


Využití přírodních extraktů jako antimikrobiálních přísad v potravinářském průmyslu

Ondřej Klimeš

Bakalářská práce
2020

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Ondřej Klimeš**
Osobní číslo: **T17920**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Využití přírodních extraktů jako antimikrobiálních a antibakteriálních přísad v potravinářském průmyslu**

Zásady pro vypracování

Rešeršní práce

1. Zaměřte se na *Salmonella* spp., *Listeria* spp. a *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter sakazakii*, *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Shigella* spp., Sulfit-redukující bakterie, *Legionella* spp. a *Legionella pneumophila*.
2. Popište současné metody pro stanovení patogenních bakterií jako např. klasické kultivační metody, metody pomocí chromogenních půd, nebo instrumentální techniky s využitím molekulární biologie.
3. Popište aplikaci ISO 16140 v praxi.
4. Citujte použitou literaturu.
5. Charakterizujte jednotlivé antimikrobiální a antibakteriální látky z hlediska struktury, stability a detekce. Dále charakterizujte jejich antimikrobiální a antibakteriální účinek.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] FRAZIER, W. C. a Dennis C. WESTHOFF. Food microbiology. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, c1978. ISBN 0-07-021917-6.
[2] Vědecké zdoje uvedené v databázích Web of Science, SCOPUS.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Lubomír Lapčík, Ph.D.**
Ústav technologie potravin

Datum zadání bakalářské práce: **17. února 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. 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 BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- 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 užit své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

V první části této bakalářské práce se zaměřuji na metody stanovení mikroorganismů. Jsou zde popsány jak klasické mikrobiologické metody (např. kultivační), které jsou základem každého stanovení, tak i modernější metody, které jsou schopny poskytnout výsledky rychleji a mnohdy s větší přesností (např. PCR). Druhá část práce je zaměřena na přírodní antimikrobiální látky, jež jsou zdravotně nezávadné a lze je využívat jako přísady v potravinářském průmyslu. Proti mikroorganismům vykazují buď mikrobicidní nebo mikrobistatické účinky.

Klíčová slova: mikroorganismy, metody stanovení, antibakteriální látky

ABSTRACT

In the first part of this bachelor thesis the focus is on methods applied for the determination of microorganisms. Both classical microbiological methods (e.g. cultivation methods), which are the basis of every determination, and more modern ones, which are able to provide results faster and with greater accuracy (e.g. PCR) are discussed here. The second part of the work is focused on natural antimicrobial substances, which are harmless to health and can be used as additives in the food industry. They have either microbicidal or microbistatic effects against microorganisms.

Keywords: microorganisms, methods of determination, antibacterial substances

Chtěl bych poděkovat svému vedoucímu prof. Ing. Lubomíru Lapčíkovi, CSc. za odborné vedení, pozitivní přístup a cenné rady, jež jsem využil při zpracování své bakalářské práce.

Velké díky patří mé rodině, která mi pomáhala po celou dobu studia.

Dále bych chtěl poděkovat své přítelkyni za trpělivost, kterou se mnou měla během každého zkouškového období a v průběhu psaní bakalářské práce.

Nesmím zapomenout poděkovat svým spolužákům, protože při studiu je hodně důležité to, s jakými lidmi trávíte čas. Musím říct, že jsem měl vždy štěstí na skvělé spolužáky a za to jsem nesmírně rád. Studium bylo díky tomu vždy jednodušší.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 METODY IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ.....	11
1.1 MIKROSKOPICKÉ METODY	11
1.1.1 Barvení mikroorganismů.....	11
1.2 BIOCHEMICKÉ METODY	12
1.2.1 Enzymatická aktivita mikroorganismů	13
1.2.2 Využití standardizovaných testů pro identifikaci mikroorganismů	15
1.3 KULTIVAČNÍ METODY	16
1.4 STANOVENÍ BAKTERIÍ KULTIVAČNÍMI METODAMI	19
1.4.1 Bakterie z čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	19
1.4.2 Koliformní bakterie	19
1.4.3 Patogenní mikroorganismy	20
1.4.4 Bakterie rodu <i>Salmonella</i>	20
1.4.5 <i>Escherichia coli O157</i>	21
1.4.6 Bakterie rodu <i>Campylobacter</i>	22
1.4.7 <i>Listeria monocytogenes</i>	23
1.4.8 <i>Clostridium perfringens</i>	24
1.4.9 <i>Bacillus cereus</i>	24
1.4.10 <i>Staphylococcus aureus</i>	25
1.4.11 <i>Cronobacter sakazakii</i>	26
1.4.12 Bakterie rodu <i>Legionella</i>	26
1.4.13 Bakterie rodu <i>Shigella</i>	27
1.5 IMUNOLOGICKÉ METODY	27
1.5.1 ELISA	27
1.6 METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE	28
1.6.1 Polymerázová řetězová reakce	28
2 PŘÍRODNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY	30
2.1 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY PRODUKOVANÉ MIKROORGANISMY	31
2.1.1 Nisin	31
2.1.2 Pediocin.....	32
2.1.3 Natamycin	33
2.1.4 Reuterin	34
2.2 ROSTLINNÉ ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY	34
2.2.1 Thymol a Karvakrol	34
2.2.2 Borneol.....	35
2.2.3 Vanillin.....	36
2.2.4 Eugenol	36
2.2.5 Skořicový aldehyd.....	36
2.2.6 Humulony.....	37

2.3	ŽIVOČIŠNÉ ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY	37
2.3.1	Laktoperoxidázy	37
2.3.2	Laktoferrin.....	38
2.3.3	Lysozym.....	38
2.3.4	Protamine	40
2.4	ISO 16140.....	40
2.5	ÚŘADY PRO BEZPEČNOST POTRAVIN	41
2.5.1	FDA (Food and Drug Administration).....	41
2.5.2	EFSA (European Food Safety Authority)	42
2.5.3	WHO (World Health Organization).....	42
	ZÁVĚR	44
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	45
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	48
	SEZNAM OBRÁZKŮ	49

ÚVOD

Hlavním cílem potravinářského průmyslu je produkovat zdravotně nezávadné potraviny, které lze před konzumací delší dobu uchovávat, aniž by došlo k jejich znehodnocení např. vlivem působení nežádoucích mikroorganismů. Zároveň musí potraviny splňovat určité organoleptické vlastnosti, aby pro člověka nebyla konzumace potravin utrpením, ale především radostí.

Abychom byli schopni určit, zda je potravina zdravotně nezávadná, tedy jestli neobsahuje nebezpečné patogenní mikroorganismy, tak byla vyvinuta řada mikrobiologických metod pro jejich detekci. Dále byly organizacemi zabývajícími se bezpečností potravin stanoveny určité limitní hodnoty, které udávají jaké množství takových nebezpečných mikroorganismů je v potravinách povoleno, aby potraviny zůstaly nadále zdravotně nezávadné. Není totiž možno docílit toho, že vyrobíme potravinu bez přítomnosti jakékoliv nežádoucí mikroflóry.

Pro udržení trvanlivosti potravin do nich přidáváme konzervační látky, které mají za úkol nejenom zajistit co nejdélší dobu jejich údržnosti, ale také uchovat jejich vůni, vzhled, chuť a další vlastnosti. V poslední době je spotřebiteli požadováno, aby co nejvíce těchto konzervantů bylo přírodního původu. Což není úplně jednoduché. O přírodní konzervační látky sice není nouze, protože příroda je na ně bohatá. Problémem je to, že taková látka například výborně působí proti mikroorganismům, ale na druhou stranu může nepříznivě ovlivnit aroma potraviny nebo při vyšších dávkách vykazovat toxické účinky. Dalším faktorem je cena výroby konzervační látky. Některé z nich mohou být těžko extrahovatelné a špatně se kultivují. To se potom může nepříznivě odrazit na výsledné ceně výrobku.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 METODY IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ

V praxi jsou využívány různé metody, kdy je můžeme rozdělit na metody přímé, do kterých patří mikroskopické, biochemické, kultivační a v poslední době hojně užívané metody molekulární biologie. Druhou skupinou jsou metody nepřímé, kam řadíme např. metody imunologické. Tyto metody jsou založeny na interakci antigenu a specifické protilátky [2].

1.1 Mikroskopické metody

Žádná mikrobiologická laboratoř se nemůže obejít bez tak důležitého zařízení, kterým mikroskop bezpochyby je. Pomocí mikroskopu stanovujeme u zkoumaných mikroorganismů jejich morfologické znaky, kterými jsou tvar, velikost, uspořádání buněk a způsob reprodukce. Tyto znaky patří k základním požadavkům identifikace mikroorganismů. Pro samotné pozorování je nutné zhotovit si tzv. mikroskopický preparát. Mikroskopické preparáty dělíme na nativní (čerstvé) nebo na fixované (trvalé). Mikroskopie může být využita ke kvalitativnímu nebo kvantitativnímu stanovení bakterií [1, 2].

Nativní preparát

Nativní preparát se připravuje z mikrobiálních kolonií pomnožených na pevných či tekutých kultivačních půdách, nebo přímo z daného vzorku potraviny. Pomocí takto připraveného preparátu můžeme pod mikroskopem pozorovat tvary živých buněk a rovněž sledovat jejich pohyblivost [1, 2, 3].

Fixovaný preparát

Účelem používání fixovaného preparátu je lepší rozpoznání tvaru buňky. Principem fixace je usmrcení buněk vysrážením buněčných bílkovin. Usmrcené buňky snadněji a lépe přijímají barvivo a pevněji přilnou k podložnímu sklu, čímž nedochází k jejich odplavování barvicími a oplachovacími roztoky. Nejčastějším způsobem fixací u bakterií je protažení plamenem. U kvasinek a plísní se fixace provádí chemicky např. pomocí etanolu nebo acetonu [1, 2, 3].

1.1.1 Barvení mikroorganismů

Barvení je využíváno k lepšímu rozlišení tvaru buňky, ale i k diagnostice bakterií na základě rozdílného složení buněčné stěny (Gramovo barvení). K barvení jsou využívány

roztoky ředěných syntetických anilínových barviv. Dle autochromových skupin dělíme barviva na **kyselá** (eosin, bavlíková modř,...), která jsou využívána pro zabarvení cytoplasmu u eukaryotních mikroorganismů. Dalšími skupinami jsou **zásaditá** (krystalová violet, methylenová modř, safranin,...), která jsou využívána pro zabarvení bakterií nebo jader eukaryotních mikroorganismů a **neutrální** (Azur II)[1, 2].

Dle účelu dělíme barvení na:

- **Jednoduché**, které slouží k rozlišení tvarů buněk.
- **Diferenciální**, které využíváme k rozlišení morfologických útvarů (spory, jádro) či chemických složek buňky (škrob, volutin).
- **Diagnostické**, které využíváme k identifikaci mikroorganismů (Gramovo barvení)[1, 2].

Gramovo barvení

Dodnes jde o jednu z nejdůležitějších diagnostických barvicích metod u bakterií. Tuto metodu vynalezl Christian Gram v roce 1884. Principem je barvení trvalého preparátu a jeho moření roztokem jódu (může být použit i Lugolův roztok). Tímto typem barvení lze rozdělit bakterie do dvou skupin a to na gram-pozitivní (G+) a gram-negativní (G-). To díky jejich rozdílnému složení buněčných stěn.

Nejprve jsou stěny buněk obarveny krystalovou violetí do fialova. Po opláchnutí přebytečného barviva destilovanou vodou se preparát převrství roztokem jódu (nebo Lugolůvým roztokem) a dochází ke vzniku nerozpustného komplexu **violet – jód – složky buněčné stěny**. Poté je použit odbarvovač (etanol, aceton), který rozpouští lipidy buněčných stěn. U **gram-negativních** (G-) bakterií dochází kvůli silné vrstvě lipopolysacharidů a slabé vrstvě peptidoglykenů k odplavení komplexu, kdy buňky zůstávají velmi slabě zbarveny (růžově) až odbarveny. Proto jsou pro mikroskopické pozorování dobarveny karbolfuchsinem nebo safraninem. U **gram-pozitivních** (G+) komplex díky silným vrstvám peptidoglykanů zůstává a buňky zůstávají tmavě modře až fialově zbarveny[1, 2, 3].

1.2 Biochemické metody

K tomu, abychom přesněji identifikovali, o jaký mikroorganismus se jedná, nám nestačí pouze jeho morfologické znaky (tvar, velikost,...). Je třeba znát i jeho biologické vlastnosti, např. enzymatickou aktivitu nebo fyziologické vlastnosti, jako jsou vztah ke

kyslíku a teplotě, schopnost přežít za vyšších koncentrací osmoaktivních látek (NaCl) [2].

Průběh biochemických reakcí se dokazuje společným působením metabolitů a produktů s indikátory obsaženými v kultivačních médiích, což má za následek barevnou změnu testovacího média [5].

1.2.1 Enzymatická aktivita mikroorganismů

Enzymy jsou organické sloučeniny (nejčastěji tvořeny proteiny), které katalyzují určité chemické děje v buňkách [4]. V potravinářské mikrobiologii jsou hodně sledovány proteolytické, lipolytické a sacharolytické enzymatické reakce, které jsou častou příčinou kažení potravin. Enzymy produkované mikroorganismy můžeme rozdělit na extracelulární a intracelulární [5].

Extracelulární enzymy působí na látky vně buňky, které například jsou příliš velké na to, aby prošly dovnitř buňky (lipidy, bílkoviny, polysacharidy) a proto musí být rozloženy na menší fragmenty.

Intracelulární enzymy hrají významnou roli při metabolických procesech uvnitř buňky [2].

Hydrolyza škrobu (důkaz amylázy)

Jako důkaz přítomnosti amylázy se využívá roztok jódu. Ten zabarvuje škrob do modra. Pokud jsou enzymy přítomny, tak k barevné změně nedochází, jelikož amylázy škrob hydrolyzují na kratší sloučeniny (Dextriny, maltóza) a ty s roztokem jodu nereagují [2].

Hydrolyza kaseinu (důkaz proteáz)

Proteázy narušují peptidové vazby mezi molekulami aminokyselin v proteinu kaseinu a tím vznikají pro buňky snadněji využitelné kratší řetězce peptidů, dipeptidů až samostatné aminokyseliny. Důkaz přítomnosti proteáz se provádí na Petriho miskách s mléčným agarem. Pokud po zaočkování a kultivaci mikroorganismu dojde k vytvoření zóny projasnění kolem kolonií, tak došlo k proteolýze a reakce je pozitivní [2].

Hydrolyza lipidů (důkaz lipáz)

Lipázy štěpí esterickou vazbu mezi mastnými kyselinami a glycerolem v molekulách lipidů. Tím usnadňují transport těchto látek do buňky. Důkaz přítomnosti lipáz se provádí na Petriho miskách s tributyrin agarem. Pokud po zaočkování a kultivaci mikroorganismu dojde k vytvoření zóny projasnění kolem kolonií, tak je reakce pozitivní [2].

Fermentace sacharidů

U bakterií patří schopnost fermentovat sacharidy k důležitým důkazovým reakcím. Při tomto procesu dochází buď ke vzniku plynů (CO_2, H_2) nebo organických kyselin (kyselina mléčná a octová). Někdy dochází ke vzniku obou těchto produktů současně. Pomocí indikátorů přítomných v kultivačních půdách lze stanovit přítomnost organických kyselin. Dochází ke změně pH půdy, což má za následek změny barvy média (účinkem indikátorů)[2].

Produkce sulfanu

Sulfan vzniká například rozkladem sirných aminokyselin cysteinu a methioninu nebo z anorganicky vázané síry například ve formě sulfátů (SO_4^{-2}) účinkem enzymu thiosulfátoreduktázy. Produkce sirovodíku je detekována pomocí železitých solí obsažených v kultivačních médiích, kdy vytváří černý, nerozpustný sulfid železa [2]. Produkce sulfanu je typická pro některé bakterie rodu *Salmonella* a *Proteus* [5].

Dekarboxylace lysinu a ornitinu

Dekarboxylací lysinu a ornitinu vzniká oxid uhličitý a organické zásady (kadevarin, putrescin), které mají za následek alkalizaci kultivačních půd. Test probíhá v obohacených půdách s přidavkem lysinu nebo ornitinu a barviva bromkresolu (indikuje změnu pH živného média). Funkce enzymů probíhá lépe v anaerobním prostředí, a proto je médium převrstveno sterilním parafinovým olejem. Při pozitivní reakci se půda zbarví do tmavě červené.

Salmonella spp., *Klebsiella* spp., *E. coli* jsou schopny štěpit lysín.

Enterobacter spp., *Proteus mirabilis* a *Yersinia enterocolitica* jsou schopny štěpit ornitin [5].

Důkaz přítomnosti katalázy

Většina aerobních a fakultativně anaerobních bakterií při respiraci produkuje pro ně toxický peroxid vodíku, a proto vytváří enzym katalázu [2]. K indikaci přítomnosti enzymu je využíván 3% roztok peroxidu vodíku. Pomocí katalázy rozkládají bakterie peroxid na vodu a kyslík. Test se provádí rozetřením inokula pomocí sterilní kličky do kapky peroxidu vodíku, který je nanesen na podložním skle. Pozitivní reakcí je tvorba bublin kyslíku.

Pozitivní reakce vykazují bakterie rodu *Staphylococcus*.

Negativní reakci vykazují bakterie mléčného kvašení (např. rodu *Streptococcus* nebo *Enterococcus*) [5].

Důkaz přítomnosti ureázy

Ureáza je specifický hydrolytický enzym, který štěpí močovinu na oxid uhličitý a amoniak. Pro důkaz přítomnosti tohoto enzymu se využívá půda obohacena o močovinu s přídavkem fenolové červeně (indikátor alkalizace média)[5]. Vyšším obsahem amoniaku dochází ke zvýšení pH půdy a ta se zabarvuje do červena, což značí pozitivní reakci [2].

Ureázu produkují například bakterie rodu *Proteus* a *Citrobacter*[5].

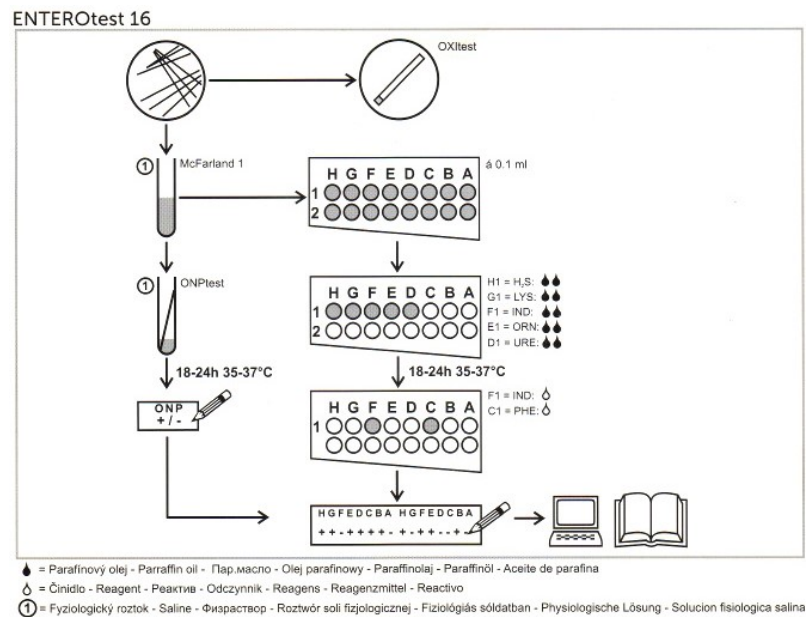
1.2.2 Využití standardizovaných testů pro identifikaci mikroorganismů

Kvůli časové a materiálové náročnosti některých běžných biochemických testů se využívají standardní komerční testy (mikrotesty). Velkou výhodou těchto testů je rychlejší a snadnější identifikace mikroorganismů [2]. Komerční testy ve formě proužků slouží pro jednotlivé reakce, kam patří například OXItest, VPtest, ONPtest. Testy ve formě soupravy umožňují testovat přes 20 různých biochemických reakcí najednou. Mikrotitrační destičky s jamkami obsahují dehydratovaná diagnostická média se substráty, do kterých se očkují suspenze (o objemu 0,1ml) čistých kultur o určité koncentraci buněk. Po zhruba 24 hodinové inkubaci dochází k barevným změnám, které se odečítají vizuálně nebo pomocí spektrofotometru. Výsledky se po-té vyhodnocují pomocí diferenciačních tabulek nebo počítačových programů [5].

Každá souprava disponuje návodem, tabulkami pro zapisování výsledků a pomocnými činidly (parafinový olej). Soupravy jsou využívány pro identifikaci bakterií z potravin půdy, pitné a povrchové vody, apod. [2].

Příklady některých standardizovaných testovacích systémů

- ENTEROtest (slouží k identifikaci G- fermentujících tyčinek z čeledi *Enterobacteriaceae*),
- STAPHYtest (slouží pro identifikaci stafylokoků a mikrokoků),
- STREPTOtest (slouží k rozlišení streptokoků a enterokoků),
- ANAEROtest (slouží pro identifikaci anaerobů),
- APItest (slouží pro identifikace různých kvasinek a pro G+ i G- skupiny bakterií)



Obrázek 1 – ENTEROtest

1.3 Kultivační metody

Kultivační metody studují mikroorganismy jako kolonie dceřiných buněk vzniklých dělením jedné buňky mateřské. Principem kultivačních metod je získat čistou kulturu mikroorganismů v dostatečném množství buněk pro mikrobiologické, biochemické a biotechnologické vyšetření nebo pro uchovávání mikroorganismů. Pro kultivaci je zapotřebí vhodného sterilního živného média, kultivační nádoby, očkovací pomůcky a termostat pro udržení optimální teploty růstu daného mikroorganismu [5].

Kultivační půdy

Obsahují směs přírodních nebo syntetických látek, které jsou určeny k pomnožení nebo uchování potřebných kultur mikroorganismů [5].

Podle složení dělíme půdy na:

- Syntetické půdy, u kterých je přesně definováno jejich složení.
- Přirozené živné půdy, u kterých přesné složení není definováno [2].

Podle konzistence:

- Tekuté půdy, které jsou určeny zejména k pomnožení mikroorganismů. Nelze z nich přímo získat čistou kulturu. Příkladem těchto typů půd je třeba mléko nebo bujón.

- Polotuhé a tuhé půdy, které se ztužují přidavkem agarů nebo želatiny. Mikroorganismy zde rostou ve formě kolonií [2].

Podle použití:

- Půdy pomnožovací, které slouží k pomnožení mikroorganismů. Jedná se většinou o půdy tekuté.
- Půdy univerzální, na kterých díky jejich složení roste široké spektrum mikroorganismů.
- Půdy selektivní, které svým složením zvýhodňují růst určité skupiny mikroorganismů.
- Půdy transportní, které slouží k udržení životaschopnosti od odběru do doby zpracování v laboratořích.
- Půdy konzervační, které slouží pro udržení životaschopnosti mikroorganismů po dlouhou dobu [2].

Očkování

Jedná se o proces přenesení inokula do sterilní živné půdy pomocí sterilních nástrojů (klička). Celý proces musí probíhat ve sterilních podmínkách [5]. Toho je docíleno prací ve sterilních boxech nebo v uzavřených místnostech blízko plamene kahanu [6].

Kvantitativní metody

Principem je stanovit ve zkoumaném vzorku pokud možno přesný počet mikroorganismů. Výsledkem je hodnota udávána v jednotkách KTJ v 1ml nebo 1g (KTJ = kolonie tvořící jednotky)[5].

Očkování metodou přelivu

Postupuje se tak, že je 1ml suspenze napipetován sterilní pipetou do prázdné, řádně označené Petriho misky [2]. Při očkování více ředění nebo více různých vzorků musí být každé naočkování provedeno jinou sterilní pipetou. Takto naočkované inokulum je přelito rozpuštěným a ochlazeným agarem na teplotu 45 °C. Agar spolu s inokulem je poté důkladně promíchán krouživým pohybem a půda se nechá zatuhnout. Takto připravené misky jsou uloženy do termostatu dnem vzhůru, aby na půdu neztékala zkondenzovaná voda. V potravinářské mikrobiologii je tento způsob velice často využíván [5].

Očkování roztěrem na tuhou půdu

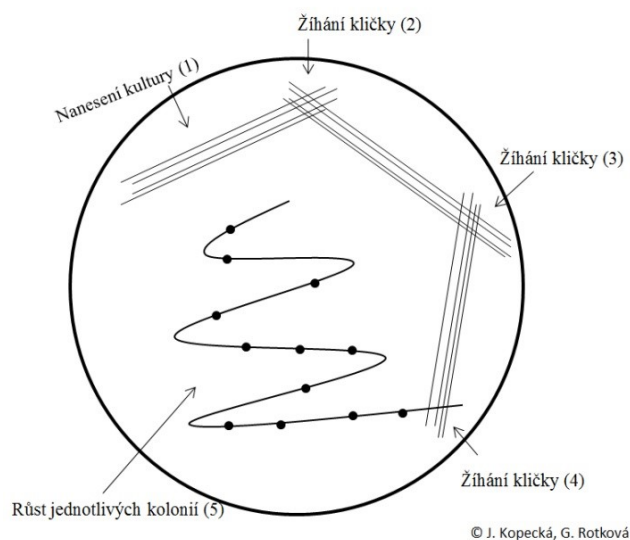
V tomto případě postupujeme tak, že je 0,1ml suspenze napipetováno sterilní pipetou do Petriho misky s příslušným živným médiem[2]. Takto naočkované inokulum je co nejrychleji roztíráno pomocí sterilní, zahnuté, skleněné tyčinky (tzv. hokejky) po celém povrchu agarů dokud není tekutina na povrchu půdy viditelná. Po vsáknutí inokula do agarů (cca 10 minut) se uloží misky dnem vzhůru do termostatu. Při očkování více ředění nebo více různých vzorků musí být každé naočkování provedeno jinou sterilní pipetou a roztírání jinou hokejkou [5].

Kvalitativní metody

Tyto metody slouží k detekci konkrétních druhů mikroorganismů v daném vzorku. Principem je pomnožení mikroorganismů v tekuté půdě a následné přeočkování na selektivní půdy. Díky složení půdy je výsledkem nárůst typických kolonií pro danou skupinu mikroorganismů. Na závěr se potvrzuje přítomnost hledaného mikroorganismu pomocí kultivačních technik [5].

Křížový roztěr

Nejprve je ze zkumavky se zkoumanou kulturou odebrána část kolonie pomocí sterilní (vyžíhané) kličky a ta je nanášena na živnou půdu a rozetřena vodorovnými pruhy. Další sterilní kličkou je kultura od koncové části opět rozetřena vodorovnými pruhy. Tento krok se opakuje ještě jednou. Při čtvrtém roztírání je ředěná kultura rozetřena od koncové části tzv. hádkem, kde dochází k růstu jednotlivých kolonií zkoumaného mikroorganismu.



Obrázek 2 - Křížový roztěr

1.4 Stanovení bakterií kultivačními metodami

1.4.1 Bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*

Jedná se o aerobní a fakultativně anaerobní, gram-negativní, nesporující tyčinky [7]. Hojně se vyskytují ve vodách a v půdách, ale jsou i často součástí střevní mikroflóry člověka a teplokrevných živočichů, kdy se pomocí výkalů dostávají do vnějšího prostředí [1, 2]. Pro bakterie z této čeledi je typické to, že fermentují glukózu za tvorby kyselin, plynů a také jsou oxidáza negativní [7]. Do této čeledi zahrnujeme rody jako: *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Serratia* a mnoho dalších [1].

Princip stanovení čeledi *Enterobacteriaceae* (plotnová metoda)

V Petriho miskách se daný objem tekutého vzorku (výchozí suspenze) a jejich desetinasobných ředění zalévá agarovou živnou půdou. Jako živné médium je využíván agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučí a glukózou (VRBG agar). Takto zaočkované Petriho misky se inkubují aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin. Z počtu vyrostlých (charakteristických) kolonií se stanoví počet těchto bakterií v 1 mililitru nebo 1 gramu (KTJ v 1g, 1ml) [2, 7].

1.4.2 Koliformní bakterie

Jedná se o skupinu bakteriálních rodů patřících pod čeleď *Enterobacteriaceae*, kdy všechny tyto bakterie vykazují na živných půdách podobné vlastnosti jako *Escherichia coli*. Bakterie spadající do této skupiny jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní gram-negativní tyčinky, které nemají sporotvorné vlastnosti. Tyto bakterie se vyskytují jak ve vnějším prostředí, tak jsou rovněž součástí střevní mikroflóry lidí a teplokrevných zvířat. Významné jsou především díky své termolabilitě, díky čemuž jsou využívány jako indikátory správně provedeného tepelného ošetření (pasterace) potravin. Také jsou ukazatelem fekálního znečištění v potravinách a pitné vodě (možná přítomnost střevních patogenů), správného dodržení sanitačních postupů ve výrobě a distribuci potravin. Společným ukazatelem těchto bakterií je schopnost fermentovat laktózu za tvorby kyselin a plynů.[1, 2, 7]

Princip stanovení přítomnosti koliformních bakterií

Určený objem desetinasobného ředění vzorku se zalévá živným médiem v Petriho misce. Ke stanovení se využívá selektivní půdy VČŽL agar, který obsahuje krystalovou violet',

neutrální červeň, žlučové soli (inhibují gram-pozitivní bakterie) a laktózu. Zaočkovaná média s miskami se pro stanovení přítomnosti těchto bakterií v potravinách inkubují při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Z misek, na kterých lze dobře kolonie spočítat, tedy ty u kterých bylo použito vhodné ředění vzorku (v případě prokázání přítomnosti využíváme, pokud to jde, co nejnižší ředění) a vypočte se jejich počet v 1 ml nebo 1 g vzorku. Výsledek se poté vyjádří v jednotkách KTJ (KTJ= kolonie tvořící jednotky) na 1 gram nebo mililitr (v případě, že zkoumáme tekutý vzorek).[1, 2, 7]

1.4.3 Patogenní mikroorganismy

Tyto mikroorganismy jsou původci alimentárních infekcí a intoxikací, kdy vehikulem může být právě kontaminovaná potravina, pitná voda, ale i kontaminované nástroje v potravinářských provozech. **Alimentární infekce** vyvolávají mikroorganismy, které se prostřednictvím potravy nebo vody dostávají do trávicího traktu člověka, kde se pomnoží a vyvolají onemocnění. Patří sem zejména některé bakterie rodu *Salmonella*, potom také druhy bakterií jakými jsou *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* a další. **Alimentární intoxikace** jsou onemocnění vyvolaná zejména potravinami, ve kterých se pomnožily bakterie a vlivem jejich metabolické aktivity došlo k nahromadění toxických metabolitů (tzv. exotoxinů). Do této skupiny patří například bakterie, jakými jsou *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* a *Clostridium botulinum*. V České republice patří k závažným alimentárním infekcím (z epidemiologického hlediska) především salmonelózy. Co se týče alimentárních intoxikací, tak je kladen velký důraz hlavně na stafylokokové enterotoxikózy [1, 2, 7, 8].

1.4.4 Bakterie rodu *Salmonella*

Bakterie rodu *Salmonella* jsou rozděleny do dvou druhů a to na *Salmonella bongori* a *Salmonella enterica*. Bakterie rodu *Salmonella* jsou gram-negativní, nesporulující, fakultativně anaerobní tyčinky, které zkvašují glukózu, maltózu, sorbitol, manitol za tvorby plynu a kyselin. Ve většině případů jsou kataláza pozitivní, oxidáza negativní, jako zdroj uhlíku (kromě *S. Typhi*) využívají citráty, dekarboxylují lysin, ornitin, arginin a tvoří sulfan. Jedná se o patogeny, jejichž hlavním rezervoárem je střevní trakt člověka i zvířat, ale i ve vnějším prostředí (ve vodě a půdě) jsou schopny přežít i několik týdnů. Bakterie tohoto rodu jsou schopny růst při teplotách v rozmezí +5 až 47 °C a pH 4 až 9. K usmrcení bakterií dochází při teplotách nad 70 °C (pasterace) a při koncentraci soli nad 9%. Aktivita vody pod 0,92 má na tyto bakterie bakteriostatický účinek [1, 2, 7, 8].

Princip stanovení

Stanovení tohoto rodu bakterií vyžaduje 4 na sebe navazující kroky.

Prvním je jejich pomnožení v neselektivní půdě (např. peptonová voda), kdy vzorek necháme inkubovat aerobně při 37 °C asi 20 hodin.

Druhým krokem je pomnožení v selektivních tekutých půdách (dle Rappaporta a Vassiliadise se sójou – RVS a půda dle Müllera a Kauffmanna s tetrathionanem a novobiocinem - MKTTn). Po první inkubaci část výchozí suspenze přeneseme do zkumavky s půdou RVS a ponecháme aerobně inkubovat při 42 °C po dobu 1 dne. Zároveň další část výchozí suspenze (z prvního kroku) přeneseme do zkumavky s půdou MKTTn a inkubujeme aerobně při 37 °C po dobu 1 dne.

Třetím krokem je izolace jednotlivých kolonií, kdy se pomnožené bakterie zaočkují na pevné selektivní půdy (XLD, BGA). Nechají se inkubovat aerobně při 37 °C po dobu 1 – 2 dnů.

Čtvrtým krokem je konfirmace a hodnocení výsledků, kdy se vybere několik kolonií typických pro rod *Salmonella*, na kterých se provede řada biochemických a sérologických testů. Podle zjištěných výsledků se následně potvrdí nebo vyloučí přítomnost bakteriálního rodu ve vzorku [2, 7].

1.4.5 *Escherichia coli* O157

Bakterie *Escherichia coli* patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o anaerobní tyčinky, které jsou běžnou součástí zažívacího traktu většiny teplokrevných zvířat, ale i člověka. Sérotyp *Escherichia coli* O157 způsobuje velmi vážné záněty tlustého střeva. K přenosu na člověka nejčastěji dochází buď kontaminovanými, nebo nedostatečně tepelně opracovanými potravinami živočišného původu (např. nepropečené hovězí maso). Dalšími zdroji nákazy mohou být nepasterizované mléčné výrobky [2, 7].

Tento sérotyp se od běžných *Escherichia coli* liší určitými biochemickými vlastnostmi. Mezi významné rozdíly, kterými se od ostatních odlišují, patří jejich neschopnost fermentovat D-sorbitol a také to, že postrádají enzym β -D-glukuronidáza. Dalším rozdílným faktorem je jejich špatná reprodukce nad 43 °C (jejich optimum je od 30 – 42 °C)[7].

Princip stanovení

Podobně jako u salmonel stanovení vyžaduje 4 po sobě jdoucí kroky.

Prvním je pomnožení. Vzorek se nechá homogenizovat v modifikovaném bujónu se sójou, přídatkem novobiocinu a enzymaticky natráveným kaseinem (mTSB + N). Následně se vzorek nechá inkubovat při 41,5 °C po dobu 18 – 24 hodin [7].

Druhým krokem je separace zkoumaných bakterií pomocí imunomagnetických částic, na jejichž povrch byla nanášena protilátka vůči antigenu O157 [7].

Třetím krokem je izolace na MacConkey agaru a druhé selektivní půdě (např. chromogenní agar). Zaočkované půdy se ponechají inkubovat při 37 °C po dobu 18 – 24 hodin [7].

Čtvrtým posledním krokem je konfirmace sorbitolu negativních kolonií z půdy CT-SMAC(kolonie se jeví jako průhledné, bezbarvé až světle žlutohnědé s průměrem asi 1 mm) a typických kolonií z druhé kultivační půdy na základě tvorby indolu a aglutinace s antisérem vůči antigenu O157. Díky takto získaným výsledkům se potvrdí nebo vyloučí přítomnost tohoto sérotypu *E. coli* ve vzorku [7].

1.4.6 Bakterie rodu *Campylobacter*

Bakterie tohoto rodu jsou gram-negativní mikroaerofilní tyčinky (vyžadují v prostředí nízký obsah kyslíku, dusíku a oxidu uhličitého), které patří do čeledi *Campylobacteraceae*. Jsou to původci onemocnění tzv. kampylobakterióz. Tyto bakterie redukují nitráty, nefermentují sacharidy a jsou také oxidáza pozitivní s negativní reakcí na indol. Některé bakterie rodu *Campylobacter* jsou tzv. termotolerantní (mají schopnost růst při vyšší teplotě, kolem 42 °C). Patří, jsem např. *C. jejuni* a *C. coli*. Tyto termotolerantní druhy se běžně vyskytují v střevním traktu domácích, ale i volně žijících zvířat. Přenos na člověka je buď přímý (přímým kontaktem se zvířetem) nebo nepřímý (pomocí kontaminované vody, syrovým masem, atd.) [2, 7].

Růstová teplota kapylobakterů se pohybuje v rozmezí 30 – 45 °C, ale např. *C. jejuni* je při chladírenských teplotách a dostatečné vlhkosti schopen přežít i několik dní (i mrazírenské teploty dobře zvládá) [2]. Limitující hodnota aktivity vody pro růst je 0,98 (hodnoty pod 0,95 způsobují jejich devitalizaci). Optimální pH pro jejich růst je při neutrálním pH, ale jsou schopny reprodukce i při hodnotách od 4,9 do 9 pH. Koncentrace soli převyšující 1,5 % má pro ně baktericidní účinek [7].

Princip stanovení termotolerantních druhů

Testovaný vzorek se zaočkuje do tekuté selektivní půdy (bujón dle Boltona), ve které se nechají bakterie pomnožit. Inkubace probíhá v anaerostatu nejdříve při 37 °C po dobu 4 – 6 hodin a následně při 42 °C po dobu 48 hodin. Tím získáme kultury, které se zaočkují do Petriho misek na dvě různé pevné selektivní půdy, mCCD agar (modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem) a druhý agar např. podle Karmaliho. Misky se následně nechají inkubovat 42 °C po dobu 48 hodin a zjišťujeme, zda jsou přítomny charakteristické kolonie. Pokud ano, tak jich pár vybereme a provede se řada biochemických testů (např. oxidázový test atd.). Nakonec získáme výsledky, které buďto prokazují přítomnost nebo nepřítomnost zkoumaných bakterií ve vzorku [7].

1.4.7 *Listeria monocytogenes*

Tento druh bakterie patří do rodu *Listeria* a čeledi *Listeriaceae*. Jedná se o gram-pozitivní fakultativně anaerobní tyčinky, které lze nalézt ve střevním traktu zvířat, v půdě nebo ve vodě. *Listeria monocytogenes* je patogenní bakterie, která vyvolává u lidí i zvířat onemocnění zvané listerióza. Nejčastějším zdrojem nákazy jsou kontaminované potraviny a to především syrová zelenina a syrové mléko. Tato bakterie je schopna se rozmnožovat v široké škále teplot a to od 0 do 45 °C (optimum se pohybuje kolem 35 °C). Z hygienického hlediska je závažná právě její schopnost přežívat a množit se i při chladírenských teplotách. Ovšem vystavení teplot nad 70 °C je pro ni smrtící [2, 7].

Princip stanovení

Stanovení *L. monocytogenes* v potravinách se provádí kvalitativně, kdy se buďto potvrdí anebo vyvrátí jejich přítomnost ve zkoumaném vzorku. Stanovení zahrnuje 4 jednotlivé navazující kroky - primární pomnožení, sekundární pomnožení, izolaci a konfirmaci [2].

Zkoušený vzorek se nejdříve (primárně) pomnoží v tekuté selektivní půdě (bujón podle Fräsera), kdy se ponechá inkubovat 24 hodin při 30 °C. Tím je získána kultura, která se nechá sekundárně pomnožit opět v tekutém bujónu (bujón podle Fräsera) a inkubovat anaerobně při 37 °C po dobu 24 – 48 hodin. Z prvního i druhého pomnožení je následně provedeno přeočkování na dvě pevné selektivní půdy. Agar podle Ottavianiho a Agostiho (ALOA agar) a další jakoukoliv selektivní půdu (např. PALCAM agar). Takto zaočkované misky se nechají inkubovat aerobně při 37 °C po dobu 24 – 48 hodin. Po inkubaci se

zjišťuje přítomnost suspektních kolonií *L. monocytogenes* a provede se jejich konfirmace. Výsledkem je důkaz jejich přítomnosti nebo nepřítomnosti ve zkoumaném vzorku [2, 7].

1.4.8 *Clostridium perfringens*

Bakterie rodu *Clostridium* jsou gram-pozitivní striktně anaerobní sporotvorné tyčinky. Tyto bakterie můžeme běžně najít v půdě, ve vodě a ve střevním traktu zvířat i lidí. Dle antigenů se dělí do 5 skupin značených písmeny A až E, z nichž nejvíce alimentárních otrav vyvolává právě sérotyp A. Bakterie jsou schopny růst v rozmezí teplot od 10 – 60 °C (optimální teplota se pohybuje kolem 45 °C). Při působení teplot nad 70 °C dochází k usmrcení veškerých vegetativních forem, ale spory dále přežívají. Ty bývají usmrceny působením mnohem vyšších teplot. Například u metody tepelného ošetření zvané UHT (Ultra High Temperature), kdy se potravina vystaví teplotám nad 135 °C po dobu 1-2 vteřin. Zdrojem nákazy pro člověka může být např. požití nedostatečně tepelně ošetřeného jídla nebo sekundárně kontaminované maso (nevhodnou manipulací) [2, 7, 8, 9].

Princip stanovení

Do Petriho misek se zaočkuje výchozí vzorek suspenze a jeho několik desetinásobných ředění, které se zalejí selektivní kultivační půdou (TSC – Tryptose Sulfite Cycloserin). Po zatuhnutí půdy ještě každou misku převrstvíme tou samou kultivační půdou. Následně se misky nechají anaerobně inkubovat při 37 °C po dobu 18-22 hodin. Pokud došlo k nárůstu charakteristických černých kolonií, tak se vybere pár misek, kde jsou kolonie dobře počítatelné. Z těch se potom vybere několik kolonií ke konfirmaci, kdy se provedou biochemické testy (např. schopnost fermentace laktózy nebo redukce siřičitanu). Z počtu potvrzených suspektních vyrostlých kolonií se výsledek vyjádří v jednotkách KTJ v 1 ml nebo 1 g vzorku [2, 7].

1.4.9 *Bacillus cereus*

Bakterie druhu *B. cereus* jsou gram-pozitivní fakultativně anaerobní tyčinky. Dobře rostou v teplotách od 7 do 45 °C, kdy se jejich optimální teplota pohybuje kolem 30 °C. Díky jejich schopnostem růst v široké škále teplot a vytvářet spory, které jednoduše odolávají pasteračním teplotám, je obtížné získat těmito bakteriemi nekontaminovanou potravinu. Bakterie tohoto druhu lze jednoduše nalézt v půdě (na zbytcích rostlin), hnoji a v krmivech hospodářských zvířat. Pro člověka jsou nebezpečné zejména tím, že produkují toxiny, které způsobují alimentární intoxikace. Zdrojem nákazy pro člověka může být vdechnutí spor

z ovzduší, konzumace nedokonale tepelně ošetřených konzerv nebo špatně skladovaných chlazených potravin (při teplotách nad 10 °C dochází k vyklíčení spor). K usmrcení veškerých vegetativních forem postačí pasterační záhřev (teplota nad 70 °C po dobu min. 10 minut), ale k usmrcení spor je zapotřebí použít sterilizačních teplot (metoda UHT)[2, 7, 9].

Princip stanovení

Do Petriho misek s obsaženou selektivní půdou (MYP agar) se naočkuje určitý objem vzorku. Zaočkované misky se poté nechají inkubovat aerobně při 30 °C po dobu 24 – 48 hodin. Následně se na několika vyrostlých pro bacilus charakteristických koloniích provede konfirmace (např. test hemolýzy na krevním agaru). Po ověření identifikace se počet těchto kolonií vyjádří v jednotkách KTJ v 1 mililitru nebo 1 gramu vzorku [2, 7].

1.4.10 *Staphylococcus aureus*

Bakterie druhu *Staphylococcus aureus* jsou gram-pozitivní fakultativně anaerobní koky. Dokážou se dobře rozmnožovat v teplotách od 10 do 45 °C, přičemž jejich optimální teplota se pohybuje okolo 35 °C. Jedná se o docela odolný druh bakterie, který je schopen přežívat při nízké vodní aktivitě (a_w 0,86), je schopen odolávat teplotám nad 60 °C po dobu několika minut a snáší dobře i vyšší koncentrace soli a to kolem 18% NaCl (je tzv. halotolerantní). *S. aureus* můžeme najít v prachu, vodě, ale také na kůži a sliznicích člověka. Proto často dochází ke kontaminaci potravin pracovníky, kteří mají nějaká hnisavá poranění rukou a manipulují s potravinami, ať už při zpracování nebo balení potravin. Tento druh bakterie se řadí mezi tzv. patogenní mikroorganismy, který způsobuje u lidí i zvířat celou řadu zánětlivých onemocnění (např. hnisavé záněty kůže). Při vhodných podmínkách může v kontaminovaných potravinách vyprodukovat enterotoxiny, které jsou původci tzv. stafylokokové enterotoxikózy [2, 7, 9].

Princip stanovení

Stanovený obsah vzorku se v Petriho miskách rozetře na selektivní živné půdě. Pro stanovení *S. aureus* se využívá tzv. BP (Baird parker) agar. Tato půda obsahuje žloutkovou emulzi a telluričitan, který spolu s obsaženým chloridem sodným inhibuje nežádoucí mikroflóru. Obsažený pyruvát sodný a glycin naopak podporují výhradně růst *S. aureus*. Zaočkované misky se nechají inkubovat při 37 °C po dobu 24-48 hodin. Poté se sečtou veškeré typické kolonie pro *S. aureus*, které tvoří černé lesklé vypouklé kolonie se zónou projasnění (ta je způsobena proteolýzou žloutku). Celkový počet těchto kolonií se vyjádří

v jednotkách KTJ v 1 mililitru nebo 1 gramu vzorku. Pro stanovení enterotoxinů produkovaných *S. aureus* se využívají imunologické metody, např. ELISA [1, 2, 7].

1.4.11 *Cronobacter sakazakii*

Jedná se o gram-negativní, nesporulující, fakultativně anaerobní, koliformní bakterii rodu *Cronobacter* patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Běžně se vyskytuje ve střevním traktu zvířat, ale v lidském střevě se zpravidla nevyskytuje. Tato bakterie je původcem meningitidy. Tato nemoc je velmi nebezpečná zvláště pro kojence, kdy zdrojem nákazy *Cr. sakazakii* bývá často sušené kojenecké mléko [7].

Princip stanovení

Nejdříve se vzorek zaočkuje do tekuté neselektivní půdy, jakou je např. pufrovaná peptonová voda. Inokulovaný vzorek se inkubuje při 37 °C po dobu 16 - 20 hodin. Tím získáme kultury, které se přeočkují do selektivní tekuté půdy – mLST (ta obsahuje vankomycin, který inhibuje nežádoucí mikroflóru). Přeočkovaný vzorek se nechá inkubovat při 44 °C přibližně 24 hodin. V dalším kroku následuje přeočkování na misky s pevnou chromogenní půdou, např. *Enterobacter sakazakii* izolační agar. Misky se poté nechají aerobně inkubovat 24 hodin při 44 °C. Na závěr se zjišťuje, zda jsou přítomné typické kolonie *Cr. sakazakii* se žlutým pigmentem, popř. se provedou biochemické testy pro ověření správnosti a výsledkem je tak potvrzení nebo vyvrácení přítomnosti těchto bakterií ve vzorku [7].

1.4.12 Bakterie rodu *Legionella*

Bakterie rodu *Legionella* jsou gram-negativní aerobní nesporulující tyčinky. Tyto bakterie můžeme najít např. v přírodních vodních nádržích, průmyslových vodách a znečištěných podzemních vodách. Neoxidují a nefermentují glukózu a jejich optimální teploty pro růst se pohybují od 25 - 43 °C. Všechny druhy bakterií rodu *Legionella* jsou potencionálně patogenní. Jsou původci nebezpečných onemocnění tzv. legionelózy a pro lidi s oslabenou imunitou mohou být i smrtelné. Zdrojem nákazy bývají rozvody teplé vody, vody v jezerech, potoky [9, 10].

Stanovení

Stanovení se provádí na půdách, které obsahují aktivní uhlí pro detoxikaci peroxidů přítomných v půdě. Typickou půdou pro stanovení legionel je BCYE agar, který je složen z kvasničného extraktu, zdroj cysteinu, z pyrofosfátu železitého a aktivního uhlí. Optimální

pH agaru (pH 6,8 – 7,0) udržuje speciální pufr ACES. Agar může být obohacen o vankomycin (antibiotikum), který inhibuje růst doprovodných mikroorganismů. Misky s inokulovaným vzorkem se inkubují při 36 °C během 7 dnů, kdy se první odečet provádí po 3 dnech a potom každý další den spolu s posouzením výsledků [9, 10].

1.4.13 Bakterie rodu *Shigella*

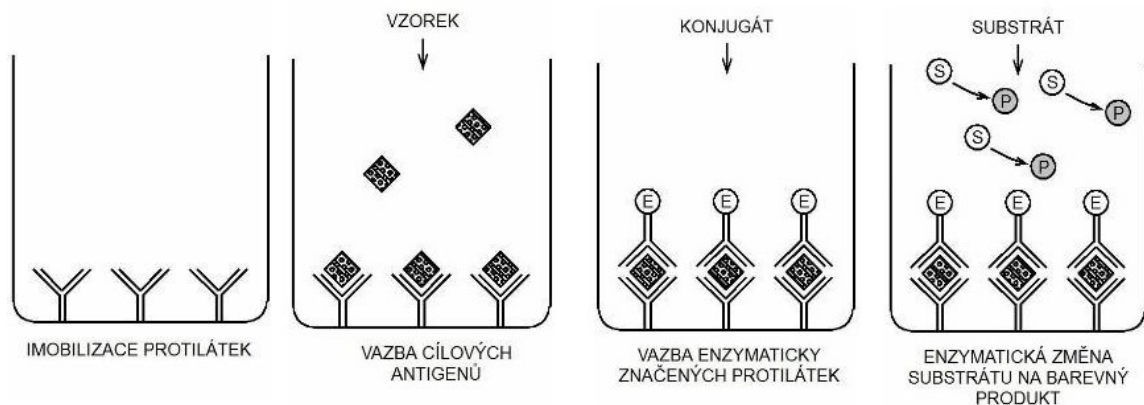
Bakterie rodu *Shigella* jsou gram-negativní, fakultativně anaerobní, nesporulující tyčinky, které patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Rod *Shigella* je geneticky podobný rodu *E. coli*, ale na rozdíl od něj jsou shigely například schopny dekarboxylovat lysin. Shigely jsou součástí střevního traktu člověka. Tyto bakterie jsou původci střevního onemocnění zvané shigelóza neboli bacilární úplavice. Přenos na člověka je způsoben zejména fekálně-orální cestou, kdy si například pracovník ve výrobě potravin po použití toalety dostatečně neumyje ruce a při manipulaci s potravinami tak dojde k jejich kontaminaci [9, 11].

1.5 Imunologické metody

Metody jsou založeny na určitých reakcích mezi protilátkami a antigeny. V potravinářské mikrobiologii jsou tyto metody hojně využívány zejména k detekci možné přítomnosti nebezpečných patogenních mikroorganismů a jejich toxinů spolu s toxiny plísní v potravinách. Jako **antigen** se označuje molekula, která je v těle schopna produkovat protilátky. **Protilátky** jsou látky proteinového charakteru produkované B-lymfocyty jako reakce imunitního systému na vniknutí cizích mikroorganismů do těla. Nevýhodou těchto metod bývá vznik falešně pozitivních výsledků. To je způsobeno především doprovodnou mikroflórou, která může zkříženě reagovat s protilátkami. Proto se provádí neselektivní pomnožení zkoumaného vzorku ještě před detekcí. Nejznámější a nejvyužívanější metodou je ELISA [5, 12].

1.5.1 ELISA

Podstatou této metody je vazba mezi specifickým antigenem a protilátkou, která je vždy upevněna na pevném nosiči (mikrozkuhavce) a značená enzymem. Enzym štěpením substrátu vyvolá barevnou změnu. Konečné vyhodnocení se poté provádí vizuálně nebo spektrofotometricky [5, 12]. *Princip metody je uveden na obrázku č. 3 (Princip metody ELISA).*



Obrázek 3 – Princip metody ELISA

Princip stanovení

- 1) Protilátky se upevní na pevném nosiči.
- 2) Přidá se vzorek a nechá se inkubovat (vzniká vazba antigen – protilátka).
- 3) Po inkubaci se vzorek promyje, čímž se odstraní přebytečný (nenavázaný) antigen.
- 4) Přidá se druhá protilátka (musí se vázat na stejný antigen) s kovalentně připojeným enzymem.
- 5) Poté se opět vzorek inkubuje a po inkubaci promyje, čímž se zbaví přebytečných protilátek s navázaným enzymem.
- 6) Na závěr se přidá substrát a dojde k reakci, která je katalyzována přítomným enzymem. Po proběhnutí reakce se provede vyhodnocení (vizuálně nebo spektrofotometricky).

1.6 Metody molekulární biologie

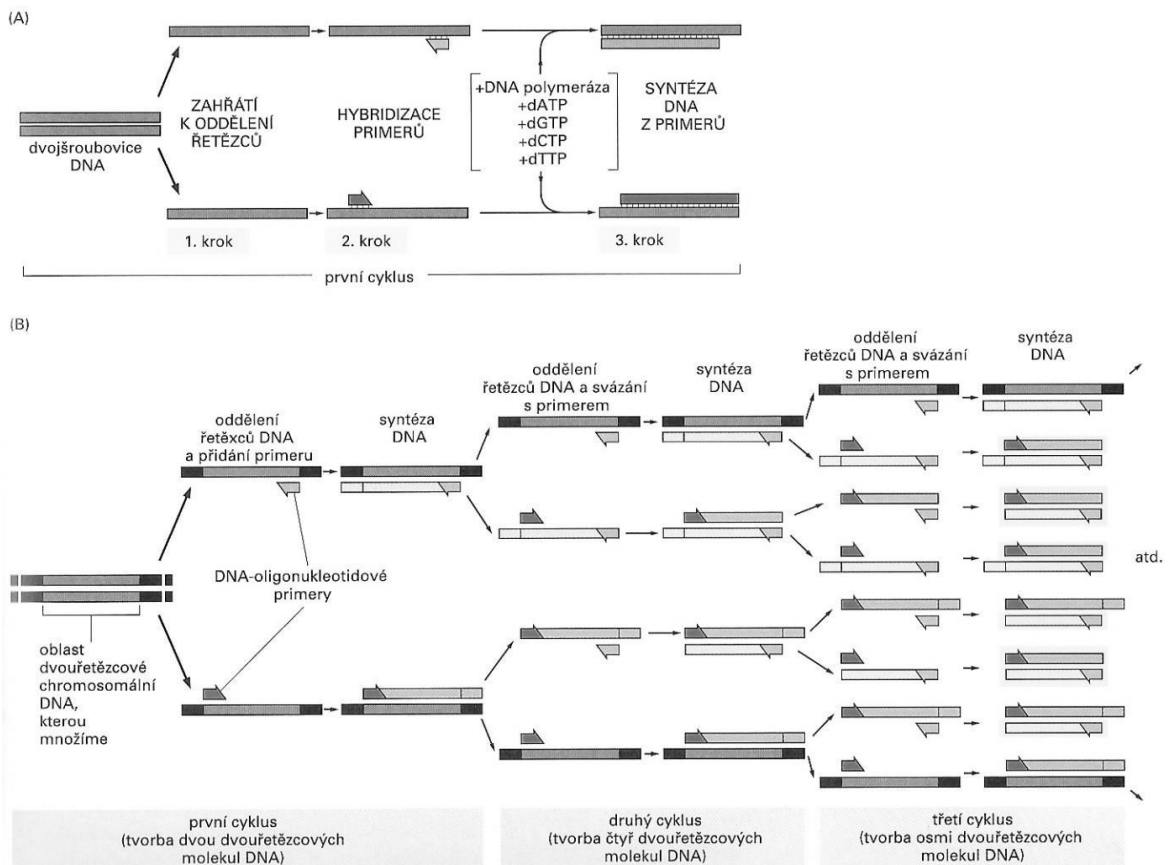
Metody molekulární biologie mají oproti klasickým kultivačním metodám řadu výhod. Mezi ty nejzásadnější patří zkrácení času potřebného k identifikaci mikroorganismů, vysoká citlivost a přesnější taxonomické zařazení (čeleď, rod, druh,...). U kultivačních metod to může být otázkou několika dnů, ale i více než týden. Principem těchto metod je detekce určitých nukleonových kyselin (RNA, DNA) daných mikroorganismů. Mezi nejznámější metodu patří tzv. PCR (Polymerázová řetězová reakce) [2, 5].

1.6.1 Polymerázová řetězová reakce

Tato metoda funguje na principu pomnožení (amplifikace) specifických úseků DNA v podmínkách *in vitro*. Nejdříve je potřeba uvolnit a vyizolovat nukleovou kyselinu ze

zkoumaného vzorku např. metodou fenolové extrakce. Poté může proběhnout namnožení DNA (amplifikace) a její identifikace. Samotná amplifikace probíhá ve třech krocích, které se několikrát opakují [1, 2, 5]. *Princip metody je uveden na obrázku č. 4 - Polymerázová řetězová reakce – amplifikace DNA.*

Nejdříve dochází k **denaturaci** DNA díky působení vysokých teplot kolem 96 °C, kdy se dvoušroubovice rozvolní a dostaneme tak dva jednovláknové řetězce. Dalším krokem je tzv. **hybridizace** (annealing), při které dohází k navázání primerů na základě komplementarity bází a to probíhá za teplot v rozmezí 40 – 70 °C. Posledním krokem je **elongace** (extenze), která probíhá při teplotě kolem 72 °C, kdy enzym DNA polymeráza prodlužuje nová vlákna DNA ve směru od 3'OH konce. Enzym DNA polymeráza musí během elongace odolávat vysokým teplotám, a proto je tento enzym získáván z termofilních bakterií. Nejčastěji z bakterie *Thermus aquaticus*. Celý proces amplifikace probíhá v termocykleru, aby bylo možné řídit změny teplot v průběhu jednotlivých reakcí. Produkty PCR (amplikony) je možné vizualizovat pomocí agarové gelové elektroforézy nebo pomocí různých barviv (ethidium bromid), díky kterým DNA fluoreskuje v UV světle [1, 2, 5].



Obrázek 4 Polymerázová řetězová reakce – amplifikace DNA

2 PŘÍRODNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

V dnešní době je na potravinářský průmysl vyvíjen čím dál tím větší tlak ze stran spotřebitelů na to, aby byly vyráběny potraviny s co nejdelší dobou trvanlivosti s minimálním množstvím konzervačních látek. Zároveň spotřebitelé vyžadují, aby pokud možno veškeré konzervační látky, nezbytné pro udržení nezávadnosti potravin, byly přírodního charakteru. To ovšem není úplně jednoduché, protože takové konzervační látky musí splňovat řadu kritérií, jako například: [13, 14]

- Působit co možná proti největšímu množství druhů bakterií (hlavně patogenním), plísní a kvasinek.
- Vykazovat mikrobiální účinky i při vyšších teplotách (být termostabilní).
- Jejich přítomnost a množství by v potravinách mělo být snadno měřitelné.
- Neměli by vykazovat toxické účinky.
- Nesmí negativně ovlivňovat sensorické vlastnosti potravin (aroma).
- Ponechat si konzervační schopnost i při nízkých koncentracích.
- V neposlední řadě musí být takové sloučeniny snadno extrahovatelné a dobře kultivovatelné [13, 14].

Ovšem nalézt přírodní sloučeninu, která by splňovala všechna výše uvedená kritéria je takřka nemožné. Proto se v potravinářském průmyslu využívá kombinace účinků přírodní antimikrobiální látky spolu s vlastnostmi potravin (např. nízké pH), tepelným opracováním, vhodným způsobem balení (např. balení v ochranné atmosféře) nebo se využívá kombinace účinků více konzervačních (antimikrobiálních) látek. Dalšími způsoby využití přírodních antimikrobiálních látek pro ochranu potravin je jejich aplikace v konzervačních aktivních obalech nebo tvorba jedlých povlaků [13].

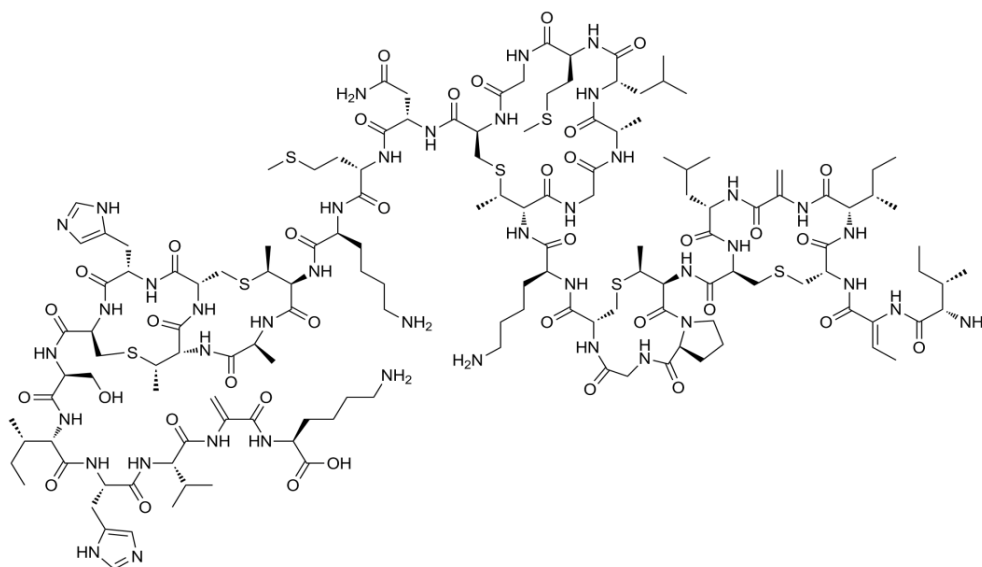
Přírodní antimikrobiální (konzervační) látky jsou produkovány rostlinami, živočichy a mikroorganismy (houby, bakterie), jako sekundárními metabolity, které v organismu plní obrannou funkci. Právě rostliny jsou nejhojnějším zdrojem těchto antimikrobiálních látek. V současnosti známe více než 1300 rostlin, ze kterých bylo extrahováno přes 30 000 sloučenin vykazující antimikrobiální účinky. Mnoho z nich je obsaženo v potravinách, které přes den běžně konzumujeme. Můžeme je nalézt například v koření (oregano, tymián, bazalka, rozmarýn, pepř,...) nebo v bylinkách (šalvěj, máta,...). Bohatými zdroji

jsou i ovoce (slupky z banánu, pomeranče, jablka, také citrusy,...) a zelenina (česnek, cibule,...)[13, 14].

2.1 Antimikrobiální látky produkované mikroorganismy

2.1.1 Nisin

Nisin je komerčně používanou konzervační látkou s antimikrobiálními účinky, která se jako přísada v potravinách používá od roku 1953 [13]. Patří do skupiny látek nazvaných bakteriociny. Bakteriociny jsou bakteriemi produkované peptidy, u kterých byl prokázán antibakteriální účinek. Nisin je produkován bakteriemi mléčného kvašení *Lactococcus lactis subsp. lactis*. Jeho struktura se skládá z 34 aminokyselinových zbytků (obrázek 5) [13, 15].



Obrázek 5 – Struktura nisinu

Mechanismus působení

Vytváří póry v buněčných membránách, čímž dochází k uvolňování intracelulárních iontů ven z buňky. To má za následek ztráty přenosu pomocí protonového gradientu. Dalším mechanismem účinku je schopnost nisinu inhibovat syntézu peptidoglykanů [13, 15].

Výroba

Nisin se vyrábí fermentací za udržení optimálního pH a teploty pro BMK (bakterie mléčného kvašení). Jako médium se využívá mléko s přísadou sacharózy, která slouží jako zdroj uhlíku. Po fermentaci se nisin oddělí od média například pomocí membránové

filtrace. Poté se vysráží přidávkem soli a následně se metodou rozprašování vysuší [13, 15].

Využití

Nisin působí baktericidně proti gram-pozitivním sporotvorným bakteriím (*Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*). Z tohoto hlediska se přidává do potravin, které byly ošetřeny působením vysokých teplot nad 130 °C (např. UHT mléko) a tím se výrazně snižuje riziko kontaminace nežádoucími sporotvornými bakteriemi [13, 15]. „Jeho použití v některých mléčných výrobcích, jako např. zrající a tavené sýry, pudinky a krémy je legislativně omezeno.“[18].

Nisin také působí bakteriostaticky proti některým patogenním bakteriím přenosných potravinami (např. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) [13, 15].

2.1.2 Pediocin

Tento bakteriocin je produkován některými kmeny z rodu *Pediococcus*. Jde o termostabilní bakteriocin, který je charakteristický působením zejména proti bakteriím rodu *Listeria*. Mechanismus účinku je podobný jako u nisinu. Napadá cytoplazmatickou membránu bakterií a vytváří v ní póry, což má za následek poruchu propustnosti a narušení membránového potenciálu [13, 15].

Výroba

Pediociny jsou metabolity produkované bakteriemi rodu *Pediococcus*. Jsou získávány fermentací substrátu obsahující glukózu nebo sacharózu. Při fermentaci je pro co nejvyšší produkci bakteriocinů potřeba sledovat koncentraci kyslíku během procesu. Při vysokých nebo naopak nízkých koncentracích může dojít k hromadění biomasy, což má negativní vliv na výtěžnost [15].

Využití

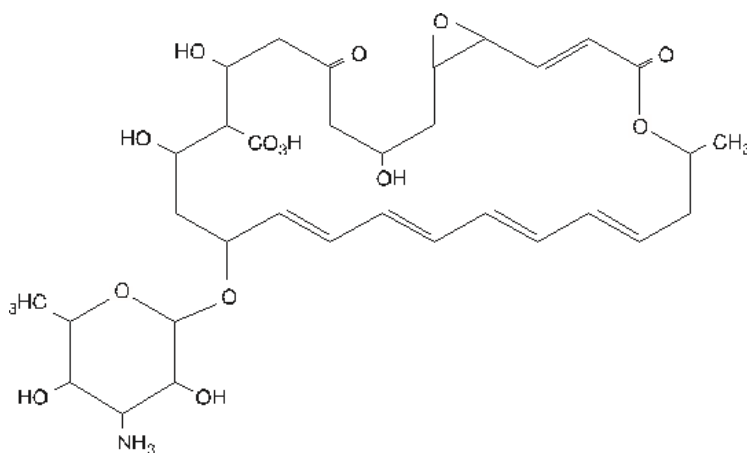
Bakterie rodu *Pediococcus* (produkující pediociny) se přirozeně vyskytují v mnoha potravinách, jako např. v kysaném zelí, uzených sýrech a mase. Pro minimalizaci výskytu *Listeria monocytogenes* v potravinách mohou být pediociny přidávány do mletého hovězího masa, rybích filet [13, 15].

2.1.3 Natamycin

Natamycin je komerčně využívaná konzervační látka přírodního původu. Tato antimikrobiální látka je produkována bakteriemi *Streptomyces natalensis* a několika dalšími příbuznými druhy. Má široké spektrum působení proti kvasinkám a plísním, naopak nevykazuje žádnou antibakteriální aktivitu [13, 15].

Mechanismus účinku

Váže se na ergosterol obsažený v membránách plísní nebo kvasinek, kdy blokuje funkci sterolu v membráně a dochází tak k usmrcení buňky. Naproti tomu bakterie ergosterol v membráně nemají a tak tedy proti nim nevykazuje žádnou antibakteriální aktivitu [13, 15].



Obrázek 6 – Struktura Natamycinu

Výroba

Průmyslově se natamycin vyrábí submerzní fermentací média na cukerné bázi s následnou extrakcí pomocí organického rozpouštědla (butanol). Po vysrážení a následném sušení se získají bílé krystaly, které jsou z poloviny tvořeny čistým natamycinem [15].

Využití

Využívá se hodně jako aditivum do fermentovaných potravin hlavně kvůli tomu, že působí aktivně proti plísním a kvasinkám a neúčinkuje proti bakteriím. V současnosti se využívá k ošetření povrchů sýrů, klobás a je také přidáván do nápojů (džusy, pivo, víno), kde plní funkci konzervační látky [13, 15, 18].

2.1.4 Reuterin

Reuterin neboli β -hydroxypropionaldehyd je organickou látkou s širokým antimikrobiálním spektrem působení. Jedná se o meziprodukt bakterií druhu *Lactobacillus reuteri*, které byly nalezeny v zažívacím traktu zvířat i lidí. Můžeme je nalézt i v některých potravinách, jako například v mléčných výrobcích nebo v mase. Reuterin vykazuje řadu důležitých vlastností, jakými jsou odolnost proti působení vyšších teplot a mnoha enzymům (protézy, lipázy), působení proti řadě gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím (hlavně působí proti patogenním mikroorganismům). Přesto všechno není prozatím schválen jako přídatná látka do potravin [13].

2.2 Rostlinné antimikrobiální látky

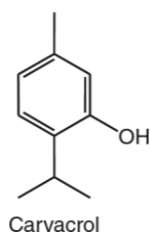
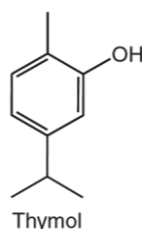
Rostliny byly lidmi pro léčebné účely využívány již od pradávna. Již staří Egypťané před několika tisíci lety účelně pěstovali byliny pro jejich léčebné účely a náboženské rituály. V průběhu dějin lidstva se byliny a exotické druhy koření dovážely do různých částí světa, kde se pěstovaly nejdříve pro jejich vzhled (jako okrasné rostliny). Vyspělejší civilizace se postupně začali více zajímat o možných léčebných účincích těchto bylin a pokoušely se tak extrahovat z těchto bylin jejich účinné složky. Dodnes nejpoužívanějšími způsoby extrakce jsou destilace vodní parou nebo lisování spojeno s extrakcí těkavým rozpouštědlem (hexan). Zvolený postup extrakce má veliký význam pro výsledné chemické složení a tím pádem dochází i k ovlivnění antimikrobiálních vlastností extraktu. Chemické složení extraktů je také závislé na místě výskytu a doby sklizně rostlin. Následným rozborem těchto rostlinných extraktů pomocí moderních metod plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie bylo dodnes zjištěno více než 30 000 sloučenin vykazující antimikrobiální účinky. Některé z nich byly schváleny pro použití v potravinách[13, 16].

2.2.1 Thymol a Karvakrol

Jsou složkami esenciálních olejů získaných extrakcí např. z oregana nebo tymiánu. Obě látky kromě antimikrobiálních účinků vykazují i antioxidační vlastnosti a jsou si strukturně dosti podobné (liší se pouze polohou hydroxylové skupiny na fenolovém kruhu), viz Obrázek č. 6[13, 19].

Thymol je jednou z nejvíce zastoupených složek esenciálních olejů extrahovaných z Tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*). Vykazuje antimikrobiální, antioxidační, antivirové a protizánětlivé účinky. Thymol ve formě esenciálních olejů působí antimikrobiálně např. proti *Staphylococcus aureus* (MIC = 225-310 µg/ml), *Escherichia coli* (MIC = 225-5000 µg/ml). Antimikrobiální mechanismus působení není zcela znám, ale ví se, že nějakým způsobem narušuje permeabilitu membrán, čímž dohází ke ztrátě membránového potenciálu (např. únikem draselných iontů). Oreganové extrakty vykazovaly MIC (minimální inhibiční koncentraci) proti *Listeria monocytogenes* již v množství 0,5 – 1 % [13, 19].

Karvakrol vykazuje synergický účinek spolu s nisinem, kdy zesiluje jeho antimikrobiální působení proti *L. monocytogenes* nebo *Bacillus cereus*. [13].



Obrázek 7 - Struktura Karvakrolu a Thymolu

2.2.2 Borneol

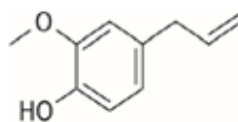
Borneol je jednou z antimikrobiálních látek obsažených v extraktech z šalvěje lékařského (*Salvia officinalis*) a rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*). Vykazuje antibakteriální účinek proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím. Velice účinnou baktericidní látkou vůči *L. monocytogenes* se ukázal 0,5 % extrakt z rozmarýnu. Studie prokázaly bakteriostatické účinky kombinovaného extraktu z rozmarýnu a oregana vůči *Escherichia coli* 0157:H7 v syrové mrkvy. „V kombinaci rozmarýnového extraktu spolu s nisinem dochází k výraznému posílení jak baktericidních tak i bakteriostatických účinků vůči *Listeria monocytogenes* a *Bacillus cereus* v boloňské omáče.“[13].

2.2.3 Vanillin

Vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd) je majoritní složkou vanilkového extraktu, který se získává z *Vanilla planifolia*. Tento aldehyd je přidáván do mnoha potravin, jako nealkoholické nápoje, zmrzlina, čokoláda, sirupy, pudinky a mnoho dalších. Studie prokázaly antimikrobiální účinky vanillinu proti mnoha plísním a gram-pozitivním bakteriím (mimo BMK) [13].

2.2.4 Eugenol

Eugenol (2-methoxy – 4-allylphenol) je hlavní složkou ze skupiny fenolů, která je obsažena v oleji z hřebíčku (*Syzygium aromaticum*). Jde o lehce nažloutlou kapalinu, která vykazuje proti mnoha druhům bakterií, jako například *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, inhibiční účinky v rozmezí $12,5 - 50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (vyjádřeno jako MIC) [21].



Eugenol

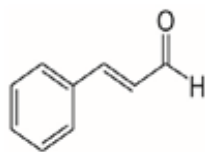
Obrázek 8 – Struktura eugenolu

Mechanismus účinku

„Předpokládá se, že hydroxylová skupina na eugenolu se váže na proteiny a brání působení enzymů u bakterií *Enterobacter aerogenes*.“ [21].

2.2.5 Skořicový aldehyd

Skořicový aldehyd neboli 3 – fenyl-2-propenal patří k hlavním složkám skořicových olejů [21]. „Skořice obsahuje 0,5–1,0% těkavého oleje, z nichž 75% je skořicový aldehyd a 8% eugenolu.“ [13]. V přírodě převládá trans forma tohoto aldehydu, což je dožluta zabarvená kapalina se silnou skořicovou vůní. Skořicový aldehyd je podle amerického úřadu FDA (Food and Drug Administration) klasifikován jako bezpečná látka schválená pro použití v potravinách. Skořicový aldehyd inhibuje růst řady druhů kvasinek, plísní a bakterií, jako např. *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*. Minimální inhibiční koncentrací (MIC) aldehydu vůči zmíněným bakteriálním druhům se pohybovala v rozmezí $0,78 - 12,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. [21].



Skořicový aldehyd

Obrázek 9 – Struktura skořicového aldehydu

Mechanismus účinku

Při testech účinků skořicového aldehydu na *Sacharomyces cerevisiae* došlo k poškození cytoplazmatické membrány, což způsobilo vylití buněčného obsahu ven z buňky a následně její usmrcení. V dalších testech na bakteriích druhu *E. coli* bylo prokázáno že aldehyd výrazně snižuje hladinu buněčného glutationu [21].

2.2.6 Humulony

Humulony jsou organické kyseliny a patří k důležitým složkám chmele (*Humulus lupulus*), které pivo dodávají typicky hořkou chuť. Analogy α a β těchto kyselin působí antimikrobiálně proti gram-negativním a gram-pozitivním bakteriím. Hodně citlivé na tyto analogy jsou bakterie mléčného kvašení. Nevýhodou humulonů je jejich hořká chuť, takže jejich použití mimo hořké potraviny (pivo) nebude tak rozšířené [13].

2.3 Živočišné antimikrobiální látky

2.3.1 Laktoperoxidázy

Jde o enzymy, které jsou běžnou součástí slin a slz. V hojném počtu jsou zastoupeny i v mléce, kdy např. v kravském tvoří až 1 % syrovátkových bílkovin. Tyto enzymy produkují antimikrobiální sloučeniny pouze v přítomnosti peroxidu vodíku [13].

Mechanismus účinku

Cílem enzymů je narušení správné funkce cytoplazmatické membrány [13].

Využití

V rozvojových zemích se tyto enzymy díky bakteriostatickým účinkům využívají k prodloužení trvanlivosti tzv. surového mléka (8 hodin při 30 °C) [13].

Výroba

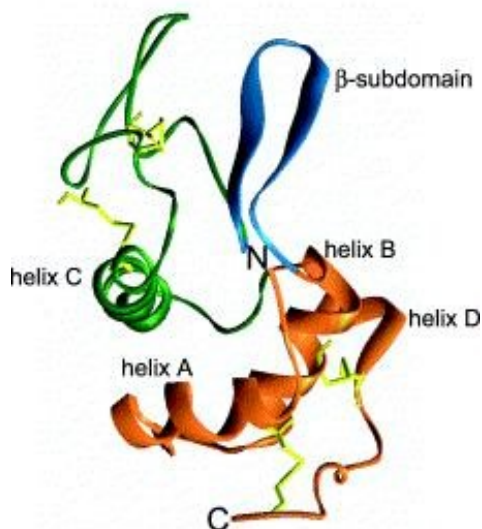
V průmyslovém měřítku se laktoperoxidázy izolují vysrážením kaseinu a následnou adsorpcí syrovátkových proteinů iontovou výměnou [13].

2.3.2 Laktoferrin

Jedná se o glykoprotein převážně obsažený v mléce, který je schopný vázat železo a jiné kovové ionty. Mimo mléko ho můžeme nalézt ve slinách, v pankreatické šťávě, slzách, nebo v potu. Přípravky s obsahem laktoferrinu jsou komerčně dostupné v kapalných nebo suchých formách. Laktoferrin vykazuje slibné účinky působení v masných výrobcích. Hydrolyzou laktoferrinu vzniká peptid laktoferricin, který vykazuje až 40 krát vyšší antimikrobiální aktivitu oproti laktoferrinu. Laktoferricin aktivně působí proti řadě gram-pozitivních a gram-negativních bakterií. Nevýhodou tohoto peptidu jsou vyšší výrobní náklady [13].

2.3.3 Lysozym

„Tento enzymatický protein byl objeven Alexanderem Flemingem v roce 1921“ [22]. Lysozym je enzym obsažený v proteinech vaječného bílku, slzách, slinách a také je produkován některými mikroorganismy a rostlinami. Slepíčí vejce jsou bohatým zdrojem lysozymu, kde se jeho obsah pohybuje kolem 3 mg/g. Enzym tvoří polypeptidový řetězec složený ze 129 aminokyselin, které jsou zesíťovány disulfidovými můstky. Lysozym vykazuje minimální aktivitu proti gram-negativním bakteriím a to kvůli jejich vnější membráně obsahující lipopolysacharidy. Oproti tomu v laboratorních podmínkách vykazoval dobré antimikrobiální vlastnosti proti bakteriálním druhům, jako *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*. V potravinách nese označení E1105 [13, 17, 18, 22].



Obrázek 10 - Struktura lysozymu

Využití

Jde o celosvětově užívanou (pro člověka) bezpečnou konzervační látku v potravinách. O čemž svědčí to, že jí povolila Světová zdravotnická organizace (WHO). Jako antibakteriální konzervační látka může být přidáván do rybích a masných produktů, mléka a mléčných produktů, ovoce a zeleniny. Lysozym má také slibnou budoucnost v obalových technologiích potravin, jako součást antimikrobiálních biofilmů nebo nanomateriálních obalů jejichž funkcí je prodloužení trvanlivosti potravin [22].

Mechanismus účinku

Lysozym hydrolyzuje β -1,4 vazby mezi N-acetyl-d-glukosaminem a kyselinou N-acetylmuramovou v peptidoglykanu mureinu u gram-pozitivních bakterií [17, 22].

Výroba

Běžně používaným způsobem pro získání lysozymu je jeho izolace a čištění z bílkovin vajec pomocí membránové separace, gelové filtrace, adsorpce. Dalším způsobem může být přímá krystalizace působením redukčních činidel nebo namnožení za využití metod genetického inženýrství (rekombinantní metody) [22]. „Použití rekombinantního lysozymu může být účinnou strategií k překonání bakteriální rezistence proti tzv. divokému lysozymu.“[15].

2.3.4 Protamine

Protamin je peptid, který vykazuje antimikrobiální aktivitu proti řadě gram-pozitivních, gram-negativních bakterií a proti kvasinkám a plísním. V Japonsku se využívá jako konzervační látka v škrobu [13].

2.4 ISO 16140

„Evropská a mezinárodní norma EN ISO 16140 poskytuje společný referenční protokol pro validaci alternativních metod a pro stanovení obecných zásad pro jejich případnou následnou certifikaci. Tato norma se v současné době reviduje a jsou uvedeny hlavní směry.“ [24]

„Podle **Codex Alimentarius** musí být mikrobiologické kritérium založeno zejména na metodě detekce, která je relativně snadno proveditelná, ale také spolehlivá a ověřená“.[24]

(„*Codex Alimentarius* je podle překladu z latiny "potravinářský zákoník". Cílem *Codex Alimentarius* je prosazovat ochranu spotřebitelů a usnadnit celosvětový obchod s potravinami prostřednictvím vypracování potravinových norem, kodexů správné praxe a dalších pokynů.“) [25]

(„*Alternativní metodu* lze definovat jako metodu, která analyzuje pro daný rozsah stejný cílový vzorek jako vzorek naměřený odpovídající referenční metodou a která splňuje požadavky, jakými jsou: rychlá analýza nebo odezva, musí být snadno proveditelné nebo automatizovatelné, výsledky stanovení přinejmenším stejně dobré jako u referenční metody.“)[24]

Stručný popis normy

V první části normy jsou stanoveny zásady validačního protokolu, které zahrnují dvě fáze:

- 1) Srovnávací studii alternativní metody s odpovídající referenční metodou, provedenou jednou laboratoří.
- 2) Paralelně provedenou mezilaboratorní studii obou metod organizovanou laboratoří odpovědnou za první fázi.

Norma definuje technická pravidla pro tyto dvě fáze, podle každého typu metody (kvalitativní nebo kvantitativní). Pokud se vedle jejich technické validace požaduje certifikace metod, jsou pro tuto certifikaci stanoveny obecné zásady. Podrobnosti o organizaci certifikace poskytují certifikační orgány ve svých certifikačních pravidlech. [24]

V druhé části se norma zabývá obecnými zásadami certifikace alternativních metod třetí stranou. „Uplatňuje se na mikrobiologickou analýzu každé potraviny určené k lidské spotřebě a spotřebě zvířat, jakož i na analýzu vzorků z primární produkce (šlechtitelského prostředí) a z prostředí výroby potravin a manipulace.“[24]

„Norma dále podrobně popisuje technická pravidla pro validaci, které se skládají z výběru souboru analytických výkonnostních kritérií. Pro každé kritérium norma stanoví definici, experimentální návrh, výpočty a interpretaci.“[24]

„Hlavními uživateli EN ISO 16140 jsou validační nebo certifikační orgány a jejich partneři, zejména odborné laboratoře, které provádějí validaci zkušebních souprav na žádost výrobců souprav.“[24]

Shrnutí

V současnosti se častěji analyzuje pomocí inovativních technologií, protože uvádí výsledky mnohem rychleji, provedení samotné analýzy je celkově snazší a nevyžaduje tak kvalifikovaný personál, který by byl třeba u klasických mikrobiologických analýz. „Norma EN ISO 16140 dává spotřebitelům jistotu, že výsledky získané pomocí inovativních metod budou stejně platné (stejně dobré nebo lepší), jako výsledky získané metodami klasické mikrobiologie.“ [24]

2.5 Úřady pro bezpečnost potravin

2.5.1 FDA (Food and Drug Administration)

„Úřad pro kontrolu potravin a léčiv odpovídá za ochranu veřejného zdraví zajištěním bezpečnosti a účinnosti humánních a veterinárních léčiv, biologických produktů a zdravotních prostředků spolu se zajištěním bezpečnosti potravin. Dále odpovídá za regulaci výroby, uvádění na trh a distribuci tabákových výrobků za účelem ochrany veřejného zdraví a za snížení spotřeby tabáku nezletilým.“ [25]

„FDA je zodpovědná za zlepšování veřejného zdraví tím, že pomáhá urychlit inovace, které zvyšují efektivitu, bezpečnost a dostupnost lékařských produktů, a pomáhá veřejnosti získat přesné vědecké informace, které potřebují k používání zdravotnických produktů a potravin k udržování a zlepšování jejich zdraví.“ [25]

GRAS

Jde o označení přídatných látek v potravinách, kdy GRAS je zkratka pro frázi - obecně uznávaná jako bezpečná. [25]

2.5.2 EFSA (European Food Safety Authority)

EFSA neboli evropský úřad pro bezpečnost potravin je agentura financovaná Evropskou unií, která byla založena v roce 2002. „Tento úřad poskytuje nezávislé vědecké poradenství ohledně rizik souvisejících s potravinami.“[26]

EFSA vydává upozornění o možném vzniku rizik spojených s potravinami, kdy tato rizika slouží, jako předloha pro tvorbu evropských předpisů. Ty jsou ve výsledku určeny k ochraně spotřebitele.[26]

Úřad se zabývá těmito oblastmi:

- Bezpečnost potravin a krmiv
- Výživa člověka
- Zdraví a správné zdravotní podmínky zvířat
- Zdraví rostlin [26]

„Dalšími povinnostmi EFSA je shromažďovat vědecké údaje a poznatky, poskytovat nezávislé a vědecké informace v oblasti bezpečnosti potravin a informovat o svých poznatcích veřejnost.“[26]

2.5.3 WHO (World Health Organization)

Světová zdravotnická organizace v oblasti bezpečnosti potravin má za úkol napomáhat členským státům budovat kapacity pro prevenci, detekci a řízení rizik. [27]

„Důležitou roli zastupuje především v poskytování nezávislých vědeckých hodnocení rizik (mikrobiologických a chemických), která tvoří základ mezinárodních potravinových norem, pokynů a doporučení, známých jako Codex Alimentarius, s cílem zajistit, aby jídlo pocházející odkudkoliv bylo bezpečné.“ [27]

Dalšími úkony této organizace jsou např.:

- Posuzování bezpečnosti používání nových technologií (nanotechnologie, genetická modifikace) při výrobě potravin.
- Napomáhat v zavádění infrastruktur pro řízení rizik v oblasti bezpečnosti potravin.
- Usilovat o začlenění bezpečnosti potravin do vnitrostátní politiky a programů v souladu s mezinárodními zdravotními předpisy.[27]

10 pravidel pro bezpečnou konzumaci potravin dle WHO:

- 1) Nakupovat a používat k přípravě pokrmů potraviny, které jsou zdravotně nezávadné.
- 2) Zabezpečit dokonalé tepelné ošetření potravin.
- 3) Konzumovat jídlo co nejdříve po uvaření.
- 4) Uchovávat tepelně ošetřené potraviny ve vhodných podmínkách.
- 5) Již uvařené potraviny před opětovnou konzumací důkladně ohřát.
- 6) Zamezit křížové kontaminaci potravin (mezi syrovými a uvařenými potravinami).
- 7) Dbát na řádnou hygienu rukou před manipulací s potravinami.
- 8) Při zpracování a vaření potravin používat důkladně umytá kuchyňská zařízení.
- 9) Zamezit styku potravin s hmyzem, hlodavci a jinými zvířaty.
- 10) Používat při výrobě, zpracování potravin pouze pitnou vodu.[27]

ZÁVĚR

Běžní spotřebitelé se v dnešní době snaží co nejvíce vyhýbat potravinám s obsahem syntetických konzervačních látek. Jsou také odpůrci potravin, na kterých je ve složení uvedeno, že obsahují řadu tzv. éček. Nejspíše v domnění, že se jedná o látky tělu ne příliš prospěšné a po zdravotní stránce nejsou úplně vhodné ke konzumaci. Spousta těchto konzumentů si však asi neuvědomuje, že právě přídatné látky nesoucí E kód byly testovány a odborníky schváleny jako zcela bezpečné v množství, ve kterém se v potravině nachází. Ovšem i v tomto odvětví, jako v mnoha dalších platí: „Náš zákazník, náš pán“.

Proto se potravinářský průmysl musel více zaměřit na využití přírodních konzervačních látek. To ale není úplně jednoduchá záležitost, protože i když se jedná o látky přírodního charakteru, tak nelze použít každou. Platí pro ně stejné podmínky jako u těch syntetických. Musí být odolné vůči vyšším teplotám, vykazovat konzervační účinky již při nižších dávkách, nesmí při požití působit toxicky a mnoho dalších.

Přírodní antimikrobiální látky mají v poslední době čím dál tím více možností využití. S pokrokem techniky a rozšířením znalostí v oborech mikrobiologie a technologie už nejsou jen přímou součástí potravin, ale s rozvinutím nanotechnologií mohou vytvářet polymerní sloučeniny s antimikrobiálními vlastnostmi, které se využívají jako součást biodegradabilních nebo inteligentních obalů. Dalším způsobem může být například tvorba jedlých ochranných vrstev na povrchu potravin.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ČERNÍKOVÁ, M., MÍŠKOVÁ, Z.: *Praktická cvičení z potravinářské mikrobiologie*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010. ISBN 978-80-7318-749-1.
- [2] BURDYCHOVÁ, R., SLÁDKOVÁ, P.: *Mikrobiologická analýza potravin*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-116-6.
- [3] RŮŽIČKA, Jan.: *Mikrobiologická cvičení*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2001. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-7318-017-0.
- [4] FONTANA, Josef, Jan TRNKA a Lucie NOVÁKOVÁ. *Funkce buněk a lidského těla* [online]. 2015 [cit. 2020-01-29]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/ii-premenalatek-a-energie-v-bunce/6-enzymy/>
- [5] BURSOVÁ, Š., RENÁTA, K., MARTA, D., LENKA, N.: *Mikrobiologie potravin – praktická cvičení I. Obecná mikrobiologie. Revidované vydání* [online]. 2. dopl. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014 [cit. 2020-01-29]. ISBN 978-80-7305-683-4. Dostupné z: <https://fvhe.vfu.cz>
- [6] KOPECKÁ, J., ROTKOVÁ, G.: *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií* [online]. Brno: Masarykova univerzita Brno, 2017 [cit. 2020-01-29]. ISBN 978-80-210-8787-3. Dostupné z: <https://is.muni.cz>
- [7] CUPÁKOVÁ, Š., KARPÍŠKOVÁ, R., NECIDOVÁ, L.: *Mikrobiologie potravin - praktická cvičení II: metody stanovení mikroorganismů v potravinách* [online]. Vyd.1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2010, 108 s. ISBN 978-80-7305-126-6. Dostupné z: <https://fvhe.vfu.cz/files/skripta-mikrobiologie-potravin-ii.pdf>
- [8] MACHÁLKOVÁ, Monika. *Tepelné ošetření mléka, jeho vliv na kvalitu a zdravotní nezávadnost* [online]. Brno, 2012 [cit. 2020-04-18]. Dostupné z: <https://is.mendelu.cz/zp/?lang=cz>. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně. Vedoucí práce Táňa Lužová.
- [9] *Repetitorium z mikrobiologie* [online]. 3. lékařská fakulta Univerzita Karlova [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/rep/rep.htm>
- [10] ŠKROBALOVÁ, Petra. *Zdravotní riziko legionel ve vlcích a jeho hodnocení* [online]. Olomouc, 2013 [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/gc1qsc/7679051>. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Vedoucí práce Vladimír Drašar.
- [11] BENEŠOVÁ, Marie. *Taxonomické zařazení rodu Shigella* [online]. Pardubice, 2012 [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: <https://dk.upce.cz>

- [12] BURSOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ, Lenka NECIDOVÁ, Renáta KARPÍŠKOVÁ a Petra MYŠKOVÁ. *Mikrobiologické laboratorní metody* [online]. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014 [cit. 2020-04-25]. ISBN 978-80-7305-676-6. Dostupné z: <https://fvhe.vfu.cz>
- [13] BAINES, David a Richard SEAL. *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings* [online]. 80 High Street, Sawston, Cambridge CB22 3HJ, UK: WoodheadPublishing, 2012 [cit. 2020-04-28]. ISBN 978-0-85709-572-5. Dostupné z: <https://www.elsevier.com>
- [14] MUHAMMAD, SajidArshad and SyedaAyeshaBatoool. *Natural Antimicrobials, theirSources and Food Safety, Food Additives*, [online]. Desiree Nedra Karunaratne and GeethiPamunuwa, IntechOpen, 2017[cit. 2020-04-28] DOI:10.5772/intechopen.70197. Dostupné z: <https://www.intechopen.com>
- [15] EMILIO BORDIGNON, Sidnei a Júlio CESAR DE CARVALHO. Natural AntimicrobialCompounds. LEMOS BICAS, Juliano, Mário ROBERTO MARÓSTICA JR. a Maria GLAUCIA PASTORE. *BiotechnologicalProductionof Natural Ingredientsfor Food Industry: 978-1-68108-2653* [online]. Bentham Science Publishers, 2016, s. 406-434 [cit. 2020-05-04]. ISBN 978-1-68108-265-3. Dostupné z: <https://books.google.cz>
- [16] PETER, K. V., ed. *Handbook ofherbs and spices*. 2nd ed. Oxford: Woodhead, 2012-. WoodheadPublishingseries in food science, technology and nutrition. ISBN 978-0-85709-040-9.
- [17] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin I*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [18] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin II*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [19] GALOTTO M. J. and C. López de Dicastillo. Thymol: Use in AntimicrobialPackaging. *Antimicrobial Food Packaging* [online]. Elsevier BV, 2016, s. 553-562 [cit. 2020-05-12]. ISBN 978-0-12-800723-5. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com>
- [20] TIWARI, Atul. *Handbook ofAntimicrobialCoatings* [online]. USA: Department ofMechanicalEngineering, University ofHawaiiatManoa, Honolulu, HI, USA, 2018 [cit. 2020-05-13]. ISBN 978-0-12-811982-2. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com>

- [21] SUPPAKUL, P. Cinnamaldehyde and Eugenol: Use in Antimicrobial Packaging. BARROS-VELÁZQUEZ, Jorge. *Antimicrobial Food Packaging* [online]. Elsevier, 2016, s. 479-490 [cit. 2020-05-13]. ISBN 978-0-12-800723-5. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com>
- [22] KUDDUS, Mohammed. *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects* [online]. Academic Press, 2019 [cit. 2020-05-13]. ISBN 978-0-12-813280-7. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com>
- [23] FRARE, Erica, Patrizia POLVERINO DE LAURETO, Jesús ZURDO, Christopher M. DOBSON a Angelo FONTANA. A Highly Amyloidogenic Region of Hen Lysozyme. *Journal of Molecular Biology*. 2004, vol. 304, issue 5, s. 1153-1165. DOI:10.1016/j.jmb.2004.05.056. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283604006369>
- [24] LOMBARD, Bertrand a Alexandre LECLERCQ. Validation of Innovative Food Microbiological Methods According to the EN ISO 16140 Standard. *Food Analytical Methods* [online]. 2011, 4(2), 163-172 [cit. 2020-05-16]. DOI: 10.1007/s12161-010-9154-4. ISSN 1936-9751. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12161-010-9154-4>
- [25] Codex Alimentarius – základní informace. *Bezpečnost potravin* [online]. Ministerstvo zemědělství, 2018 [cit. 2020-05-16]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/kategorie/codex-alimentarius-zakladni-informace.aspx>
- [25] *U.S. Food and Drug Administration* [online]. USA [cit. 2020-05-16]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/>
- [26] *Oficiální internetová stránka Evropské unie: Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA)* [online]. 2019 [cit. 2020-05-18]. Dostupné z: https://europa.eu/european-union/about-eu/agencies/efsa_cs
- [27] *World Health Organization: Food safety* [online]. 2020 [cit. 2020-05-18]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PCR Polymerázová řetězová reakce

KTJ Kolonie tvořící jednotky

DNA Deoxyribonukleová kyselina

RNA Ribonukleová kyselina

ELISE Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

G+ Gram-pozitivní bakterie

G- Gram-negativní bakterie

UV Ultrafialové záření

BMK Bakterie mléčného kvašení

MIC Minimální inhibiční koncentrace

FDA Food and Drug Administration

WHO World Health Organization

EFSA European Food Safety Authority

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – ENTEROtest, [6].....	16
Obrázek 2 - Křížový roztěr, [6]	18
Obrázek 3 – Princip metody ELISA, [5]	28
Obrázek 4 Polymerázová řetězová reakce – amplifikace DNA, [5].....	29
Obrázek 5 – Struktura nisinu, [15].....	31
Obrázek 6 – Struktura Natamycinu, [13].....	33
Obrázek 7 - Struktura Karvakrolu a Thymolu, [16]	35
Obrázek 8 – Struktura eugenolu, [21].....	36
Obrázek 9 – Struktura skořicového aldehydu, [21]	37
Obrázek 10 - Struktura lysozymu, [23]	39

