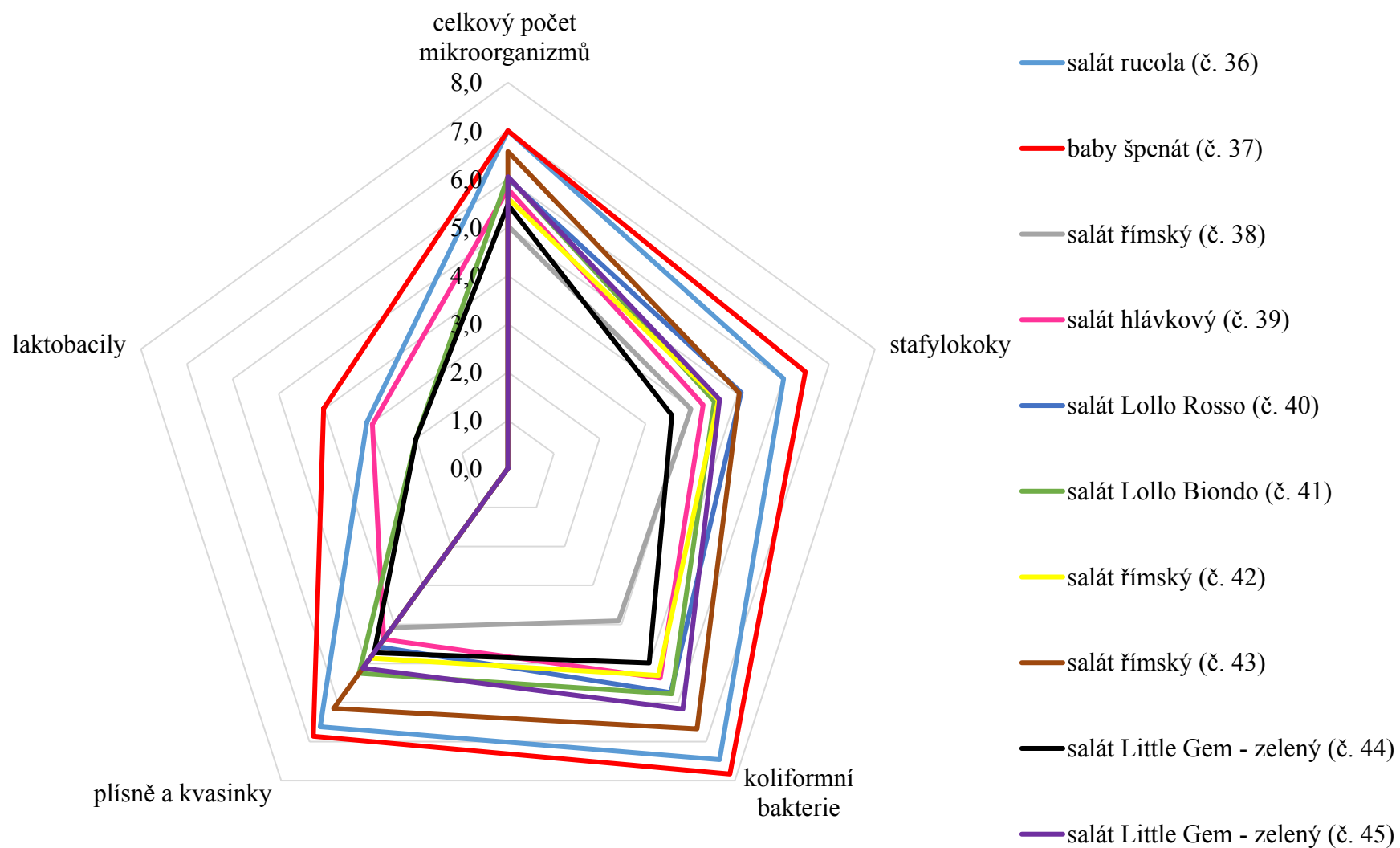
Nejvyšší hodnota u vzorku salátu polníček (vzorek č. 33) a to $7,1 \cdot 10^6$ CFU/g. Nejnižší hodnota byla zjištěna u vzorků na salátu hlávkového (vzorek č. 22) s hodnotou $8,5 \cdot 10^3$ CFU/g. Szczech a kol. (2018) uvádějí výsledky studie, kdy během vegetačního období 2010–2014 bylo z certifikovaných farem odebráno 600 organických a 372 konvenčních vzorků. Zelenina byla analyzována na aerobní mezofilní bakterie, kvasinky a plísně, *Enterobacteriaceae*, koliformy a *Escherichia coli* podle polských standardů. Farmářský průzkum byl proveden s cílem shromáždit informace o postupech řízení farem. Počet kvasinek a plísní byl podobný pro organické a konvenční kultivační systémy. U kvasinek a plísní byla zjištěna hodnota pro organický systém pěstování $1,2 \cdot 10^5$ CFU/g a pro konvenční $6,3 \cdot 10^4$ CFU/g. [67] V normě ČSN 56 9609, která popisuje mikrobiologická kritéria pro potraviny, jsou stanoveny nejvyšší mezní hodnoty (NMH) pro kvasinky 10^7 na g a pro plísně je NMH stanovena jako „růst plísní viditelný pouhým okem“. [63]

Počet laktobacilů - MRS

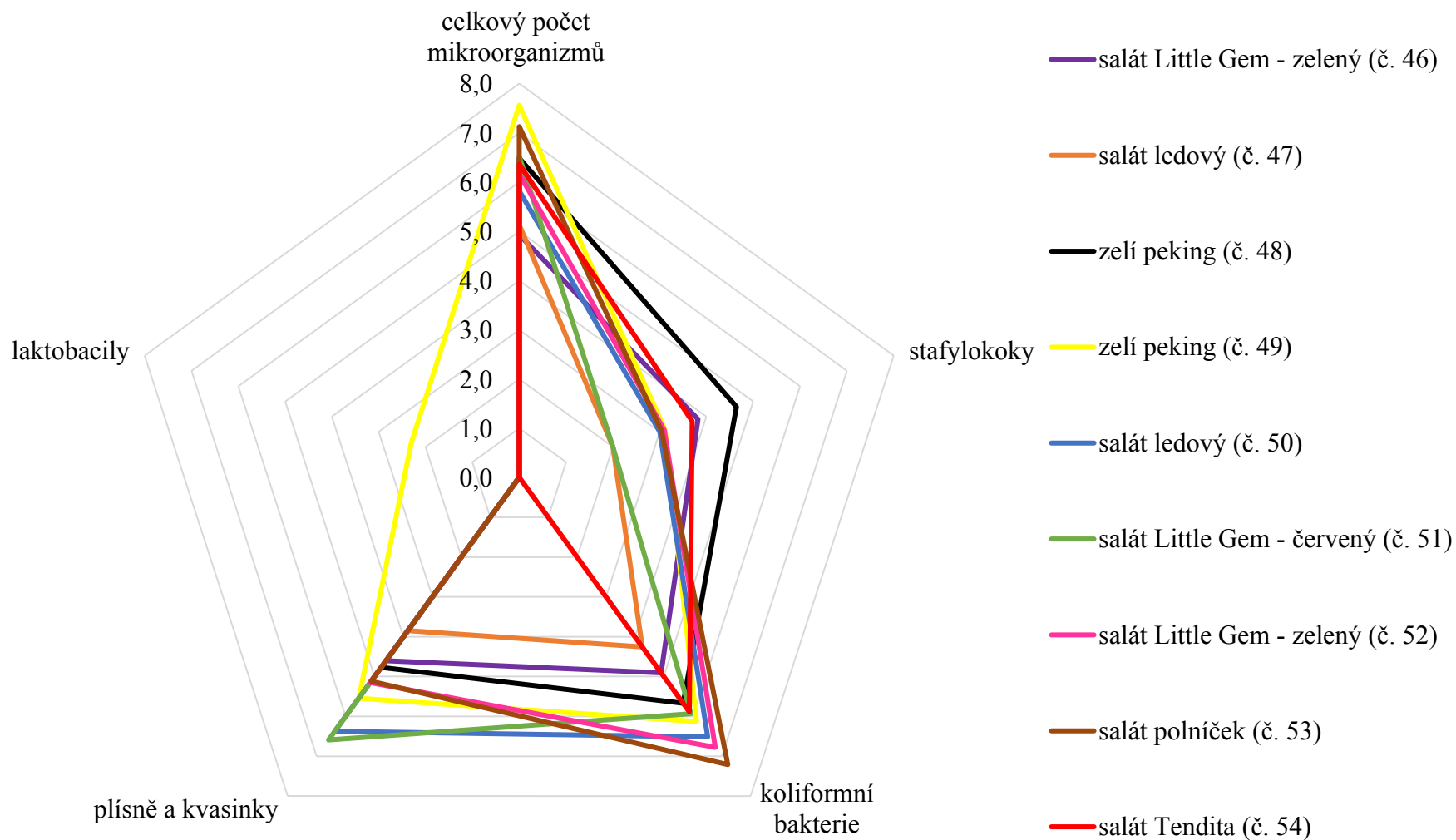
Z Obr. 6 a Obr. 7 byly zjištěny hodnoty CFU/g pouze u vzorku salát Little Gem – červený (vzorek č. 16) s hodnotou $7,6 \cdot 10^4$ CFU/g, vzorku salát Little Gem – zelený (vzorek č. 17) s hodnotou $4,2 \cdot 10^4$ CFU/g, vzorku salát Insalatina (vzorek č. 21) s hodnotou $1,9 \cdot 10^4$ CFU/g, vzorku salát Tendita (vzorek č. 24) s hodnotou $2,2 \cdot 10^4$ CFU/g, vzorku salát římský (vzorek č. 25) s hodnotou $5,1 \cdot 10^3$ CFU/g, vzorku salát Little Gem – zelený (vzorek č. 26) s hodnotou $2,0 \cdot 10^2$ CFU/g, vzorku salát ledový (vzorek č. 27) s hodnotou $3,0 \cdot 10^2$ CFU/g, vzorku salát Lollo Rosso (vzorek č. 32) s hodnotou $6,0 \cdot 10^2$ CFU/g, vzorku salát rucola (vzorek č. 34) s hodnotou $8,3 \cdot 10^3$ CFU/g a u vzorku salát polníček (vzorek č. 35) - $1,0 \cdot 10^2$ CFU/g. Nejvyšší hodnota byla hodnota u vzorku salát Little Gem – červený (vzorek č. 16) a nejnižší u vzorku salát polníček (vzorek č. 35).

6.1.3 Vzorky listové zeleniny izolované na podzim roku 2019

Na podzim roku 2019 bylo shromážděno celkem 19 vzorků listové zeleniny, kdy 9 z nich bylo získáno ve velkoobchodech na území Vsetínského okresu. Dalších 10 vzorků bylo získáno ve velkoobchodech na území Zlínského okresu.



Obr. 8: Izolované skupiny mikroorganismů z jednotlivých pūd v log CFU/g (podzim 2019 – 1. polovina)



Obr. 9: Izolované skupiny mikroorganismů z jednotlivých pūd v log CFU/g (podzim 2019 – 2. polovina)

Celkový počet mikroorganismů – PCA

Celkový počet mikroorganismů Nejvyšší počet mikroorganismů z Obr. 8 a Obr. 9 byl zjištěn u vzorku zelí peking (vzorek č. 49). Hodnota u tohoto vzorku byla $3,6 \cdot 10^7$ CFU/g. Tato hodnota byla ze všech 54 vzorků nejvyšší. Vzorek pocházel z farmy v České republice a distributorem byl velkoobchod v okrese Zlín. Görner a Valík (2004) uvádějí, že vysoký obsah celkových počtů mikroorganismů může být způsoben nežádoucím množением mikroorganismů z důvodu nepřiměřené doby skladování. [80] Další vzorky, u nichž byla výpočtem určena vysoká hodnota, a to u vzorku salát rucola (vzorek č. 36) a baby špenát (vzorek č. 37). Z Obr. 8 a Obr. 9 byla zjištěna nejnižší hodnota u vzorku salát Little Gem – zelený (vzorek č. 46) s hodnotou $8,5 \cdot 10^4$ CFU/g. Tato hodnota byla ze všech vzorků nejnižší.

Počet stafylokoků – MSA

Nejvyšší hodnota 3 byla zjištěna u vzorku baby špenát (vzorek č. 37) a to hodnota $3,1 \cdot 10^6$ CFU/g. Tato hodnota překračuje přípustnou hodnotu 10^4 CFU/g dle normy ČSN 56 9609, která popisuje mikrobiologická kritéria pro potraviny. [63] Dalšími vzorky, které překračují přípustnou hodnotu, jsou vzorky salát rucola (vzorek č. 36) s hodnotou $1,0 \cdot 10^6$ CFU/g, vzorek salát Lollo Rosso (vzorek č. 40) s hodnotou $1,2 \cdot 10^5$ CFU/g a vzorek salát římský (vzorek č. 43) s hodnotou $1,1 \cdot 10^5$ CFU/g. Nejnižší hodnoty byly vypočteny u vzorků salát ledový (vzorek č. 47) a salát Little Gem – červený (vzorek č. 51). U obou vzorků byla zjištěna stejná hodnota $1,0 \cdot 10^2$ CFU/g.

Počet koliformních bakterií - VRBA

Na Obr. 8 byla nejvyšší hodnota u vzorku baby špenát (vzorek č. 37) a to $6,8 \cdot 10^7$ CFU/g. Další vysoká hodnota pro počet koliformních bakterií byla u vzorků salát rucola (vzorek č. 36) $2,9 \cdot 10^7$ CFU/g a salát polníček (vzorek č. 53) $1,6 \cdot 10^7$ CFU/g. Nejnižší hodnotou z Obr. 8 a Obr. 9 byla hodnota vzorku salát římský (vzorek č. 38) a to $8,0 \cdot 10^3$ CFU/g. Zároveň byla nejnižší hodnotou ze všech 54 vzorků. Tento vzorek byl původem ze Španělska a distributorem byla velkoobchodní síť v okrese Vsetín.

Počet plísní a kvasinek - CHYGA

Nejnižší hodnota z Obr. 8 a Obr. 9 byla zjištěna u vzorku salát ledový (vzorek č. 47) s hodnotou $7,0 \cdot 10^3$ CFU/g. Moreira a kol. (2003) popsali změny v populaci kvasinek a plísní u listové zeleniny produkované organickými i konvenčními metodami. Počáteční populace kvasinek a plísní se pohybovaly v rozmezí $1 - 3 \cdot 10^4$ CFU/g pro organický

i konvenční mangold. Podobné hodnoty uvádí i další studie. Do 25. dne skladování byly populace kvasinek a plísní v organicky produkované listové zelenině $1,5 - 6 \cdot 10^6$ CFU/g. U konvenčně pěstované bylo nalezeno mírně vyšší rozmezí $5 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^7$ CFU/g. [68] Z Obr. 8 a Obr. 9 je zřejmé, že nejvyšší hodnota byla zjištěna u vzorku baby špenát (vzorek č. 37) s hodnotou $7,3 \cdot 10^6$ CFU/g. Pokud tuto hodnotu porovnáme se studií, tak je možné, že vzorek baby špenátu byl taktéž po delší dobu skladován, neboť hodnota CFU/g pro kvasinky byla vyšší.

Počet laktobacilů – MRS

Obr. 8 a Obr. 9 je zřejmé, že počet laktobacilů byl zjištěn u pouze 5 vzorků. Jedná se o vzorek salát rucola (vzorek č. 36) s hodnotou $1,2 \cdot 10^3$ CFU/g, vzorek baby špenát (vzorek č. 37) s hodnotou $1,0 \cdot 10^4$ CFU/g, vzorek salát římský (vzorek č. 39) s hodnotou $9,0 \cdot 10^2$ CFU/g, vzorek salát Lollo Biondo (vzorek č. 41) s hodnotou $1,0 \cdot 10^2$ CFU/g, vzorek salát Little Gem - zelený (vzorek č. 44) s hodnotou $1,0 \cdot 10^2$ CFU/g a vzorek zelí peking (vzorek č. 49) - $2,0 \cdot 10^2$ CFU/g. Nejvyšší hodnota byla u vzorku baby špenát (vzorek č. 37) a nejnižší u vzorku salát Lollo Biondo (vzorek č. 41) a salát Little Gem – zelený (vzorek č. 44).

Porovnání výsledků podle období jaro, léto, podzim

Nejvyšší celkový počet mikroorganismů (CPM) ze všech 54 vzorků byl zjištěn u zelí peking (vzorek č. 49) s hodnotou $3,6 \cdot 10^7$ CFU/g. Tento vzorek byl získán na podzim roku 2019. V tomto období se hodnoty CFU/g pohybovaly v rozmezí od 10^4 do 10^7 CFU/g. Ve srovnání s obdobím jara, kde se hodnoty pohybovaly v rozmezí od 10^4 do 10^6 CFU/g a ve srovnání s obdobím léta s hodnotami od 10^5 do 10^6 CFU/g, byly celkové počty mikroorganismů řádově nejrozmanitější. Nejvyšší počet stafylokoků byl zjištěn u vzorku salát rucola (vzorek č. 13) $3,3 \cdot 10^6$ CFU/g. Vzorek byl analyzován na jaře roku 2019. Vzorky ze všech období měly řádově stejné hodnoty a to od 10^3 do 10^6 CFU/g. Z těchto výsledků lze říci, že roční období nemá zásadní vliv na počet stafylokoků u zeleniny. Nejvyšší počet koliformních bakterií a nejvyšší počet pro plísně a kvasinky byly ze všech 54 vzorků stanoveny u vzorku baby špenát (vzorek č. 37) a to s hodnotou $6,8 \cdot 10^7$ CFU/g pro počet koliformních bakterií a $7,3 \cdot 10^6$ CFU/g pro počet plísní a kvasinek. Tento vzorek byl získán na podzim roku 2019. Stejně jako u CPM byly podzimní hodnoty ze všech období řádově nejvariabilnější. Nejvyšší počet laktobacilů byl u vzorku salát Little Gem – červený (vzorek č. 16) s hodnotou $7,6 \cdot 10^4$ CFU/g.

6.2 Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI TOF-MS

V této části diplomové práce byly izolovány jednotlivé kolonie, které byly identifikovány pomocí MALDI TOF-MS. Celkem bylo identifikováno 106 izolátů z 54 vzorků listové zeleniny. Jednotlivé izoláty ve vztahu k vzorků jsou uvedeny v příloze č. 2. Bylo získáno celkem 103 izolátů bakteriálních kmenů, kde 103 bakterií bylo dále rozděleno do 28 rodů a 17 čeledí (viz Tab. 6). Kvasinky byly identifikovány pouze v počtu 3 izolátů, patřící do jedné čeledi i rodu. Přítomnost plísní nebyla identifikací prokázána.

Tab. 6: Taxonomie rodů izolovaných ze vzorků listové zeleniny.

Doména	Čeď	Rod	Počet izolátů
Bakterie	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pantoea</i>	13
		<i>Enterobacter</i>	7
		<i>Salmonella</i>	3
		<i>Citrobacter</i>	3
		<i>Klebsiella</i>	2
		<i>Escherichia</i>	2
		<i>Serratia</i>	2
		<i>Raoultella</i>	1
		<i>Cronobacter</i>	1
		<i>Ewingella</i>	1
	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	2
		<i>Oceanobacillus</i>	1
	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Pseudarthrobacter</i>	1
		<i>Kocuria</i>	1
	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	19
	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	18
	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	7
	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	4
	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Chryseobacterium</i>	3
	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	2
	<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	2
	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	2
	<i>Tremellaceae</i>	<i>Cryptococcus</i>	1
<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingobium</i>	1	
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Curtobacterium</i>	1	
<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Achromobacter</i>	1	
<i>Listeriaceae</i>	<i>Listeria</i>	1	
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Weissella</i>	1	
Kvasinky	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Candida</i>	3

Z bakterií měla největší rodové zastoupení čeleď *Enterobacteriaceae*, kde bylo izolováno celkem 10 rodů a to *Pantoea* (13 izolátů), *Enterobacter* (7 izolátů), *Salmonella* (3 izoláty), *Citrobacter* (3 izoláty), *Klebsiella* (2 izoláty), *Escherichia* (2 izoláty), *Serratia* (2 izoláty), *Raoultella* (1 izolát), *Cronobacter* (1 izolát) a *Ewingella* (1 izolát). Celkem bylo identifikováno 35 izolátů z čeledi *Enterobacteriaceae*.

Největší počet izolátů byly bakterie rodu *Pantoea* a to zejména kmen *Pantoea agglomerans*. Tyto bakterie byly izolovány ze vzorků salát hlávkový (vzorek č. 3), salát ledový (vzorek č. 7), salát bio rucola (vzorek č. 8), salát rucola (vzorek č. 13), salát Insalatina (vzorek č. 21), salát ledový (vzorek č. 23), salát Tendita (vzorek č. 24), salát římský (vzorek č. 25), salát Little Gem – zelený (vzorek č. 26), salát ledový (vzorek č. 30). Výskyt *Pantoea agglomerans* byl poměrně vysoký. Al-Holy a kol. (2013) uvádějí výsledky z oblasti Saudské Arábie, kde potvrzují taktéž velké množství bakteriálních kmenů rodu *Pantoea*, vyskytující se u listové zeleniny. [72]

Z rodu *Salmonella* byly získány celkem 3 kmeny ze vzorků salát bio polníček (vzorek č. 9), salát hlávkový (vzorek č. 11) a salát ledový (vzorek č. 23). Dle platné legislativy, kterou nyní je nařízení ES č. 2073/2005 nesmí být salmonely přítomné ve 25 g vzorku. [33] Vzhledem k tomuto limitu lze konstatovat, že vzorky salát bio polníček (vzorek č. 9), salát hlávkový (vzorek č. 11) a salát ledový (vzorek č. 23) tuto podmínku nesplňují. Aytac a kol. (2010) sledovali bakterie rodu *Salmonella* jako kontaminantu listové zeleniny produkované v městských a příměstských zemědělských polích s přirozeným zavlažováním. Celkem 164 vzorků obsahujících různé listové zelené zeleniny bylo náhodně odebraných z okolních zemědělských polí v těsné blízkosti Ankary v době 8 měsíců mezi dubnem 2007 a listopadem 2007. Dva saláty byly na salmonelu pozitivní. [69] Dle platné legislativy, kterou nyní je nařízení ES č. 2073/2005 nesmí být salmonely přítomné ve 25 g vzorku. [33]

V listové zelenině byly taktéž tři kmeny rodu *Citrobacter* a to *Citrobacter koseri* u vzorků baby špenát (vzorek č. 14), salát ledový (vzorek č. 30), salát ledový (vzorek č. 31). Dále pak byly izolovány bakterie rodu *Escherichia*. Tango a kol. (2014) uvádějí, že *E. coli* se často používá jako indikátor kontaminace, a proto byla zahrnuta do nařízení Evropské unie týkající se čerstvých produktů k přímé spotřebě zeleniny jako mikrobiální ukazatel kvality zpracování. [73] *Escherichia coli* byla identifikována u dvou vzorků, a to u vzorku salát Lollo Rosso (vzorek č. 4) a salát bio polníček (vzorek č. 9). Kim a kol. (2016) analyzovali 60 vzorků salátů. Ze 17 agarových destiček obsahujících domnělé kolonie *Escherichia coli*

byla potvrzena pouze jedna destička s *Escherichia coli*. Všechny 16 falešně pozitivních izolátů bylo identifikováno jako bakterie rodu *Citrobacter*, které tvořily kolonie podobné *Escherichia coli*. [70]

Dále byly z čeledi *Enterobacteriaceae* izolovány dva rody bakterií *Serratia* a *Ewingella*. Rod *Serratia* a zejména kmen *Serratia fonticola* byl zjištěn u vzorku č. 13, kde se jedná o Rucolu a u vzorku č. 24, kde se jedná o salát Tendita.

U dvou vzorků byla zjištěna přítomnost bakterií rodu *Bacillaceae*. U vzorku salát Little Gem – zelený (vzorek č. 52) byly izolovány kmeny *Bacillus simplex*, *Bacillus megaterium*. Tylšová a kol. (2016) uvádějí, že *Bacillus cereus* je typický kontaminant zeleniny pocházející z půdy. [46]

Hojně zastoupeným rodem byl rod *Staphylococcus*. Identifikací bylo určeno celkem 19 izolátů. Jednotlivé kmeny byly identifikovány u různých vzorků. Kmen *Staphylococcus hominis* byl identifikován u vzorků zelí peking (vzorek č. 1), salát bio rucola (vzorek č. 8) a salát ledový (vzorek č. 12). Kmen *Staphylococcus simulans* byl identifikován u vzorků salát římský (vzorek č. 2), salát ledový (vzorek č. 12) a salát Little Gem – zelený (vzorek č. 52). Kmen *Staphylococcus xylosus* byl identifikován u vzorku salát bio ledový (vzorek č. 6). Kmen *Staphylococcus equorum* byl identifikován u vzorku salát bio rucola (vzorek č. 8) a salát Little Gem – zelený (vzorek č. 17). Kmen *Staphylococcus warneri* byl identifikován u vzorku salát polníček (vzorek č. 15) a salát Tendita (vzorek č. 54). Kmen *Staphylococcus epidermidis* byl identifikován u vzorku salát Crispy – zelený (vzorek č. 18), salát Crispy – červený (vzorek č. 19). Kmen *Staphylococcus lugdunensis* byl identifikován u vzorku salát Crispy – zelený (vzorek č. 18). Kmen *Staphylococcus pasteurii* byl identifikován u vzorku salát hlávkový (vzorek č. 22). Kmen *Staphylococcus haemolyticus* byl identifikován u vzorku salát Little Gem – červený (vzorek č. 51).

Zajímavým výsledkem bylo zjištění, že rod *Staphylococcus* se objevoval u vzorků v bio kvalitě, které jsou obecně považovány za zdravější alternativy. Stejně tak se dělo i u dalších bakterií, které by se neměly u zeleniny vyskytovat. V protikladu k tomuto tvrzení se zároveň objevují hypotézy, že zelenina z ekologických pěstíren obsahuje vyšší množství patogenů ve srovnání s konvenčním systémem pěstování. Tango a kol. (2014) provedli velkou studii, která popřela tuto hypotézu, kdy byla shromažďována listová zelenina pěstovaná v organických a konvenčních systémech z různých oblastí v Koreji a zkoumána pomocí standardních kultivačních metod pro srovnání mikrobiologické kvality produktu pěstovaného ve dvou zemědělských systémech. 354 vzorků této listové zeleniny

bylo analyzováno na hladiny indikátorových bakterií (aerobní bakterie, koliformní formy a *Escherichia coli*) a prevalenci patogenů *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* a *Salmonella*. Aerobní bakterie a koliformy byly detekovány ve všech druzích zeleniny, ale nepatogenní *E. coli* byla ve všech vzorcích pod limitem detekce. *B. cereus* byl nejčastějším patogenem, který byl nalezen u 7 ze 63 organických vzorků špenátu. Prevalence *S. aureus* byla nejvyšší v organických sezamových listech; bylo zjištěno u 5 z 63 vzorků. Prevalence *L. monocytogenes* byla nejvyšší u ekologického římského salátu a špenátu; bylo nalezeno ve 4 z 63 vzorků každého druhu zeleniny. *E. coli* O157: H7 byla identifikována pouze u 1 z 55 konvenčních vzorků špenátu. Tyto výsledky naznačují, že typ chovu ovlivňuje hygienickou jakost listové zeleniny jen nepatrně a na oblast odběru vzorků nebyl zjištěn žádný účinek. [73]

Dalším hojně zastoupeným rodem byl rod *Pseudomonas* a *Acinetobacter*. Z rodu *Pseudomonas* bylo získáno celkem 18 izolátů. Mezi izoláty byly například kmeny *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas libanensis*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas lutea* a další. Tyto izoláty byly získány např. ze vzorků salát římský (vzorek č. 2), salát Lollo Rosso (vzorek č. 4), salát bio polníček (vzorek č. 9), salát hlávkový (vzorek č. 22) a salát ledový (vzorek č. 50). Z rodu *Acinetobacter* bylo získáno celkem 7 izolátů s kmeny *Acinetobacter junii* a *Acinetobacter calcoaceticus* ze vzorků salát Little Gem – červený (vzorek č. 16), salát Little Gem – zelený (vzorek č. 17), salát ledový (vzorek č. 23) a salát Tendita (vzorek č. 54). Federico a kol. (2015) zhodnotili účinnost antimikrobiálních peptidů při potlačování mikrobiálních rostlinných kazů za podmínek skladování v chladu. Celkem 48 bakteriálních izolátů bylo odebráno ze zeleniny připravené k jídlu a bylo identifikováno, že se jedná o kmeny *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas media*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas jessenii*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas putida*, a *Pseudomonasoneae peaudonasonae*. Tato studie potvrzuje, že tyto dva bakteriální kmeny jsou hojně zastoupenou bakterií, vyskytující se u listové zeleniny. [74]

Méně zastoupeny byly rody *Chryseobacterium*, *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Cryptococcus*, *Sphingobium*, *Curtobacterium*, *Achromobacter*, *Listeria* a *Weissella*.

Ze vzorků byly získány kvasinky rodu *Candida* patřící do čeledi *Saccharomycetaceae*. Kmen *Candida kefyr* byl izolován ze vzorku salát římský (vzorek č. 25) a ze vzorku zelí peking (vzorek č. 49). Kmen *Candida parapsilosis* byl získán ze vzorku číslo 32 Lollo

Rosso. Neexistuje mnoho studií, které by prokazovali běžnou přítomnost kvasinek rodu *Candida* na listové zelenině. Oboh a kol. (2006) uvádějí výsledky studie týkající se listové zeleniny *Struchium sparganophora*, což je zelená listová zelenina, která se v Nigérii hojně používá v polévkových přípravcích ve zpracovaných a nezpracovaných formách. Ethanolický extrakt z listu obsahuje alkaloidy, tanin, saponiny, flobatannin, antrachinon a glykosidy; dále má extrakt vysokou antioxidační aktivitu. Extrakt inhiboval růst některých patogenních bakterií a hub jako *Candida albicans*, *Penicillium* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, které byly na této zelenině identifikovány. [75] Podle této studie kvasinky nejsou příliš odolným mikroorganizmem, což dokazuje i tato diplomová práce, kde z celkem 106 izolátů byly identifikovány pouze 3 kmeny kvasinek.

ZÁVĚR

Mikrobiologická jakost je pojem, který pojednává o tom, do jaké míry je určitá potravina kontaminována mikroorganismy. Charakteristika mikroorganismů je nezbytná pro odhad skladovatelnosti, vhodnost k lidské spotřebě, nebo k potvrzení, že daná potravina splňuje některé mikrobiologické kritérium.

Cílem této diplomové práce byla obecná charakteristika mikroorganismů, které se na listové zelenině vyskytují a mohou tak negativně působit na její mikrobiologickou jakost. Existuje mnoho cest, které vedou ke kontaminaci ať už v průběhu produkce, nebo v průběhu distribuce těchto druhů zeleniny.

Analýza byla provedena u celkem 54 vzorků listové zeleniny získané v maloobchodních a velkoobchodních sítích na území okresu Vsetín a okresu Zlín.

První částí bylo zjištění celkového počtu mikroorganismů, a počet mikroorganismů u dalších skupin jako stafylokoky, koliformní mikroorganismy, plísně a kvasinky a laktobacily. Z této analýzy byl nejvyšší celkový počet mikroorganismů zjištěn u vzorku zelí peking (vzorek č. 49) s hodnotou $3,6 \cdot 10^7$ CFU/g. Nejvyšší počet stafylokoků byl zjištěn u vzorku salát rucola (vzorek č. 13) $3,3 \cdot 10^6$ CFU/g. Nejvyšší počet koliformních bakterií u vzorku baby špenát (vzorek č. 37) a to $6,8 \cdot 10^7$ CFU/g. Nejvyšší hodnota pro plísně a kvasinky byla zjištěna u vzorku baby špenát (vzorek č. 37) s hodnotou $7,3 \cdot 10^6$ CFU/g. Nejvyšší počet laktobacilů byl u vzorku salát Little Gem – červený (vzorek č. 16) s hodnotou $7,6 \cdot 10^4$ CFU/g. Vzorky zelí peking (vzorek č. 49) a baby špenát (vzorek č. 37) byly analyzovány na podzim roku 2019, což bylo období, kdy byly počty jednotlivých skupin mikroorganismů jako CPM, počty koliformních bakterií a počty plísní a kvasinek, poměrně vysoké. Dle platné legislativy (ČSN 56 9609) počty kvasinek a plísní nepřekročily nejvyšší mezní hodnoty, avšak např. v rámci počtu stafylokoků byly u některých vzorků nejvyšší mezní hodnoty mírně vyšší.

Druhou částí této diplomové práce byla identifikace jednotlivých mikroorganismů pomocí metody MALDI TOF-MS. Celkem bylo ze vzorků získáno 106 izolátů, kde identifikací bylo zjištěno, že se jednalo o 103 bakteriálních kmenů a 3 kmeny kvasinek. Při identifikaci byl zjištěn velký počet bakteriálních kmenů rodu *Staphylococcus* v počtu 19 izolátů, *Pseudomonas* v počtu 18 izolátů, *Enterobacter* v počtu 7 izolátů a *Pantoea* v počtu 13 izolátů. Velmi zajímavým výsledkem byla přítomnost *Escherichia coli*, neboť se jedná

o bakterii, která se běžně vyskytuje zejména v trávicím traktu lidí a zvířat. Dále byly identifikovány kvasinky rodu *Candida*.

Dalším pozoruhodným výsledkem bylo stanovení počtů laktobacilů u celkem 23 z 54 vzorků. Neexistují téměř žádné studie, které by uváděly a potvrzovaly přítomnost těchto mikroorganismů u listové zeleniny, a proto by bylo zajímavé v tomto výzkumu nadále pokračovat.

Závěrem lze konstatovat, že i přes to, že se zelenina řadí mezi zdravé a velmi preferované potraviny, mohou se u ní objevovat i různé druhy patogenních a podmíněně patogenních mikroorganismů, které by mohly negativně ovlivnit lidské zdraví, a proto je důležité, aby tyto mikroorganismy byly u listové zeleniny sledovány.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KYRIACOU M. C. a Y. ROUPHAEL. Towards a new definition of quality for fresh fruits and vegetables. *Scientia Horticulturae*. 2018, 234, 463-469. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.09.046. ISSN 03044238. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423817305988>
- [2] ALVAREZ M.V., M. del R. MOREIRA, S.I. ROURA, J.F. AYALA-ZAVALA a G.A. GONZÁLEZ-AGUILAR. Using natural antimicrobials to enhance the safety and quality of fresh and processed fruits and vegetables. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Elsevier, 2015, 2015, s. 287-313. DOI: 10.1016/B978-1-78242-034-7.00013-X. ISBN 9781782420347. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978178242034700013X>
- [3] GARRETT E.H., J.R. GORNY, L.R. BEUCHAT, J.N. FARBER, L.J. HARRIS, M.E. PARISH, T.V. SUSLOW a F.F. BUSTA. Microbiological Safety of Fresh and Fresh-Cut Produce: Description of the Situation and Economic Impact. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2003, 2(s1), 13-37. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00029.x. ISSN 1541-4337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00029.x>
- [4] MAHAJAN R., S. CHANDEL a G. GOEL. A Review on the Implications of Interaction Between Human Pathogenic Bacteria and the Host on Food Quality and Disease. *Food Safety and Preservation*. Elsevier, 2018, 2018, s. 457-479. DOI: 10.1016/B978-0-12-814956-0.00015-9. ISBN 9780128149560. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128149560000159>
- [5] WOOLEY D. P. a K. B. BYERS, ed. *Biological safety principles and practices*. 5th edition. Washington, DC: ASM Press, [2017]. ISBN 978-1-55581-620-9.
- [6] GÖRNER F. a L. VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN 80-967064-9-7
- [7] STRINGER M. a C. DENNIS. *Chilled foods: a comprehensive guide*. 2nd ed. Cambridge, England: Woodhead, 2000. ISBN 0849308569

- [8] CRITTENDEN J. C. *Water treatment principles and design*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: J. Wiley, c2005. ISBN 0-471-11018-3.
- [9] FELLOWS, P. *Food processing technology: principles and practice*. 4th ed. United Kingdom, Boston, MA: Woodhead Publishing/Elsevier Science, [2016]. ISBN 978-0-08-101907-8
- [10] ČSN ISO 11036 (560034) *A Senzorická analýza - Metodologie - Profil textury*. Praha: Český normalizační institut, 1997. Dostupné také: <http://csnonline.agentura-cas.cz/>
- [11] BHATTACHARYA S. *Conventional and advanced food processing technologies*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2014. ISBN 978-1-118-40632-8
- [12] AHVENAINEN R. *Novel Food Packaging Techniques*. Woodhead Publishing. ISBN 978-1-85573-675-7
- [13] KIM M. J., Y. MOON, J. C. TOU, B. MOU a N. L. WATERLAND. Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*. 2016, 49, 19-34. DOI: 10.1016/j.jfca.2016.03.004. ISSN 08891575. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157516300230>
- [14] KETNAWA S., J. SUWANNACHOT a Y. OGAWA. In vitro gastrointestinal digestion of crisphead lettuce: Changes in bioactive compounds and antioxidant potential. *Food Chemistry*. 2020, 311. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125885. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814619320230>
- [15] LLANA-RUÍZ-CABELLO M., M. PUERTO, S. PICHARDO, N.T. JIMÉNEZ-MORILLO, J.M. BERMÚDEZ, S. AUCEJO, A.M. CAMEAN a J.A. GONZÁLEZ-PÉREZ. Preservation of phytosterol and PUFA during ready-to-eat lettuce shelf-life in active bio-package. *Food Packaging and Shelf Life*. 2019, 22. DOI: 10.1016/j.fpsl.2019.100410. ISSN 22142894. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214289418302369>
- [16] SAINI R. K., X. M. SHANG, E. Y. KO, J. H. CHOI, D. KIM a Y.-S. KEUM. Characterization of nutritionally important phytoconstituents in minimally processed ready-to-eat baby-leaf vegetables using HPLC–DAD and GC–MS. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2016, 10(2), 341-349. DOI: 10.1007/s11694-016-9312-5. ISSN 2193-4126. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11694-016-9312-5>

- [17] FONTANA J., J. TRNKA, P. MAĎA, P. IVÁK a kolektiv: Přeměna látek a energie v buňce. In: Funkce buněk a lidského těla: Multimediální skripta
- [18] *Referenční hodnoty pro příjem živin*. V ČR 1. vyd. Praha: Společnost pro výživu, 2011. ISBN 978-80-254-6987-3.
- [19] VELÍŠEK J. a J. HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozšíř. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [20] MICHAJLOVIČ-SKORŇAKOV S. a kolektiv. *Zelená kuchyně*. Praha: Lidové nakladatelství, 1985, 399 s. ISBN 80-7022-042-2.
- [21] KOPEC K. *Zelenina ve výživě člověka*. Praha: Grada, 2010. Zdraví & životní styl. ISBN 978-80-247-2845-2
- [22] KOPEC K. *Tabulky nutričních hodnot ovoce a zeleniny*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1998. ISBN 80-86153-64-9
- [23] MOTARJEMI Y. a H. LELIEVELD. *Food safety management: a practical guide for the the food Industry*. Amsterdam: Academic Press, [2014]. ISBN 978-0-12-381504-0.
- [24] ČESKO. Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. In: *Zákony pro lidi.cz* © AION CS 2010-2020 [cit. 5. 5. 2020]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-110>
- [25] ČESKO. Zákon č. 252/1997 Sb., o zemědělství. In: *Zákony pro lidi.cz* © AION CS 2010-2020. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-252>
- [26] ČESKO. Zákon č. 242/2000 Sb., o ekologickém zemědělství a o změně zákona č. 368/1992 Sb., o správních poplatcích, ve znění pozdějších předpisů. In: *Zákony pro lidi.cz* © AION CS 2010-2020. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2000-242>
- [27] ČESKO. Zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů. In: *Zákony pro lidi.cz* © AION CS 2010-2020. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2004-326>
- [28] ČESKO. Zákon č. 408/2000 Sb., o ochraně práv k odrůdám rostlin a o změně zákona č. 92/1996 Sb., o odrůdách, osivu a sadbě pěstovaných rostlin, ve znění pozdějších předpisů, (zákon o ochraně práv k odrůdám). In: *Zákony pro lidi.cz* © AION CS 2010-2020. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2000-408>

- [29] ČESKO. Zákon č. 477/2001 Sb., o obalech a o změně některých zákonů (zákon o obalech). In: *Zákony pro lidi.cz* © AION CS 2010-2020. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2001-477>
- [30] ČESKO. Zákon č. 156/1998 Sb., o hnojivech, pomocných půdních látkách, pomocných rostlinných přípravcích a substrátech a o agrochemickém zkoušení zemědělských půd (zákon o hnojivech). In: *Zákony pro lidi.cz* © AION CS 2010-2020. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1998-156>
- [31] ČESKO. Zákon č. 219/2003 Sb., o uvádění do oběhu osiva a sadby pěstovaných rostlin a o změně některých zákonů (zákon o oběhu osiva a sadby). In: *Zákony pro lidi.cz* © AION CS 2010-2020. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-219>
- [32] ČESKO. Zákon č. 395/2009 Sb., o významné tržní síle při prodeji zemědělských a potravinářských produktů a jejím zneužití. In: *Zákony pro lidi.cz* © AION CS 2010-2020. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2009-395>
- [33] Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. In: *Úřední věstník L 338*, 22.12.2005, s. 1-26.
- [34] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) C. 396/2005 ze dne 23. února 2005 o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu a o změně směrnice Rady 91/414/EHS. In: *Úřední věstník L 70*, 16.3.2005, s. 1-16.
- [35] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004 ze dne 29. dubna 2004 o hygieně potravin. In: *Úřední věstník L 139*, 30.4.2004, s. 1-54.
- [36] SCHAFFNER D. W. *Microbial risk analysis of foods*. Washington, D.C.: ASM Press, c2008. ISBN 978-1-55581-461-8.
- [37] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 ze dne 28. ledna 2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin. In: *Úřední věstník L 31*, 1.2.2002, s. 1-24.
- [38] KUTZ M. *Handbook of Farm, Dairy and Food Machinery Engineering (3rd Edition)*. Elsevier Science. 2019. ISBN 978-0-1281-4803-7

- [39] GRUMEZESCU A. M., A. M. HOLBAN. *Food Safety and Preservation - Modern Biological Approaches to Improving Consumer Health*. Elsevier. 2018. ISBN 978-0-12-814956-0
- [40] HAMM W., R. J. HAMILTON, G. CALLIAUW. *Edible Oil Processing (2nd Edition)*. John Wiley & Sons. 2013. ISBN 978-1-4443-3684-9
- [41] BARBOSA-CÁNOVAS G. V. a kolektiv. *Handling and preservation of fruits and vegetables by combined methods for rural areas: technical manual*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003. ISBN 92-5-104861-4.
- [42] GIL M. I., M. V. SELMA, F. LÓPEZ-GÁLVEZ a A. ALLENDE. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, 134(1-2), 37-45. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.021. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816050900289X>
- [43] HUONG T. T., M. KOMINKOVA, R. GURAN, a kolektiv. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. 2014 (II), 64-66. ISSN 2336-3940. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0214/dmicrobial_identification_by_maldi-tof_ms.html
- [44] VEVERKA K. *Mikrobiologická kvalita čerstvého ovoce a zeleniny*. Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí. 2003. Dostupné z: http://www.phytopsanitary.org/projekt_y/2003/vvf-18-03.pdf
- [45] DILBAGHI N., S. SHARMA. Food spoilage, food infections and intoxications caused by microorganisms and methods for their detection. *Food and Industrial Microbiology*. 2007. Dostupné z: <http://nsdl.niscair.res.in/jspui/bitstream/123456789/386/2/FoodSpoilage.pdf>
- [46] TYLŠOVÁ P., J. BUBENÍKOVÁ a Š. BURSOVÁ. MIKROBIOLOGIE POTRAVIN ROSTLINNÉHO PŮVODU. Brno, 2016, 1-30. Dostupné z: https://fvhe.vfu.cz/files/mikrobiologie-potravin-rostlinneho-puvodu_studijni-text.pdf
- [47] ROBINSON R. K. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier. 2000. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0051JFH9/encyclopedia-food-microbiology>

[48] International Food Information Service. *Dictionary of Food Science and Technology (2nd Edition)*. International Food Information Service (IFIS Publishing). 2009. ISBN 978-1-4051-8740-4

Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpDFSTE001/dictionary-food-science/dictionary-food-science>

[49] FLICKINGER M. C. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology, Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. John Wiley & Sons. 2010. ISBN 978-0-471-79930-6

Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0087OB71/encyclopedia-industrial>

[50] FEINER G. *Meat Products Handbook - Practical Science and Technology*. Woodhead Publishing. ISBN 978-1-84569-050-2. 2006. Dostupné z:

<https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMPHPST0H/meat-products-handbook/meat-products-handbook>

[51] N/A. *Waterborne Pathogens - Manual of Water Supply Practices, M48 (2nd Edition)*. American Water Works Association (AWWA). 2006. ISBN 978-1-58321-403-9.

Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpWPMWSPMC/waterborne-pathogens/waterborne-pathogens>

[52] WAREING P., F. STUART, R. FERNANDES. *Micro-Facts - The Working Companion for Food Microbiologists (7th Edition)*. Royal Society of Chemistry. 2010 ISBN 978-1-905224-84-5 Dostupné z:

<https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMFTWCFM1/micro-facts-working-companion/micro-facts-working-companion>

[53] MOTARJEMI Y., M. GERALD, T. EWEN. *Encyclopedia of Food Safety*. Elsevier. 2014. ISBN 978-0-12-378612-8.

Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpEFS00001/encyclopedia-food-safety/encyclopedia-food-safety>

[54] ISO 4833-1: 2013. *Microbiology of the Food Chain – Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms – Part 1: Colony Count at 30 Degrees C by the Pour Plate Technique*.

[55] CHAPMAN, G., H. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *Journal of Bacteriology*. 1945, 50(2), 201-203.

- [56] ADAMS M. R., M. O. MOSS, P. J. McCLURE. *Food Microbiology (4th Edition)*. Royal Society of Chemistry. 2016. ISBN 978-1-84973-960-3. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFME00042/food-microbiology-4th/food-microbiology-4th>
- [57] DAINTITH J., MARTIN E. *Dictionary of Science (6th Edition)*. Oxford University Press. 2010. ISBN 978-0-19-956146-9. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpDSE00001/dictionary-science-6th/dictionary-science-6th>
- [58] YATES M. V., C. H. NAKATSU, R. V. MILLER, S. D. PILLAI. (2016). *Manual of Environmental Microbiology (4th Edition)*. American Society for Microbiology (ASM). 2016. ISBN 978-1-55581-602-5. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMEME0014/manual-environmental/manual-environmental>
- [59] MEDLÍK, V. *Bezpečnost potravin – téma, které nevybledne*. Perspektivy jakosti, 2006, 3, 5-7.
- [60] SINGHAL N., M. KUMAR, P. K. KANAUIA a J. S. VIRDI. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 6. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00791. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00791/abstract>
- [61] ISO 21528-2: 2017. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Methods for the Detection and Enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony Count Method*.
- [62] BARROS-VELÁZQUEZ J. *Antimicrobial Food Packaging*. Elsevier. 2016 ISBN 978-0-12-800723-5. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpAFP0001P/antimicrobial-food-packaging/antimicrobial-food-packaging>
- [63] ČSN 56 9609 *Pravidla správné hygienické a výrobní praxe - Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace: Guides to good hygiene and manufacturing practice - Microbiological criteria for food. Principles for the establishment and application*. Praha: Český normalizační institut, c2008.

[64] PINGULKAR K., A. KAMAT, D. BONGIRW. Microbiological quality of fresh leafy vegetables, salad components and ready-to-eat salads: an evidence of inhibition of *Listeria monocytogenes* in tomatoes. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2009, 52(1), 15-23. DOI: 10.1080/09637480020027219. ISSN 0963-7486. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09637480020027219>

[65] FAOUR-KLINGBEIL D., M. MURTADA, V. KURI a E. C. D. TODD. Understanding the routes of contamination of ready-to-eat vegetables in the Middle East. *Food Control*. 2016, 62, 125-133. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.10.024. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713515302462>

[66] QUANSAH J. K., A. P-H. KUNADU, F. K. SAALIA, J. DÍAZ-PÉREZ a J. CHEN. Microbial quality of leafy green vegetables grown or sold in Accra metropolis, Ghana. *Food Control*. 2018, 86, 302-309. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.11.001. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713517305236>

[67] SZCZECH M., B. KOWALSKA, U. SMOLIŃSKA, R. MACIOROWSKI, M. OSKIERA a A. MICHALSKA. Microbial quality of organic and conventional vegetables from Polish farms. *International Journal of Food Microbiology*. 2018, 286, 155-161. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.018. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160518305397>

[68] MOREIRA M. del R., S. I. ROURA a C. E. DEL VALLE. Quality of Swiss chard produced by conventional and organic methods. *LWT - Food Science and Technology*. 2003, 36(1), 135-141. DOI: 10.1016/S0023-6438(02)00207-4. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643802002074>

[69] AYTAC S. A., U. BEN, C. CENGIZ a B. M. TABAN. Evaluation of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination on leafy green vegetables. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 2010, (8), 275-279. ISSN 1459-0255.

[70] KIM H.-S., Y.-J. KIM, J.-W. CHON, D.-H. KIM, K.-Y. KIM a K.-H. SEO. *Citrobacter braakii*: A Major Cause of False-Positive Results on MacConkey and Levine's Eosin Methylene Blue Selective Agars Used for the Isolation of *Escherichia Coli* from Fresh Vegetable Samples. *Journal of Food Safety*. 2016, 36(1), 33-37. DOI: 10.1111/jfs.12210. ISSN 01496085. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jfs.12210>

[71] VAN HOEK A. H. A. M., CH. VEENMAN, W. M. VAN OVERBEEK, G. LYNCH, A. M. DE RODA HUSMAN a H. BLAAK. Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae on retail vegetables. *International Journal of Food Microbiology*. 2015, 204, 1-8. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.014. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515001531>

[72] AL-HOLY M., OSAILI T., EL-SAYED S.; ALSHAMMARI, E.; ASHANKYTY, I. Microbiological quality of leafy green vegetables sold in the local market of Saudi Arabia. *Italian Journal of Food Science*. 2013, (4), 446-452. ISSN 1120-1770.

[73] TANGO CH. N., N.-J. CHOI, M.-S. CHUNG a D. HWAN OH. Bacteriological Quality of Vegetables from Organic and Conventional Production in Different Areas of Korea. *Journal of Food Protection*. 2014, 77(8), 1411-1417. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-13-514. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/77/8/1411/174250/Bacteriological-Quality-of-Vegetables-from-Organic>

[74] FEDERICO B., L. PINTO, L. QUINTIERI, A. CARITO, N. CALABRESE a L. CAPUTO. Efficacy of lactoferricin B in controlling ready-to-eat vegetable spoilage caused by *Pseudomonas* spp. *International Journal of Food Microbiology*. 2015, 215, 179-186. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.017. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515301306>

[75] OBOH G. Nutritive Value, Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Struchium sparganophora* Leaves. *Journal of Medicinal Food*. 2006, 9(2), 276-280. DOI: 10.1089/jmf.2006.9.276. ISSN 1096-620X. Dostupné z: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2006.9.276>

[76] ŠILHÁNKOVÁ L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008. ISBN 978-80-200-1703-1.

[77] MOGREN L., S. WINDSTAM, S. BOQVIST, a kolektiv. The Hurdle Approach—A Holistic Concept for Controlling Food Safety Risks Associated With Pathogenic Bacterial Contamination of Leafy Green Vegetables. A Review. *Frontiers in Microbiology*. 2018, 9. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01965. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01965/full>

[78] ISO 6611: 2004. *Milk and Dairy Products – Enumeration of Colony-forming Units of Yeasts and/or Moulds – Colony Count Technique at 25 °C.*

[79] ČSN ISO 15214 *Mikrobiologie potravin a krmiv: horizontální metoda stanovení počtu mezofilních bakterií mléčného kvašení.* Praha: Český normalizační institut.

[80] GÖRNER, F., E. VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami.* Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN 80-967064-9-7.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AN Acetonitril

TFA Kyselina trifluoroctová

ZR Zásobní roztok

NMH Nejvyšší mezní hodnota

CPM Celkový počet mikroorganismů

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Efektivní proces dezinfekce vody s recirkulačním systémem navrženým jako alternativa k tradičnímu mytí. [42]	17
Obr. 2: Zdroje kontaminace zeleniny v průběhu růstu. [46].....	23
Obr. 3: Schéma MALDI – TOF hmotnostního spektrometru. [43]	24
Obr. 4: Izolované skupiny mikroorganismů z jednotlivých půd v log CFU/g (jaro 2019 – 1. polovina)	41
Obr. 5: Izolované skupiny mikroorganismů z jednotlivých půd v log CFU/g (jaro 2019 – 2. polovina)	42
Obr. 6: Izolované skupiny mikroorganismů z jednotlivých půd v log CFU/g (léto 2019 – 1. polovina)	45
Obr. 7: Izolované skupiny mikroorganismů z jednotlivých půd v log CFU/g (léto 2019 – 2. polovina)	46
Obr. 8: Izolované skupiny mikroorganismů z jednotlivých půd v log CFU/g (podzim 2019 – 1. polovina)	50
Obr. 9: Izolované skupiny mikroorganismů z jednotlivých půd v log CFU/g (podzim 2019 – 2. polovina)	51

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Obsah vody ve vybraných druzích listové zeleniny v g/kg [22]	13
Tab. 2: Seznam použitých vzorků – jaro 2019	33
Tab. 3: Seznam použitých vzorků – léto 2019.....	34
Tab. 4: Seznam použitých vzorků – podzim 2019.....	35
Tab. 5: Sledované mikroorganismy a podmínky jejich kultivace	37
Tab. 6: Taxonomie rodů izolovaných ze vzorků listové zeleniny.	54

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Hodnoty CFU/g pro jednotlivé půdy

Příloha č. 2: Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI TOF-MS

PŘÍLOHA Č. I: HODNOTY CFU/G PRO JEDNOTLIVÉ PŮDY

	PCA	MSA	VRBA	CHYGA	MRS
	CFU/g	CFU/g	CFU/g	CFU/g	CFU/g
zelí peking (č. 1)	4,5.10 ⁴	6,5.10 ³	<10 ³	1,1.10 ⁴	<10 ²
salát římský (č. 2)	1,8.10 ⁵	5,5.10 ³	8,1.10 ⁴	1,6.10 ⁵	2,0.10 ²
salát hlávkový (č. 3)	1,6.10 ⁵	2,4.10 ⁴	2,4.10 ⁵	2,0.10 ⁵	<10 ²
salát Lollo Rosso (č. 4)	9,1.10 ⁵	4,0.10 ³	1,2.10 ⁶	1,3.10 ⁶	<10 ²
salát Lollo Biondo (č. 5)	2,1.10 ⁶	2,2.10 ⁴	1,7.10 ⁶	3,4.10 ⁶	1,3.10 ³
salát bio ledový (č. 6)	4,7.10 ⁴	2,0.10 ³	2,4.10 ⁵	4,8.10 ⁴	<10 ²
salát ledový (č. 7)	1,4.10 ⁴	5,6.10 ³	2,9.10 ⁵	4,7.10 ⁴	<10 ²
salát bio rucola (č. 8)	1,0.10 ⁵	1,1.10 ⁵	2,7.10 ⁴	8,4.10 ⁴	4,0.10 ²
salát bio polníček (č. 9)	5,9.10 ⁵	5,8.10 ³	<10 ³	8,0.10 ⁵	<10 ²
bio baby špenát (č. 10)	2,1.10 ⁵	1,3.10 ⁵	1,2.10 ⁶	1,4.10 ⁶	<10 ²
salát hlávkový (č. 11)	2,1.10 ⁶	2,9.10 ⁴	7,5.10 ⁴	2,5.10 ⁵	6,4.10 ⁴
salát ledový (č. 12)	6,8.10 ⁵	5,3.10 ⁵	5,3.10 ⁵	6,4.10 ⁴	8,0.10 ²
salát Rucola (č. 13)	9,8.10 ⁵	3,3.10 ⁶	1,1.10 ⁶	1,2.10 ⁶	8,3.10 ⁴
bio baby špenát (č. 14)	3,4.10 ⁶	2,2.10 ⁵	6,5.10 ⁵	4,2.10 ⁵	3,3.10 ³
salát polníček (č. 15)	1,0.10 ⁶	2,1.10 ³	9,3.10 ⁴	1,0.10 ⁶	<10 ²
salát Little Gem - červený (č. 16)	1,5.10 ⁶	2,8.10 ⁵	6,6.10 ⁵	3,3.10 ⁴	7,6.10 ⁴
salát Little Gem - zelený (č. 17)	4,3.10 ⁵	5,8.10 ⁴	6,5.10 ⁴	1,0.10 ⁶	4,2.10 ⁴
salát Crispy - zelený (č. 18)	1,1.10 ⁶	4,4.10 ⁴	9,8.10 ⁴	4,2.10 ⁴	<10 ²
salát Crispy - červený (č. 19)	1,5.10 ⁶	4,7.10 ⁴	7,4.10 ⁴	5,9.10 ⁴	<10 ²
salát Little Gem - zelený (č. 20)	4,0.10 ⁵	5,6.10 ³	2,3.10 ⁵	1,4.10 ⁵	<10 ²
salát Insalatina (č. 21)	7,4.10 ⁵	3,8.10 ³	1,2.10 ⁷	1,5.10 ⁵	1,9.10 ⁴
salát hlávkový (č. 22)	7,5.10 ⁵	2,9.10 ⁴	>10 ⁴	8,5.10 ³	<10 ²
salát ledový (č. 23)	8,1.10 ⁵	2,7.10 ³	1,2.10 ⁶	2,7.10 ⁵	<10 ²
salát Tendita (č. 24)	1,3.10 ⁶	1,8.10 ⁴	2,2.10 ⁵	6,3.10 ⁵	2,2.10 ⁴
salát římský (č. 25)	9,9.10 ⁵	2,3.10 ⁴	7,4.10 ⁵	5,9.10 ⁴	5,1.10 ³
salát Little Gem - zelený (č. 26)	1,5.10 ⁶	1,8.10 ³	1,4.10 ⁶	3,2.10 ⁵	2,0.10 ²
Salát ledový (č. 27)	4,2.10 ⁵	5,0.10 ⁴	8,5.10 ⁴	4,4.10 ⁴	3,0.10 ²
Zelí peking (č. 28)	3,7.10 ⁶	3,3.10 ⁵	7,3.10 ⁶	1,4.10 ⁶	<10 ²
Zelí peking (č. 29)	2,6.10 ⁶	1,2.10 ⁵	2,2.10 ⁶	1,3.10 ⁵	<10 ²
salát ledový (č. 30)	2,3.10 ⁶	8,5.10 ⁴	>10 ⁴	7,9.10 ⁴	<10 ²
salát ledový (č. 31)	1,8.10 ⁶	3,0.10 ⁴	1,6.10 ⁶	2,5.10 ⁵	<10 ²
salát Lollo Rosso (č. 32)	2,2.10 ⁶	2,0.10 ⁵	>10 ⁴	2,1.10 ⁵	6,0.10 ²
salát polníček (č. 33)	4,5.10 ⁶	1,3.10 ³	1,5.10 ⁶	7,1.10 ⁶	<10 ²

	PCA	MSA	VRBA	CHYGA	MRS
	CFU/g	CFU/g	CFU/g	CFU/g	CFU/g
salát rucola (č. 34)	$3,2 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^5$	$4,1 \cdot 10^5$	$8,3 \cdot 10^3$
salát polníček (č. 35)	$>10^3$	$6,8 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^2$
salát rucola (č. 36)	$>10^3$	$1,0 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^3$
baby špenát (č. 37)	$>10^3$	$3,1 \cdot 10^6$	$6,8 \cdot 10^7$	$7,3 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^4$
salát římský (č. 38)	$1,1 \cdot 10^5$	$9,8 \cdot 10^3$	$8,0 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^4$	$<10^2$
salát hlávkový (č. 39)	$6,2 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^4$	$9,0 \cdot 10^2$
salát Lollo Rosso (č. 40)	$1,0 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^4$	$<10^2$
salát Lollo Biondo (č. 41)	$1,1 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^2$
salát římský (č. 42)	$4,0 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^5$	$7,3 \cdot 10^4$	$<10^2$
salát římský (č. 43)	$3,7 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$	$<10^2$
salát Little Gem - zelený (č. 44)	$2,9 \cdot 10^5$	$3,8 \cdot 10^3$	$9,7 \cdot 10^4$	$5,3 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^2$
salát Little Gem - zelený (č. 45)	$1,1 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^5$	$<10^2$
salát Little Gem - zelený (č. 46)	$8,5 \cdot 10^4$	$6,6 \cdot 10^3$	$8,1 \cdot 10^4$	$4,0 \cdot 10^4$	$<10^2$
salát ledový (č. 47)	$1,4 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^4$	$7,0 \cdot 10^3$	$<10^2$
zelí peking (č. 48)	$3,1 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^4$	$4,7 \cdot 10^5$	$5,9 \cdot 10^4$	$<10^2$
zelí peking (č. 49)	$3,6 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^2$
salát ledový (č. 50)	$6,6 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^3$	$3,3 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$	$<10^2$
salát Little Gem - červený (č. 51)	$3,3 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^2$	$8,6 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^6$	$<10^2$
salát Little Gem - zelený (č. 52)	$1,5 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^3$	$6,0 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^5$	$<10^2$
salát polníček (č. 53)	$1,3 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^5$	$<10^2$
salát Tendita (č. 54)	$2,3 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^3$	$7,7 \cdot 10^5$	$<10^3$	$<10^2$

**PŘÍLOHA Č. 2: IDENTIFIKACE MIKROORGANIZMŮ POMOCÍ
MALDI TOF-MS**

Číslo vzorku	Druh	Identifikovaný mikroorganismus
1	zelí peking	<i>Staphylococcus hominis</i>
2	salát římský	<i>Staphylococcus simulans</i> <i>Pseudomonas koreensis</i>
3	salát hlávkový	<i>Pseudomonas mandelii</i> <i>Pantoea agglomerans</i>
4	salát Lollo Rosso	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Escherichia coli</i>
5	salát Lollo Biondo	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>
6	salát bio ledový	<i>Staphylococcus xylosum</i>
7	salát ledový	<i>Pseudomonas viridiflava</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Pseudomonas extremorientalis</i>
8	salát bio rucola	<i>Pseudomonas libanensis</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Kocuria carniphila</i> <i>Staphylococcus equorum</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Sphingobium herbicidovorans</i> <i>Pantoea agglomerans</i>
9	salát bio polníček	<i>Pseudomonas corrugata</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> sp.
10	bio baby špenát	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
11	salát hlávkový	<i>Salmonella</i> sp. <i>Cryptococcus magnus</i> <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
12	salát ledový	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>Staphylococcus simulans</i>
13	salát rucola	<i>Serratia fonticola</i> <i>Pantoea agglomerans</i>
14	bio špenát	<i>Citrobacter koseri</i>
15	salát polníček	<i>Enterobacter ludwigii</i> <i>Staphylococcus warneri</i>

Číslo vzorku	Druh	Identifikovaný mikroorganismus
16	salát Little Gem - červený	<i>Acinetobacter junii</i> <i>Lactobacillus alimentarius</i>
17	salát Little Gem - zelený	<i>Staphylococcus equorum</i> ssp. <i>equorum</i> <i>Acinetobacter junii</i>
18	salát Crispy - zelený	<i>Staphylococcus lugdunensis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
19	salát Crispy - červený	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Pseudomonas flavescens</i>
20	salát Little gem - zelený	<i>Chryseobacterium gleum</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>
21	salát Insalatina	<i>Enterobacter xiangfangensis</i> <i>Pantoea</i> sp. <i>Weissella cibaria</i>
22	salát hlávkový	<i>Staphylococcus pasteurii</i> <i>Raoultella ornithinolytica</i> <i>Pseudomonas lutea</i>
23	salát ledový	<i>Cronobacter</i> sp. <i>Acinetobacter pittii</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Chryseobacterium joostei</i> <i>Salmonella</i> sp. <i>Streptococcus gallolyticus</i>
24	salát Tendita	<i>Enterobacter ludwigii</i> <i>Listeria innocua</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Serratia fonticola</i> <i>Lactobacillus murinus</i>
25	salát římský	<i>Enterobacter ludwigii</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Staphylococcus cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i> <i>Candida kefyr</i>
26	salát Little Gem - zelený	<i>Chryseobacterium joostei</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Lactobacillus paraplantarum</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Pantoea agglomerans</i>

Číslo vzorku	Druh	Identifikovaný mikroorganismus
27	salát ledový	<i>Staphylococcus succinus</i> <i>Pseudomonas oryzihabitans</i>
28	zelí peking	<i>Enterobacter cloacae</i>
30	salát ledový	<i>Pantoea agglomerans</i> <i>Citrobacter koseri</i>
31	salát ledový	<i>Citrobacter koseri</i>
32	salát Lollo Rosso	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i> <i>Pseudomonas graminis</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Candida parapsilosis</i>
34	salát rukola	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
49	zelí peking	<i>Achromobacter piechaudii</i> <i>Enterococcus durans</i> <i>Candida kefyr</i> <i>Pseudomonas chlororaphis</i>
50	salát ledový	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Pseudomonas graminis</i>
51	salát Little Gem - červený	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Oceanobacillus caeni</i>
52	salát Little Gem - zelený	<i>Bacillus simplex</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> <i>Pseudomonas pertucinogena</i> <i>Staphylococcus simulans</i> <i>Ewingella americana</i>
53	salát polníček	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>
54	salát Tendita	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Staphylococcus warneri</i> <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> <i>Staphylococcus cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Curtobacterium</i> sp.