

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Stanovení mikroorganismů ve vzduchu potravinářských
provozů**

Bakalářská práce

Autor práce: Andrea Krýzová

Vedoucí práce: Ing. Eva Popelářová Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Stanovení mikroorganismů ve vzduchu potravinářských provozů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Evě Popelářové, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky k této práci a věnovaný čas. Dále bych chtěla poděkovat Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky za poskytnuté materiály. Mé poděkování patří také doc. Ing. Ladislavu Chládkovi, CSc. za ochotu a poskytnuté prostory v pivovaru.

Stanovení mikroorganismů ve vzduchu potravinářských provozů

Souhrn

Mikroorganismy mohou svou přítomností v potravinářských provozech znehodnotit potraviny, proto je třeba provádět kontrolu kvality ovzduší. Cílem bakalářské práce bylo potvrdit, že kvalita vzduchu v potravinářském provozu je lepší než v běžném prostředí. Mikrobiální čistota by měla být nejvyšší především v místech, která jsou riziková z hlediska kontaminace produktů.

Složení vzduchu bylo sledováno ve Výukovém a výzkumném minipivovaru České zemědělské univerzity v Praze. Byl hodnocen celkový počet mikroorganismů a počet plísni. U plísni bylo určeno i rodové zastoupení. Vzorky vzduchu s přítomnými mikroorganismy byly odebrány z pěti částí pivovaru za využití aktivního nasávání vzduchu pomocí aeroskopu Mas 100 Eco (Merck, Německo). Jednalo se o sanitační stanici, ležácký sklep, úsek chlazení mladiny, varnu, a pro porovnání chodbu. Rozbor vzduchu byl proveden dvakrát s odstupem dvou měsíců.

Podle zjištěných výsledků se v sanitační stanici nacházely vyšší celkové počty mikroorganismů než v chodbě. Tento zvýšený výskyt však mohl souviset s pronikáním mikrobů z venkovního prostředí vzhledem k provizornímu využívání vchodu vedoucího do této místnosti. V ostatních částech provozu byl již potvrzen nižší celkový počet mikroorganismů než v chodbě. Stanovení počtu plísni ukázalo, že v celém provozu byly nižší koncentrace těchto mikrobů než v chodbě.

Rizikovým místem v minipivovaru je z hlediska kontaminace produktu ležácký sklep, protože zde kromě zrání piva dochází také k jeho stáčení. Zde byl potvrzen nižší výskyt mikroorganismů než v běžném prostředí, a jelikož ostatní části provozu nepředstavují riziko znehodnocení produktu, cíl práce byl splněn.

Z rodového zastoupení plísni ve vzduchu minipivovaru vyplývá, že nejhojnější plísní byl rod *Cladosporium* a následně *Penicillium*. Rod *Cladosporium* zaujímal průměrně 54,8 % z celkového počtu mikromycet. V menších koncentracích se vyskytovaly také rody *Alternaria* a *Aspergillus*.

Klíčová slova: kvalita vzduchu, vzorkování vzduchu, mikroorganismy

Determination of microorganisms in the air of food premises

Summary

Microorganisms are able to spoil foods with their presence in food plants, therefore, there is necessary to perform the monitoring of microbial air quality. The aim of this Bachelor thesis was to confirm that the air quality in the food plant is better than in the current environment. Microbial cleanliness should be at the highest level, especially in places where is risk of contamination of the products.

Air composition was observed in microbrewery by Czech University of Life Sciences Prague. It was evaluated by the total number of microorganisms and number of moulds. In the case of moulds there was also determined gender representation. Samples of air with present microorganisms were collected from five parts of the brewery, using active air intake with airsampler MAS 100 Eco (Merck, Germany). It was a sanitation station, lager beer cellar, section wort cooling, boiling room and to compare the hall. Air analysis was performed twice with intervals of two months.

According to the findings, in sanitation station can be found higher total number of microorganisms than in the hall. However, this increased incidence could be related to microbial penetration from the outside environment due to the use of makeshift door leading into the room. In other parts of the operation has already been confirmed less than the total number of microorganisms in the hall. Enumeration of molds revealed that the entire operation were lower than the concentrations of these microbes in the corridor.

Dangerous place in the brewery in terms of contamination of the product is lager cellar, because here with maturation occurs also his tapping. Here upheld a lower incidence of microorganisms than in the current environment, and as other parts of the plant do not pose a risk of product degradation, the objective has been achieved.

Of the native representation of mould in the air microbrewery it shows that the most abundant mould genus was *Cladosporium* and *Penicillium* followed. *Cladosporium* occupied on average 54,8 % of the total number of mould. At lower concentrations, there have been also genera *Alternaria* and *Aspergillus*.

Keywords: air quality, air sampling, microorganisms

Obsah

1 Úvod.....	9
2 Cíl práce.....	10
3 Literární rešerše.....	11
3.1 Složení ovzduší.....	11
3.1.1 Výskyt mikroorganismů ve vzduchu.....	11
3.1.2 Bakterie.....	12
3.1.2.1 Rod Bacillus.....	14
3.1.2.2 Rod Clostridium.....	15
3.1.2.3 Rod Legionella.....	16
3.1.3 Plísně.....	17
3.1.3.1 Charakteristika.....	17
3.1.3.2 Rozvoj v prostředí.....	18
3.1.3.3 Rod Penicillium.....	19
3.1.3.4 Rod Cladosporium.....	20
3.1.3.5 Rod Aspergillus.....	21
3.2 Vnitřní prostředí.....	22
3.2.1 Monitoring ovzduší.....	23
3.2.1.1 Aktivní nasávání.....	24
3.2.1.2 Volná sedimentace.....	24
4 Materiál a metody.....	25
4.1 Sledované parametry.....	25
4.2 Popis odběrových míst.....	25
4.3 Použité metody.....	27
4.3.1 Příprava médií.....	27
4.3.2 Použité přístroje.....	27
4.4 Pracovní postup.....	28
4.4.1 Kultivace.....	29
5 Výsledky.....	30
6 Diskuze.....	34
7 Závěr.....	39
8 Seznam literatury.....	40

1 Úvod

Atmosféra vnějšího prostředí neposkytuje vhodné podmínky pro rozmnožování mikroorganismů. UV záření, nedostatek živin, cirkulace vzduchu, výkyvy teplot a vlhkosti jsou faktory, které mají za následek krátké přežívání mikrobů ve vzduchu.

Tyto faktory působí v interiérech velmi omezeně, proto se zde mohou bakterie a plísňe vyskytovat ve větším množství a přinášet tak s sebou zdravotní rizika. Zesílený výskyt mikrobů je nežádoucí především v místech se zvýšenými požadavky na hygienu. V těchto prostorách se proto provádí monitoring mikrobiální kvality ovzduší. K tomuto účelu se využívají většinou aktivní metody pracující na principu nasávání vzduchu na živné médium pomocí aeroskopu.

Mikrobiální kontrolu kvality vzduchu v potravinářských provozech je nezbytné provádět především kvůli stanovení mikroorganismů, které mohou svou přítomností ovlivnit jakost potravin.

2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo zjistit konkrétní mikroorganismy, které se vyskytují ve vzduchu potravinářských provozů a zaměřit se na ty z nich, které svou přítomností mohou ovlivnit kvalitu potravin. V potravinářských provozech je kladen důraz na mikrobiální čistotu především v místech, kde by mohlo dojít ke kontaminaci potravin. V těchto částech by tedy měl být výskyt mikroorganismů nejnižší.

Dalším cílem bylo potvrdit, že kvalita vzduchu v potravinářském provozu je lepší, než v běžném prostředí.

3 Literární rešerše

3.1 Složení ovzduší

Vzdušný obal Země tvoří ovzduší neboli atmosféra. Jedná se o směs plynů, par a tuhých částic. Hlavními složkami jsou plynné látky, které si zachovávají stálý objemový podíl. Mezi ně se řadí dusík, kyslík, oxid uhličitý a vzácné plyny. Množství vodních par a tuhých částic značně kolísá. Tuhé částice se skládají zejména z prachu a aeroplanktonu. Aeroplankton jsou živé organismy vznášející se v ovzduší, například mikroorganismy a pyl rostlin.

Kolem 90 % veškeré vzdušné hmoty je soustředěno v troposféře, což je vrstva atmosféry sahající do výšky 10 až 12 km nad zemský povrch (Kalhotka, 2011; Švec et Plesník, 1986).

3.1.1 Výskyt mikroorganismů ve vzduchu

Mikroorganismy obsažené ve vzduchu jsou vázány na aerosol, což je směs pevných a kapalných částic o velikosti 0,001 až 10 μm , volně rozptýlených v plynné složce atmosféry. Vzdušný aerosol pochází převážně z průmyslových a vulkanických procesů a z půdy (Hýsek, 1994). Mikroorganismy v ovzduší se označují také jako bioaerosol (Jokl, 2002).

Koncentrace bioaerosolu v prostředí závisí na přírodních podmínkách jako je nadmořská výška, poloha, podnebí a roční období, ale také na zdrojích kontaminace a na proudění vzduchu. Atmosféra obecně neposkytuje vhodné podmínky pro růst a rozmnožování mikroorganismů. Obsahuje málo využitelných živin, nepříznivě působí také UV záření a změny teplot a vlhkosti. Mikroorganismy se ve vzduchu i přes nehostinné podmínky vyskytují, ulpívají na prachových částicích, kapénkách vody či v kapičkách exkretů sliznic a slin. Čím více je ve vzduchu prachu, tím více je zde mikroorganismů, přičemž prach z půdy je na mikroby nejbohatší. Více bioaerosolů se nachází v oblastech s vlhkým a teplým podnebím. Naopak nejméně jich je ve vysokých polohách, nad ledovci a vodními plochami, což je zapříčiněno vyšším působením UV záření (Kalhotka, 2011).

Mikroorganismy se v ovzduší většinou nerozmnožují, ale čekají na vhodné podmínky, které nastanou například v případě, když společně s prachem dosednou na pevný povrch. Aby

přečkaly nevyhovující podmínky atmosféry, mají vyvinuty speciální mechanismy, díky kterým zůstávají biologicky aktivní i po neomezeně dlouhou dobu. Příkladem je tvorba spor u bakterií rodu *Bacillus* a *Clostridium* (Maier et al., 2000).

Bioaerosol se vždy skládá ze vzdušných bakterií, z mikromycet neboli plísní a z kvasinek. Jejich koncentrace a druhové zastoupení jsou však velmi nestálé a závislé na daném prostředí (Hýsek, 1994).

- Z bakterií jsou nejhojnější rody *Bacillus* a *Micrococcus*. Sporotvorné rody bakterie *Bacillus* jsou schopny pomocí spor odolávat nepříznivým podmínkám. V menší míře se vyskytují rody *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* a další. Většina těchto bakterií tvoří karotenoidní barviva, která je chrání proti působením UV záření (Kalhotka, 2011).
- Nejběžnějšími rody mikromycet jsou rody *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Mucor* a *Rhizopus*. Tyto vláknité houby se rovněž účinně chrání proti UV záření a to tvorbou barevných konidií (Kalhotka, 2011). Mezi nejčastější plísně vnitřního prostředí řadí Janíčková (2009) rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* a *Cladosporium*. Lignell et al. (2008) uvádějí, že rody *Aspergillus* a *Penicillium* jsou více typické pro vnitřní než pro vnější prostředí, a naopak rody *Cladosporium* a *Alternaria* jsou více spojovány s venkovními zdroji.
- Kvasinky se ve vzduchu vyskytují hlavně v letních měsících, kdy dozrává ovoce, především rody *Saccharomyces*, *Candida* a *Rhodotorula* (Kalhotka, 2011). Někdy se může objevit i rod *Torulopsis*, přičemž některé druhy jsou vysloveně patogenní (Hýsek, 1994).
- Ve vzduchu lze nalézt i některé prvoky, např. cesty améb včetně patogenního rodu *Naegleria* (Hýsek, 1994).

3.1.2 Bakterie

Bakterie jsou všudypřítomné, rychle se množící mikroorganismy, které jsou z lékařského hlediska jednou z hlavních příčin onemocnění lidí i zvířat (Singh et Kapoor, 2010).

Patří mezi prokaryota, tudíž je jaderný materiál sloužící k rozmnožování představován deoxyribonukleovou kyselinou. Ta je tvořena jedním kruhovým chromozomem volně uloženým v cytoplazmě.

Tvar bakteriálních buněk je tyčinkovitý nebo kulovitý (koky) a u půdních bakterií řádu *Actinomycetales* vláknitý (Šilhánková, 2008). Některé tyčinky a koky zůstávají po dělení spojeny a mohou tak tvořit řetízky, shluky neboli stafylokoky a sarcíny (Singh et Kapoor, 2010).

Některé rody bakterií, především rody *Bacillus* a *Clostridium* jsou schopny sporulace. Endospora je kulovitý nebo válcovitý útvar, který se vytvoří uvnitř buňky za nepříznivých podmínek. V buňce se výrazně sníží obsah vody a živin a v této klidové fázi přečkává bakterie i neomezeně dlouhou dobu.

Tyčinkovité bakterie a koky se rozmnožují dělením, popřípadě pučením, kdy na mateřské buňce vyroste buňka dceřiná (pupen). Vláknité bakterie řádu *Actinomycetales* se množí rozrůstáním vláken a tvorbou spor (Šilhánková, 2008).

Rozměry bakteriálních buněk se většinou pohybují v rozmezí 0,5 až 1 μm , tyčinkovité buňky bývají dlouhé kolem 3 μm (Görner et Valík, 2004).

Na povrchu buněk bakterií se nachází buněčná stěna, podle jejíhož složení se rozlišují grampozitivní a gramnegativní bakterie. Hlavní složkou grampozitivních bakterií je silná vrstva peptidoglykanu, která způsobuje vysokou pevnost buněčné stěny. Gramnegativní bakterie mají na buněčné stěně navíc vnější membránu složenou z fosfolipidů, proteinů, lipoproteinů a lipopolysacharidů a vrstva peptidoglykanu je velmi tenká.

Některé bakterie tvoří slizovitý obal, který chrání buňku proti nepříznivým vlivům prostředí. Pokud se bakterie produkující sliz dostanou do potravin, způsobí jejich znehodnocení. Známa je nitkovitost pečiva, kterou tvoří táhlovitý sliz rodu *Bacillus*. Obávaný kontaminant cukru *Leuconostoc mesenteroides* zase může způsobit zrosolovatění slazených vod v lahvích, ucpávání potrubí v cukrovarech nebo aglutinaci droždí.

Optimální teplota, tedy teplota při níž se mikroby rozmnožují nejrychleji, je pro většinu bakterií kolem 37 °C (Šilhánková, 2008).

Bakterie se množí rychle a dovedou využívat obrovské množství uhlovodíkových substrátů, včetně fenolu, gummy a ropy. Většina z nich je schopna samostatné existence a růstu, jen *Chlamydie* a *Rickettsia* jsou obligátně intracelulární organismy (Singh et Kapoor, 2010).

3.1.2.1 Rod *Bacillus*

Bakterie patřící do rodu *Bacillus* jsou grampozitivní tyčinky, které jsou schopné růst za aerobních podmínek. Mohou tvořit endospory, přičemž v místě spory nebývá buňka ztluštělá. Jsou takřka všudypřítomné, hojně se vyskytují v půdě a ve vodě, odkud se mohou dostávat do ovzduší (Klaban, 2001).

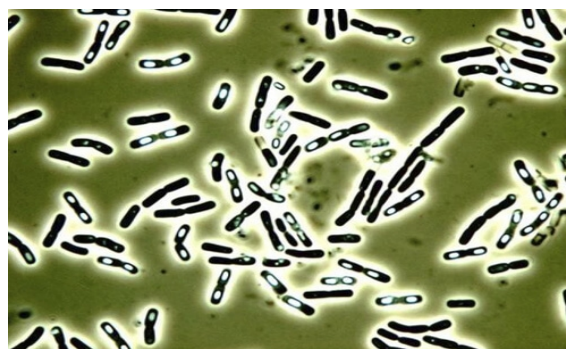
Ve větším množství se nachází i na potravinách a to především na kořenové zelenině a v tepelně upravených a následně nedostatečně zchlazených jídlech a také v mléce, které je skladované dlouhou dobu. Svým rozsáhlým enzymovým aparátem způsobují kažení potravin a to především štěpením bílkovin a škrobu. V konzervárenství jsou nebezpečné termofilní rody, jejichž spory přežívají sterilaci konzerv a při jejich následném skladování způsobují kvašení nekyselých konzerv a tvorbu plynu (Vlková et al., 2009).

Bacillus anthracis je pro člověka patogenní, jelikož je původcem infekčního onemocnění – antraxu čili sněti slezinné, která často končí smrtí.

Bacillus cereus může vyvolat otravu po požití kontaminované potraviny, pokud počet jedinců tohoto rodu ve výrobku dosáhne sta tisíce až jednoho miliónu.

Bakterie *Bacillus subtilis*, která se také nazývá „senný bacil“ má velmi rezistentní spory a proto je obávaným kontaminantem v potravinářských provozovnách.

Velká většina druhů *Bacillus* jsou však neškodní saprofyty. Jejich funkce v přírodě spočívá v rozkladu odumřelých těl rostlin a živočichů. Některé druhy jsou díky schopnosti produkovat celou řadu enzymů a antibiotik používány v lékařství, farmacii a v zemědělských či průmyslových odvětvích, příkladem je *Bacillus subtilis* sloužící k produkci antibiotika bacitracin (Klaban, 2001; Rohilla, 2010).



Obr. č. 1 *Bacillus cereus*

<http://news.doccheck.com/de/83468/bacillus-cereus-giftschrank-mit-19-varianten/>

3.1.2.2 Rod *Clostridium*

Bakterie rodu *Clostridium* se řadí mezi grampozitivní, tyčinkovité a obligátně anaerobní bakterie. Jsou typické tvorbou oválných endospor, které bývají tlustší než samotná buňka. Vyskytují se především ve střevech lidí a zvířat, ale i v půdě, odpadních vodách a v menší míře také ve vzduchu.

U člověka vyvolávají různé infekce jako je botulismus, tetanus, plynná sněť a myonekróza. Klostridia, především *Clostridium butyricum* a *Cl. thermosaccharolyticum* způsobují kažení konzerv. *Cl. butyricum* škodí také v sýrařství, způsobuje duření tvrdých sýrů (Klaban, 2001).

Vybrané toxické druhy

- *Clostridium perfringens* – se nachází hojně v půdě a prachu. Může se objevovat i v potravinách, především v masě a masných výrobcích. Toxicita u člověka nastává po požití kontaminované potraviny tím, že vegetativní buňky začnou uvolňovat spory ve střevech postiženého, který poté trpí průjmy a silnými bolestmi břicha (Montville et Matthews, 2008). Dostane-li se do hluboké otevřené rány, způsobuje nebezpečnou plynnou sněť končící i smrtí (Šilhánková, 2008).
- *Clostridium botulinum* – produkuje nebezpečný botulotoxin, který je spojován s příjmem kontaminované potravy. Smrtelná dávka je tak malá, že může dojít k otravě i inhalací a to pouze 0,3 ug tohoto neurotoxinu. Smrt nastává 12 hodin po vdechnutí. Neurotoxin způsobí v lidském těle inhibici produkce acetylcholinu v nervových zakončeních a k úmrtí dojde následkem udušení způsobenému ochrnutím dýchacích svalů (Maier et al., 2000).



Obr. č. 2 *Clostridium botulinum*

http://textbookofbacteriology.net/clostridia_4.html

3.1.2.3 Rod *Legionella*

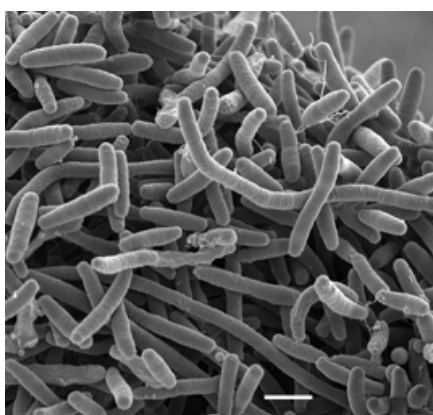
Rod *Legionella* je známý teprve od konce 70. let 20. století a zahrnuje gramnegativní tyčinky, které mohou tvořit i vlákna. Kolonie jsou drobné, lesklé a mají šedou barvu (Klaban, 2001).

Patogenní bakterie *Legionella pneumophila*, původce legionářské nemoci a pontiacké horečky, je přizpůsobena výhradně pro přežití a přenos v interním prostředí. Legionářská nemoc je onemocnění plic, které propuká až u 5 % lidí, kteří jsou této bakterii vystaveni. Z těch, kteří se nakazí, až 39 % zemře na infekci. Pontiacká horečka má příznaky podobné chřipce a postihuje až 100 % lidí, kteří jsou patogenu vystaveni, není však spojena s úmrtností.

Legionella pneumophila byla pojmenována v souvislosti s prvním propuknutím legionářské nemoci, k němuž došlo v roce 1976 ve Filadelfii při setkání legionářů. Rezervoárem patogenu byla špatně udržovaná klimatizace, jež poskytovala optimální podmínky pro rozmnožení mikroorganismu, který se následně šířil v celé budově.

Přirozeně se *Legionella* spp. vyskytuje ve stojatých vodách s teplotami v rozmezí 35 až 46 °C. Tato bakterie se dokonce může množit intracelulárně v dalších mikrobech, včetně měňavek, sinic a prvoků.

Předcházet rozvoji tohoto patogenu v klimatizacích lze například instalací ozonizační jednotky nebo biocidními prostředky jako je chlor a měď. Navíc je nutné se vyhnout každému designu, který by mohl smíchat mokřý systém s přiváděným vzduchem (Maier et al., 2000).



Obr. č. 3 *Legionella pneumophila*

http://www.rki.de/SharedDocs/Bilder/InfAZ/Legionellen/EM_Tab_Legionella_pneumophila.html

3.1.3 Plísně

Vláknité houby jsou nenáročné organismy, které ke svému růstu vyžadují především vlhkost. Základní rezervoár plísní je půda, ze které se rozšiřují do okolního prostředí.

3.1.3.1 Charakteristika

Plísně jsou mikroorganismy patřící společně s kvasinkami do říše houby (Fungi). Tělo plísní je představováno stélkou, která je tvořena jednobuněčnými i vícebuněčnými dutými vlákny – hyfy, jejichž větvením vzniká mycelium.

Buňka plísní je eukaryotická, genetická informace ve formě haploidních chromozomů se tedy nachází v jádře, které je od cytoplazmy odděleno dvojitou jadernou membránou. V každé buňce je jedno nebo více jader (Šilhánková, 2008).

Optimální teplota pro množení plísní, ale i kvasinek, se pohybuje kolem 30 °C. Rozmnožování těchto vláknitých mikroorganismů probíhá rozrůstáním hyf nebo sporami. Z klíčící spory vyroste hyfa a rozrůstáním vláken vzniká mycelium. Na povrchu substrátu roste vzdušné mycelium a substrátem prorůstá substrátové mycelium. Na hyfách vzdušného mycelia se vytvářejí spory. Vegetativní spory vznikají nepohlavně a pohlavní spory jsou vytvořené spájením. Vegetativní spory se dělí ještě na exospory a endospory, přičemž exospory (konidie) se tvoří vně a endospory naopak uvnitř orgánů. Hyfa, na které se tvoří konidie a je zřetelně odlišena od ostatních hyf je tzv. konidiofor.

Mycelia rostoucí na agarových půdách se v mikrobiologii označují jako kolonie. Stěny konidií obsahují barviva, díky kterým mají kolonie obsahující spory nápadnou barvu. Zbarvení, tvar plísní a tvar rozmnožovacích orgánů, jejich uspořádání a velikost spor jsou důležité pro určování plísní (Klánová, 2013; Šilhánková, 2008).

Existuje zvláštní skupina mikromycet s názvem *Mycelia sterilia*. Tyto plísně neprodukují vegetativní ani pohlavní spory a většinou parazitují na rostlinách a mohou se vyskytovat i ve vzduchu.

Plísně se v prostředí, které jim poskytuje optimální podmínky, rozmnožují velice rychle. Z jedné spory plísně rodu *Penicillium* vznikne za 5 dnů asi jedna miliarda spor. Spory nejčastěji se vyskytujících plísní bývají velké do 10 µm (Hens, 1999).

Z hlediska významu v přírodě lze plísně označit jako heterotrofní saprofytické či parazitické mikroorganismy. Rozkládají organickou hmotu a významně tím přispívají

ke koloběhu látek a energie, jsou proto v životním prostředí nepostradatelné. Pro tyto mikroskopické organismy je charakteristická produkce velkého množství látek označovaných jako sekundární metabolity. Patří k nim zejména antibiotika, mykotoxiny, těžké organické látky a enzymy. Některé, jako například antibiotika nebo kyselina citrónová, jsou využívány člověkem. Určité rody plísní našly své uplatnění v potravinářském průmyslu, především při výrobě sýrů. Na druhou stranu mohou být plísně i nežádoucí, pokud svým růstem znehodnocují potraviny, krmiva, dřevo a další průmyslové výrobky. Produkci mykotoxinů přímo ohrožují zdraví lidí a zvířat (Klánová, 2013; Sprenger, 2003).

Mykotoxiny jsou produkovány výhradně plísněmi, a to v souvislosti s bojem o potravu a přežití. Tyto organické sloučeniny, které mohou kontaminovat potraviny a krmiva nebo suroviny pro jejich výrobu, jsou pro člověka a zvířata toxické. Potrava je zároveň hlavním zdrojem expozice člověka mykotoxinům. Mnohé z nich jsou karcinogenní nebo pravděpodobně karcinogenní pro člověka a mají mutagenní, hepatotoxické, teratogenní či imunotoxické účinky (Adams et Moss, 2000; Malíř et al., 2003).

3.1.3.2 Rozvoj v prostředí

Rozvoj plísní v prostředí ovlivňuje především několik faktorů, mezi hlavní patří přítomnost vzduchu, výskyt organických látek a vlhkost okolního vzduchu či substrátu. Dalšími faktory jsou teplota a pH prostředí.

- Přítomnost vzduchu – jelikož jsou plísně aerobní organismy, rostou na povrchu napadených materiálů.
- Výskyt organických látek – plísně jsou dobře přizpůsobivé nepříznivým podmínkám prostředí. Jejich vlákna, kterými prorůstají substráty, jsou jemná a mají aktivní povrch. To jim umožňuje získat živiny i z velmi chudých materiálů. Za nepříznivých podmínek přežívají ve formě spor a čekají na vhodné podmínky k opětovnému množení (Jokl, 2002; Klánová, 2013).
- Vlhkost – je nejčastější příčinou rychlého množení mikrobů v interním (vnitřním) prostředí. Plísním se na vlhkých materiálech, především stěnách, daří. Rozmnožují se zde a vytvářejí útvary zvané „mapy“ (Klánová et Kostíčková, 1999). Množství vody v určitém substrátu, které je využitelné mikroorganismy, se vyjadřuje jako vodní aktivita (a_w). Tato veličina udává poměr tlaku vodní páry v hygroskopickém materiálu k tlaku vodní páry nad čistou vodou za stejných podmínek, přičemž pro čistou vodu

platí hodnota $a_w = 1$. Plísně rostou na materiálech s vodní aktivitou v rozmezí 0,60 až 0,99. (Paříková et Kučerová, 2001).

- Teplota prostředí – optimální je 18 až 28 °C, mohou se však rozmnožovat při teplotách výrazně nižších i vyšších.
- Hodnota pH – optimální pro růst plísní je mírně kyselé až neutrální pH. V zásaditém prostředí se jim nedaří, proto se ve stavebnictví využívá zdiva, nátěrových hmot a fasádních barev s neutrálním pH (Klánová, 2013).

Jednotlivé druhy plísní mají různou schopnost uvolňovat se z povrchů a přecházet do bioaerosolu. V prostorech s materiály kontaminovanými plísněmi je vždy vyšší koncentrace mikromycet i ve vzduchu. V ovzduší nekontaminovaných interiérů jsou koncentrace spor plísní ve vzduchu nižší v zimě než v létě. To může souviset s jejich výskytem v přírodě (Klánová, 2013). Janíčková (2009) uvádí, že spory venkovních plísní se vyskytují v ovzduší od jara do podzimu, především v červenci a v srpnu. Počet spor v ovzduší se také úměrně zvyšuje s rychlostí proudícího vzduchu. Čím více je vířen prach, tím více se mikroby dostávají do vzduchu. (Klánová, 2013).

Plísně v budovách, především jejich viditelný nárůst na zdech, je z hygienického hlediska nepřijatelný. K zabránění růstu plísní na zdech mohou přispět fungicidy, jsou to však pouze přechodná opatření, nesníží-li se vlhkost stěn. Pro předcházení rozvoje mikromycet na stěnách je nutné vyloučení stavebních prvků, které by jejich růst podporovaly. Všechny materiály použité pro stavby by měly být odolné vůči vlhkosti a propustné pro vodní páry (Klánová et Kostičková, 1999).

3.1.3.3 Rod *Penicillium*

Rod *Penicillium* obsahuje velké množství druhů rozšířených po celém světě. V přírodě se vyskytuje v půdě a organické hmotě a zároveň jde o jednu z nejhojnějších vzdušných plísní (Fassatiová, 1979). Na potravinách či jiném materiálu vytváří zelené, sametové až moučné povlaky, přičemž okraje kolonií, které neobsahují spory jsou bílé (Šilhánková, 2008). Charakteristická je pro tento rod štětičkovitá stavba konidioforu.

Penicillium je průmyslově využíván k produkci antibiotik (penicilin) a dalších organických látek důležitých při zrání sýrů a salámů. Při výrobě sýrů se uplatňují ušlechtilé druhy *P. roqueforti* a *P. camemberti*.

Negativní dopad této plísně spočívá v produkci mykotoxinů a účasti na kažení plodin a hnilobných procesech. Kromě toho vyvolává alergické reakce u lidí (Fassatiová, 1979; Vlková et al., 2009).

Velmi rozšířený je v přírodě *Penicillium expansum*, přítomný zejména v půdě a v organických zbytcích. Způsobuje hnilobu jablek i jiného ovoce. Produkuje mykotoxin patulin a citrinin. Výskyt patulinu v potravinách je spíše indikátorem používání plísněmi napadených vstupních surovin, než vážné hrozby pro zdraví lidí (Fassatiová, 1979; Malíř et al., 2003).



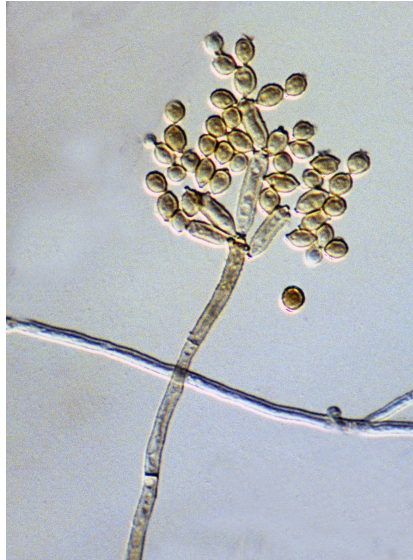
Obr. č. 4 *Penicillium expansum*

http://www.marn.at/pilze-index/penicillium_expansum2.html

3.1.3.4 Rod *Cladosporium*

Cladosporium je rod plísně tvořící řetězky vícebuněčných šedých, šedohnědých nebo zelenohnědých spor, které vznikají pučením. V přírodě se vyskytuje na organických zbytcích, hojně je přítomen na spadáném listí a lze ho nalézt ve větším množství i na potravinách (Fassatiová, 1979; Šilhánková, 2008). Stejně jako *Penicillium* je i *Cladosporium* jednou z nejhojnějších vzdušných plísní.

Tento rod je nebezpečný pro potravinářský průmysl, neboť se nachází na stěnách potravinářských provozů, vinných a pivních sklepů. Způsobuje také „černé skvrnky“ na hovězím masu (Vlková et al., 2009). Část zástupců rodu *Cladosporium* napadá potraviny rostlinného i živočišného původu a část se adaptovala k parazitismu rostlin. Mezi kontaminanty potravin jako je pšenice, ječmen, mouka, rýže, ovoce, zelenina nebo čerstvé a mražené maso patří například *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum* nebo *Cladosporium sphaerospermum* (Malíř et al., 2003).



Obr. č. 5 *Cladosporium cladosporioides*

<https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/6048>

3.1.3.5 Rod *Aspergillus*

Pro tento rod je charakteristické hlavicovité zakončení konidioforu. Kolonie jsou sametové, zrnité nebo vločkovité. *Aspergillus* se nachází v půdě a na rostlinných i živočišných zbytcích (Fassatiová, 1979). V ovzduší se vyskytuje zejména na podzim, ve vnitřním prostředí se může vyskytovat ve vzduchu či na zdech.

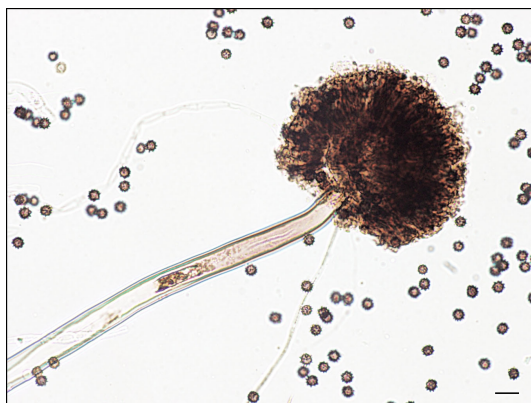
Plísňe rodu *Aspergillus* jsou často spojovány s poškozením lidského zdraví. Produkuje alergeny, mykotoxiny, proteázy a těkavé organické látky (Klánová, 2013). Tvorbou velkého množství enzymů způsobují kažení potravin a krmiv. Lipolytickou aktivitou znehodnocují olejniny, tuky, oleje a potraviny bohaté na tuky. Snášejí velmi nízkou vodní aktivitu, a proto napadají i potraviny s nízkým obsahem vody nebo potraviny s vysokým podílem soli a cukrů, jako je sušené ovoce či zelenina, sušené maso, džemy, obiloviny a pečivo. Jsou přítomné i na čerstvém ovoci a zelenině. (Vlková et al., 2009).

Vybrané toxické druhy

- *Aspergillus flavus* – jde o alergenní plíseň, která tvoří toxiny, z nichž nejvýznamnější je aflatoxin B, který je kancerogenní a hepatotoxický. *Aspergillus flavus* napadá plody a potraviny, ve kterých tvoří mykotoxiny a po požití těchto potravin způsobuje onemocnění. Je také příčinou nejrůznějších infekcí u lidí, jako jsou infekce popálenin

a operačních ran, vyvolává ušní a kožní záněty, chronické záněty dutin a systémové mykózy (Klánová, 2013).

- *Aspergillus niger* – celosvětově se vyskytuje velmi hojně. Produkuje méně toxinů, než ostatní zástupci rodu a bývá považován za méně nebezpečný, je však často izolován z klinických nálezů. Produkuje neurotoxický a kancerogenní ochratoxin A. *Aspergillus niger* vyvolává u člověka astma, plicní a kožní infekce a ušní záněty. (Klánová, 2013). Používá se k průmyslové výrobě kyseliny citrónové (Vlková et al., 2009).
- *Aspergillus versicolor* – vyskytuje se po celém světě, je častý ve venkovním i vnitřním prostředí. V interiérech se nachází na zaplísňených zdech a v domácím prachu. Jedná se o typickou alergenní plíseň (Klánová, 2013).



Obr. č. 6 *Aspergillus niger*

<https://www.inspq.qc.ca/en/moulds/fact-sheets/aspergillus-niger>

3.2 Vnitřní prostředí

Vnitřním prostředím se rozumí byty, domy, kanceláře, haly, sály, potravinářské výrobny apod. V těchto prostorách dochází vlivem oddělení vzduchu k ustavení typické mikrobiologické kvality. Mikroby ve vnitřním prostředí většinou pocházejí z prostředí venkovního. Vzduch sem přichází větráním, netěsnostmi oken a dveří, ale i z těl lidí a zvířat a z jejich dýchací trubice dýcháním (Hýsek, 1994; Klánová, 2013).

Interní prostředí poskytuje vhodné podmínky pro nahromadění a přežití mikroorganismů. Ve srovnání s venkovním prostředím je zde omezená cirkulace venkovního

vzduchu, mnohem menší vystavení UV záření a teplota a relativní vlhkost se pohybují v určitém rozmezí, což umožňuje dlouhé přežívání mikrobů (Maier et al., 2000).

Nejčastějším vnitřním zdrojem mikroorganismů ve vzduchu je prach, ten se společně s mikroorganismy víří a zároveň usazuje, nejvíce se drží v kobercích, čalounění, závěsech a tapetách (Klánová et Kostičková, 1999).

Maier et al. (2000) uvádějí, že mezi faktory, které výrazně ovlivňují přítomnost mikroorganismů v budovách, patří filtrační zařízení vzduchu, větrání, vytápění, klimatizace, typ používaného osvětlení, teplota prostředí, relativní vlhkost prostředí a zdraví a hygiena obyvatel.

Zejména u pracovišť závisí mikroflóra ovzduší na počtu osob, protože pohybující se osoby výrazně zvyšují koncentraci mikroorganismů ve vzduchu, především vířením prachu. V těchto prostorách záleží i na používaných strojích, zpracovávaném materiálu a na úrovni hygieny a sanitace provozu (Klánová et Kostičková, 1999; Kalhotka, 2011).

3.2.1 Monitoring ovzduší

Mikroorganismy v prostředí jsou sledovány především v prostorách s vysokými požadavky na hygienu, jako jsou nemocnice nebo potravinářské provozovny. V potravinářském průmyslu je kontrola mikrobiální kvality ovzduší důležitá zejména pro stanovení spor mikroorganismů, které představují zdravotní a technologické riziko. Mikroby ve vzduchu potravinářských provozů jsou potenciálním rizikem pro kontaminaci surovin, polotovarů nebo finálních produktů (Kunová et al., 2010). Zejména plísně, jejichž spory se ve vzduchu vyskytují běžně, mohou svou enzymatickou činností ovlivňovat jakost surovin podléhajících rychlé zkáze. Aby se zabránilo kontaminaci potravin, nesmí vzduch z venkovního prostředí přicházet přímo do prostorů, kde se vyskytují suroviny a potraviny. Důležité je také dostatečné oddělení prostorů, kde se vyskytuje syrový produkt, od prostor s hotovým produktem (Yousef et Carlstrom, 2003).

V provozech produkujících potraviny musí kvalita vzduchu splňovat určité hygienické normy, jsou zde stanoveny postupy pro pravidelné sledování mikrobiologického složení vzduchu (Bell et al., 2005).

Pro mikrobiální kontrolu ovzduší je nutné odebrat vzorek vzduchu. Výběr vhodného vzorkovacího zařízení je založen na mnoha faktorech jako je cena, objem nasávaného vzduchu, mobilita, efektivita vzorkování pro jednotlivé skupiny mikroorganismů a biologická

účinnost neboli udržení životaschopnosti mikrobů v průběhu vzorkování. Podle způsobu odběru vzorku vzduchu existují různé typy zařízení využívající rozdílné postupy. Metody vzorkování lze rozdělit do dvou skupin – aktivní nasávání a volná sedimentace (Maier et al., 2000).

3.2.1.1 Aktivní nasávání

Zařízení určená k aktivnímu odběru vzduchu se nazývají aeroskopy. Vzduch je nasáván do odběrové hlavice přístroje a usměřován na agarové živné půdy. Nasávány jsou částice o velikosti 0,5 až 10 μm , což odpovídá velikosti bakterií a spor vláknitých hub. Tento rozsah umožňuje i záchyt úlomků mycelia plísní. Po vzorkování následuje kultivace v termostatech za určitých podmínek dle sledované skupiny mikroorganismů. Výsledek lze poté vyjádřit jako počet mikroorganismů v jednom metru krychlovém vzduchu. Aktivní nasávání vzduchu zahrnuje metody impigement, impakční a filtrační metody (Klánová et Kostičková, 1999).

- Impigement metody využívají vychytávání vzdušných částic do kapalného média (Maier et al., 2000).
- Principem impakčních metod je průchod vzduchu sací hlavou s otvory a následné zachycování mikroorganismů na agarové půdy v Petriho miskách (na pevný povrch). Tato metoda je v České republice nejpoužívanější (Klánová 2002).
- Při metodách filtračních jsou mikroby zachycovány na filtrech, které se poté vkládají na Petriho misky s agary. Vzduch za současného podtlaku přístroje prochází přes filtr, kde jsou mikroorganismy zachyceny. Filtry mohou mít různou velikost pórů, které omezují průtok vzduchu (Klánová 2002; Maier et al., 2000).

3.2.1.2 Volná sedimentace

Volná sedimentace je postup využívající usazování částic vzdušného aerosolu na otevřené Petriho misky s živnými půdami. Po určité době expozice jsou misky inkubovány za vhodných podmínek pro cílové organismy a následně se počítají narostlé kolonie mikrobů. Touto metodou lze stanovit počet mikroorganismů usazených na misce za určitou časovou jednotku (Bell et al., 2005; Klánová et Kostičková, 1999).

Jde o méně přesný, ale levnější způsob než jsou metody aktivního nasávání vzduchu.

4 Materiál a metody

4.1 Sledované parametry

Mikrobiologická kvalita vzduchu byla monitorována ve Výukovém a výzkumném minipivovaru České zemědělské univerzity v Praze. Odběr vzorků pro monitoring vnitřního ovzduší byl proveden ve dvou termínech, vždy ze čtyř částí provozu. Pátým odběrovým místem byla chodba, která sloužila jako kontrolní stanoviště.

Ve zkoumaných vzorcích vzduchu byl zjišťován celkový počet mikroorganismů (CPM) a počet mikromycet, které byly následně určeny na úroveň rodu.

4.2 Popis odběrových míst

V suchdolském pivovaru se vaří pivo s názvem Suchdolský Jeník v množství 1000 hektolitrů piva ročně, přičemž z jedné várky lze získat 10 hektolitrů. Vznikají tu nefiltrovaná a nepasterizovaná piva s obsahem extraktu 12 % v původní mladině (Hruška, 2006).

Pivo se vyrábí z obilného sladu, vody a chmele, působením pivovarských kvasinek. Technologický postup výroby piva je rozdělen na šrotování, rmutování, scezování sladiny, výrobu mladiny, separaci horkých kalů, chlazení mladiny a provzdušňování mladiny, zkvašování mladiny, hlavní kvašení a ležení piva, filtraci a pasteraci.

V průběhu šrotování dochází ve šrotovnicích k rozemletí ječného sladu a vzniká tak sladový šrot. Následuje rmutování ve rmutovací pánvi, což je zahřívání sladového šrotu smíchaného s vodou. Postupným zvyšováním teploty vzniká škrobový maz, který ztekucuje a následně zcukřuje.

Po rmutování dílo putuje do scezovací kádě, kde se rozdělí na kapalnou fázi – sladinu a pevnou fázi – mláto. Sladina putuje do varny a mláto slouží ke krmivářským účelům.

Varna sloužila jako jedno z pěti míst pro vzorkování vzduchu. V srdci pivovaru, jak se varna často nazývá, probíhá výroba mladiny. Proces spočívá ve smíchání sladiny s chmelem a jejich povaření. Účelem je převedení hořkých a dalších látek z chmele do roztoku, odstranění nežádoucích látek, sterilace mladiny, koagulace bílkovin a odpaření vody, které umožní dosažení požadované stupňovitosti mladiny.

Mladina obsahuje hrubé kaly, které je nutné odstranit, jelikož by činily problémy při kvašení. Následuje tedy separace hrubých kalů. Dříve se používaly chladicí stoky, na kterých kaly sedimentovaly a horká mladina postupně chladla. Tato zařízení byla však nevhodná z důvodu možnosti mikrobiální infekce mladiny, byla proto nahrazena vířivými káděmi, odstředivkami nebo dekantéry.

Jelikož je vyčeřená mladina horká, je nutné ji zchladit na zákvasnou teplotu (asi 6 °C) a provzdušnit, aby kvasnice měly během kvašení dostatek kyslíku. Pro chlazení mladiny se používají uzavřené chladiče, což je soustava nerezových desek, mezi kterými proudí chlazená mladina a chladicí médium. V úseku chlazení mladiny byly odebrány další vzorky vzduchu.

Ke zchlazené a provzdušněné mladině je nutné co nejdříve přidat kvasnice, jinak by mohlo dojít k pomnožení nežádoucích mikrobů.

Během hlavního kvašení mladiny dochází k přeměně cukru na alkohol a oxid uhličitý. To se děje v části pivovaru zvané spilka, uvnitř kvasných kádí. Po skončení tohoto procesu je mladé pivo přečerpáno do ležáckých tanků, kde při teplotě 0 až 3 °C zraje a získává typický říz. Ležácký sklep rovněž sloužil pro odebrání vzorků vzduchu. V ležáckém sklepe Výukového a výzkumného minipivovaru navíc dochází po filtraci a pasteraci ke stáčení piva do lahví a sudů.

Je nutné zmínit ještě jednu velmi důležitou součást pivovaru, ve které byly také odebrány vzorky vzduchu, a to je sanitační stanice. Ačkoli zde neprobíhá výroba piva, její role je nezastupitelná z hlediska zabránění kontaminace produktu. Sanitační stanice se skládá z nádrží, ve kterých jsou skladovány a ohřívány sanitační prostředky sloužící k proplachovému čištění nádob a všech potrubních systémů v pivovaru (Chládek, 2007).

Rozmnožování mikroorganismů ovlivňují faktory jako je teplota prostředí a u plísni je důležitá především vlhkost. Ve všech částech vnitřního prostoru pivovaru, kromě ležáckého sklepa, je pokojová teplota. V ležáckém sklepe teplota sahá k 7 °C. V pivovarech také bývá vyšší vlhkost než v běžných interiérech.

4.3 Použité metody

4.3.1 Příprava médií

Pro stanovení mikroorganismů byla použita kultivační média APHA (Standard plate count agar) pro celkový počet mikroorganismů a PDA (Potato dextrose agar) pro stanovení mikromycet.

Živné médium APHA (OXOID)

Složení

- kvasničný extrakt 2,5 g
- enzymatický hydrolyzát kaseinu 5 g
- glukóza 1 g
- agar 15 g

Navážené množství 23,5 g se rozpustí v 1 litru destilované vody. Po rozvaření se agar steriluje při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Živné médium PDA (OXOID)

Složení

- bramborový extrakt 4 g
- dextróza 20 g
- agar 15 g

Navážené množství 39 g se rozpustí v 1 litru destilované vody. Dále se postupuje stejně jako u předchozího. Po sterilaci je nutné agar před nalitím do misek dobře promíchat.

Vytemperovaný agar byl rozlit do Petriho misek a po zatuhnutí byly vysušené misky použity pro zachycení mikroorganismů aeroskopem.

4.3.2 Použité přístroje

Pro vzorkování vnitřního vzduchu byl použit aeroskop Mas 100 Eco (Merck, Německo), který funguje na principu impakčních metod. Vzduch prochází sací hlavou

s otvory a mikroorganismy jsou zachycovány na agarové půdy v Petriho miskách, tedy na pevný povrch.



Obr. č. 7 Aeroskop Mas 100 Eco

<http://www.mbv.ch/?file=29>

4.4 Pracovní postup

Vzorky vzduchu s přítomnými mikroorganismy byly odebrány ve třech opakováních na pěti místech minipivovaru pomocí aeroskopu Mas 100 Eco umístěného do výšky asi jednoho metru. První odběr se uskutečnil v polovině června a další následoval za dva měsíce, tedy v srpnu.

Do minipivovaru se přichází z venkovního prostředí chodbou, následuje varna, úsek chlazení mladiny, ležácký sklep a sanitační stanice. V době odběru vzorků probíhaly v chodbě stavební úpravy, proto se pro příchod využíval zadní vchod vedoucí přímo do sanitační stanice.

Prvním místem, kde byly odebrány vzorky vnitřního vzduchu byla tedy sanitační stanice. Dále se postupovalo dalšími místnostmi pivovaru a odebíraly se vzorky v ležáckém sklepě, úseku chlazení mladiny, ve varně a posledním odběrovým místem byla právě chodba.



Obr. č. 8 Varna Výukového a výzkumného minipivovaru
<http://www.pivovar.tf.czu.cz/?r=2885&i=3297>



Obr. č. 9 Kvasné a ležácké tanky Výukového a výzkumného minipivovaru
<http://www.pivovar.tf.czu.cz/?r=2885&i=3297>

4.4.1 Kultivace

Vzorky pro stanovení CPM byly kultivovány 48 hodin při teplotě 30 °C a vzorky pro stanovení mikromycet 5 dní při 20 °C.

Po kultivaci byly spočteny kolonie tvořící jednotky (KTJ) pro jednotlivá odběrová místa. Zjištěné celkové počty mikroorganismů a počty plísní byly přepočteny na 1 m³ vzduchu a plísně byly následně určeny na úroveň rodu.

5 Výsledky

V praktické části bakalářské práce byly porovnávány celkové počty mikroorganismů a počty plísní ve vzduchu v různých částech provozu se vzduchem chodby minipivovaru.

V tabulce č. 1 jsou uvedeny CPM stanovené za červen a srpen. Z výsledků je patrný nejvyšší záchyt bakterií v sanitační stanici, vyskytovalo se zde průměrně 2275 KTJ/m³. Vyšší CPM než v chodbě byl stanoven v červnu také v úseku chlazení mladiny – 1440 KTJ/m³. V ostatních částech minipivovaru nepřesahovaly počty 800 KTJ/m³ a byly tedy nižší než v chodbě, ve které bylo zachyceno průměrně 1335 KTJ/m³.

Tab. č. 1 Celkové počty mikroorganismů v ovzduší minipivovaru [KTJ/m³]

Místo odběru	Termín odběru	
	červen	srpen
sanitační stanice	2140	2410
ležácký sklep	800	650
úsek chlazení mladiny	1440	650
varna	670	780
chodba	1390	1280

Počty mikromycet za červen a srpen jsou uvedeny v tabulce č. 2. Zde jsou velké rozdíly mezi počtem plísní v červnu, kde bylo stanoveno průměrně 1364 KTJ/m³ a v srpnu s průměrem 506 KTJ/m³. Ani v jednom měsíci ovšem počet plísní v provozu nepřesáhl jejich počet v chodbě. Pouze v srpnu byla zachycena o něco větší koncentrace v sanitační stanici – 680 KTJ/m³ než v chodbě – 610 KTJ/m³.

Tab. č. 2 Počty plísní v ovzduší minipivovaru [KTJ/m³]

Místo odběru	Termín odběru	
	červen	srpen
sanitační stanice	1270	680
ležácký sklep	1050	490
úsek chlazení mladiny	1390	330
varna	1270	420
chodba	1840	610

Dále byly plísně pomocí klíče (Hampl et Šilhánková, 1957) určeny na úroveň rodu. Tabulky č. 3 a č. 4 udávají procentuální podíl jednotlivých plísní, které byly v minipivovaru zachyceny. V tabulce č. 3 jsou hodnoty za červen a v tabulce č. 4 za srpen.

Cladosporium zaujímalo průměrně 54,8 % všech plísní a je tedy hlavním, nejvíce se vyskytujícím rodem vláknitých hub ve vzduchu zdejšího minipivovaru. O něco méně se *Cladosporium* nacházelo pouze v ležáckém sklepe, kde byl vyšší záchyt rodu *Penicillium*, který je zároveň druhým nejhojnějším rodem v ostatních částech pivovaru. Dalšími rody, které jsou ovšem zastoupeny ve výrazně menším množství, jsou *Alternaria* (max. 5 %) a *Aspergillus* (max. 4 %).

Ve výsledcích bakalářské práce se navíc vyskytovala i *Mycelia sterilia*. Tato plíseň, která netvoří vegetativní ani pohlavní spory, představovala průměrně 5,9 % celkového počtu plísní. Zbývá přibližně 3 % připadala na ostatní mikromycety, které nebyly určeny.

Z výsledků vyplývá, že v minipivovaru nebyl rozdíl v rodovém zastoupení plísní za měsíc červen a za měsíc srpen. Rozdíl byl pouze v počtech plísní.

Tab. č. 3 Rodové zastoupení plísní v ovzduší minipivovaru – červen [%]

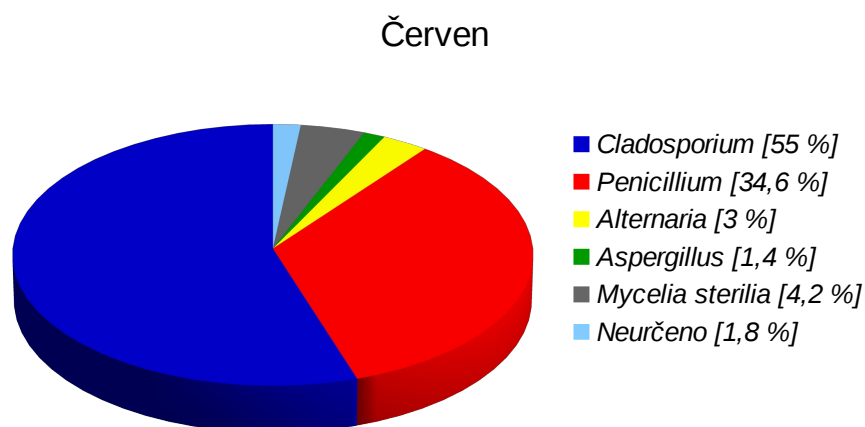
Místo odběru	<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Mycelia sterilia</i>	Neurčeno
sanitační stanice	63	22	4	1	9	1
ležácký sklep	44	49	0	1	3	3
úsek chlazení mladiny	59	33	3	2	1	2
varna	52	37	4	1	6	0
chodba	57	32	4	2	2	3

Tab. č. 4 Rodové zastoupení plísní v ovzduší minipivovaru – srpen [%]

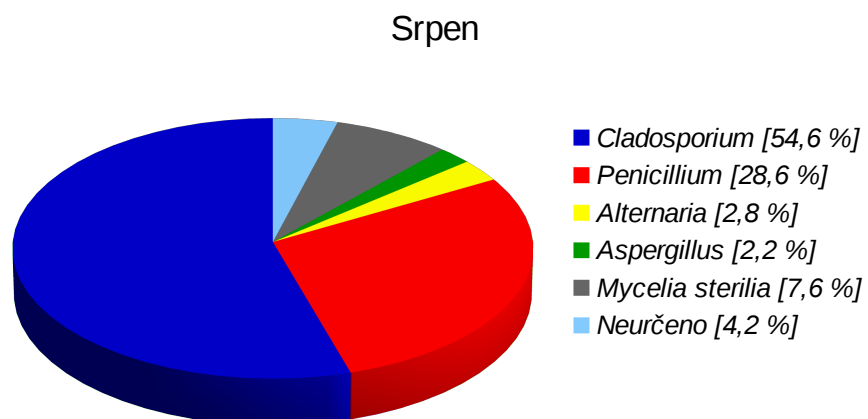
Místo odběru	<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Mycelia sterilia</i>	Neurčeno
sanitační stanice	62	21	5	0	9	3
ležácký sklep	37	35	1	3	15	9
úsek chlazení mladiny	58	25	3	2	6	6
varna	65	21	2	4	7	1
chodba	51	41	3	2	1	2

Graf č. 1 znázorňuje kvalitativní zastoupení plísní v celém pivovaru za měsíc červen a graf č. 2 za měsíc srpen.

Graf č. 1 Procentuální podíl plísní v ovzduší minipivovaru v červnu



Graf č. 2 Procentuální podíl plísní v ovzduší minipivovaru v srpnu



6 Diskuze

V ovzduší vnitřního prostředí dochází vlivem oddělení vzduchu k ustavení určité mikrobiologické kvality. Cílem této práce bylo potvrdit, že kvalita vzduchu potravinářského provozu je lepší než v běžném prostředí. Především v místech, kde může dojít ke kontaminaci produktu by měl být výskyt mikroorganismů nejnižší.

V této práci byly sledovány celkové počty mikroorganismů a počty plísní v provozu Výukového a výzkumného minipivovaru (sanitační stanice, ležácký sklep, úsek chlazení mladiny, varna) a v běžném prostředí, kterým byla chodba minipivovaru. V pivovarech hrozí riziko kontaminace produktu především při stáčení piva, které ve sledovaném minipivovaru probíhá v ležáckém sklepe.

Z tabulky č. 1, která udává celkové počty mikroorganismů v ovzduší provozu i chodby minipivovaru za červen a srpen vyplývá, že nejvíce bakterií bylo zjištěno v sanitační stanici – průměrně 2275 KTJ/m³, přičemž v chodbě bylo naměřeno v průměru 1335 KTJ/m³. Mírně vyšší záchyt než v chodbě byl zaznamenán v červnu ještě v úseku chlazení mladiny – 1440 KTJ/m³. Ostatní hodnoty nepřesahovaly 800 KTJ/m³ a byly tedy nižší než v chodbě. Z hlediska celkového počtu mikroorganismů tedy nejlépe vyšel ležácký sklep a varna, zde byla mikrobiální čistota vyšší než v chodbě během obou měření. Důvodem nejvyšší koncentrace CPM v sanitační stanici mohlo být provizorní využívání vchodu vedoucího právě do této místnosti a tedy větší pronikání mikrobů z venkovního prostředí do provozu. V chodbě, která za běžných okolností slouží pro příchod do pivovaru, probíhaly v době vzorkování vzduchu stavební úpravy.

Tabulka č. 2 udává počty plísní stanovené v ovzduší minipivovaru, rovněž za červen a srpen pokaždé ze čtyř částí provozu a z chodby. Z výsledků je patrné, že počet plísní je ve všech částech provozu nižší než v chodbě. Pouze v srpnu byl v sanitační stanici nepatrně vyšší výskyt plísní – 680 KTJ/m³ než v chodbě – 610 KTJ/m³, což mohlo opět souviset se zvýšeným pronikáním mikrobů vchodem do sanitační stanice. Ve vzduchu ležáckého sklepa se v červnu vyskytovalo nejnižší množství plísní z celého provozu – 1050 KTJ/m³.

V červnu byly zachyceny významně vyšší počty plísní než v srpnu. V červnu všechny hodnoty přesahovaly 1000 KTJ/m³, nejvyšší koncentrace v provozu byla v úseku chlazení mladiny – 1390 KTJ/m³, v chodbě bylo stanoveno dokonce 1840 KTJ/m³. Přičemž v srpnu byla nejvyšší zjištěná koncentrace 680 KTJ/m³ v sanitační stanici. V provozu pivovaru je vlhký vzduch, takže se zde může vyskytovat více plísní než v jiných budovách. K vyšší

koncentraci plísní v červnu mohlo navíc přispět počasí, v tomto období bylo vlhko s teplotou vzduchu kolem 22 °C. Naopak během srpnového odběru venkovní teploty dosahovaly 35 °C a bylo.

Dalším cílem práce bylo zjistit, jaké rody plísní se vyskytují ve vzduchu minipivovaru. Mnoho autorů (Janičková, 2009; Lignell et al., 2008) se shoduje, že se v ovzduší většiny interiérů nachází především čtyři rody plísní. Jedná se o rody *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* a *Alternaria*. Existuje celá řada výzkumů které potvrzují, že tyto rody jsou nejčastějšími plísněmi ve vzduchu vnitřního prostředí.

Výjimkou není ani výzkum, který provedli Dallongeville et al. (2015). Tato studie se zaměřila na koncentrace běžných forem plísní ve vzduchu sto padesáti francouzských bytů. Rody *Cladosporium* a *Penicillium* se vyskytovaly ve vzduchu u více než 90 % bytů, *Aspergillus* ve vzduchu 46 % bytů a *Alternaria* pouze v 6 % bytů. *Cladosporium* a *Penicillium* byly zároveň nejpočetnějšími rody ve vzduchu a dosahovaly až 2000 KTJ/m³. Tento výzkum byl zaměřen i na celkové koncentrace plísní v bytech. Záchyty se pohybovaly od 13 KTJ/m³ v ložnici a 40 KTJ/m³ v obývacím pokoji do 2000 KTJ/m³ i více v obou pokojích. U 28 % bytů byla celková koncentrace plísní ve vzduchu obývacího pokoje nižší než 250 KTJ/m³, u 17 % bytů mezi 250 a 500 KTJ/m³, u 21 % bytů mezi 500 a 1000 KTJ/m³ a 34 % bytů vykazovalo koncentrace nad 1000 KTJ/m³.

Počty plísní zachycené v minipivovaru odpovídají koncentracím plísní ve vzduchu obývacího pokoje zjištěným Dallongeville et al. (2015). V srpnu bylo v 60 % částí minipivovaru mezi 250 a 500 KTJ/m³ a ve 40 % částí 500 až 1000 KTJ/m³. V červnu bylo ve všech částech minipivovaru zachyceno nad 1000 KTJ/m³.

Studie Dallongeville et al. (2015) je také ve shodě, co se týká rodového zastoupení v této bakalářské práci. V ovzduší minipivovaru se na všech místech nejhojněji vyskytovaly rody *Cladosporium* a *Penicillium*. Rod *Cladosporium* tvořil průměrně 54,8 % všech plísní a rod *Penicillium* 31,6 % z celkového počtu plísní. Rod *Alternaria* byl zachycen v celém vzorkovaném úseku minipivovaru, kromě ležáckého sklepa v červnu a tvořil v průměru 2,9 % všech plísní. Rod *Aspergillus* byl zachycen ve všech částech pivovaru kromě sanitační stanice v srpnu a tvořil v průměru 1,8 % z počtu plísní.

K hodnocení mikrobiologického znečištění ovzduší ve vnitřním prostředí jsou používány standardní operační postupy pro nasávání aeroskopem, které udává Vyhláška č. 6/2003 Sb., kterou se stanoví hygienické limity chemických, fyzikálních a biologických

ukazatelů pro vnitřní prostředí pobytových místností některých staveb. Tato vyhláška udává, že jsou požadavky na kvalitu vnitřního prostředí staveb s výjimkou prostorů vyžadujících zvýšené nároky na jeho čistotu splněné, nepřekročí-li koncentrace bakterií 500 KTJ na 1 m³ vzduchu a koncentrace plísní nepřekročí počet 500 KTJ na 1 m³ vzduchu při stanovení koncentrace mikroorganismů aktivním nasáváním vzduchu aeroskopem standardním operačním postupem. Nepřípustný je viditelný nárůst plísní na zdech a povrchu pobytových místností.

V této práci zabývající se monitoringem vzduchu v prostředí Výukového a výzkumného minipivovaru nebyl při aktivním nasávání dodržen přesný standardní operačního postup, který udává Příloha č. 3 k vyhlášce č. 6/2003Sb., proto mohou být stanovené celkové počty mikroorganismů a počty plísní vyšší než povoluje vyhláška. Nebylo možné například úplně zamezit větrání, či pohybu dalších osob ve sledovaném prostoru z důvodu chodu pivovaru.

Mikrobiální kvalitu vzduchu v prostředí potravinářského provozu hodnotili pomocí aeroskopu i Kunová et al. (2010). Konkrétně se jednalo o mikrobiologickou laboratoř Výzkumného ústavu mlékárenského a o prostředí dvou mlékáren.

Ve vzduchu mikrobiologické laboratoře byly největší koncentrace plísní stanoveny v srpnu. Nejvyšší počet plísní, který byl v srpnu zjištěn, dosahoval 2220 KTJ/m³. Počty plísní (kromě srpna) vyhověly požadavkům vyhlášky. V případě bakalářské práce bylo v srpnu zachyceno výrazně méně plísní než v červnu. V červnu bylo v minipivovaru stanoveno v průměru 1364 KTJ/m³, přičemž v srpnu to bylo průměrně 506 KTJ/m³. To mohlo být způsobeno, jak už bylo uvedeno výše, vysokou venkovní teplotou a nízkou vzdušnou vlhkostí v den odběru.

U celkového počtu bakterií stanovených v mikrobiologické laboratoři, nevyplývá souvislost s ročním obdobím, o něco vyšší koncentrace však byly zaznamenány na podzim. V průběhu roku se objevovaly vyšší počty – nejvyšší 2540 KTJ/m³ v říjnu, ale i výrazně nižší a to 60 KTJ/m³ v srpnu. Požadavkům vyhlášky vyhověly celkové počty mikroorganismů v prosinci, červenci a v září. V případě bakalářské práce nebyl rozdíl mezi počtem mikroorganismů v červnu a srpnu průkazný. V červnu bylo v minipivovaru zachyceno průměrně 1228 KTJ/m³ a v srpnu 1154 KTJ/m³.

V prostředí mlékáren byl vyšší výskyt plísní a CPM než povoluje vyhláška zjištěn v sýrařském provozu, v provozu s výrobou jogurtů a v místnosti na porcování sýrů. Nejvíce

plísni bylo ve výrobně jogurtů (5080 KTJ/m³) a v porcovně sýrů (2400 KTJ/m³). Souvislost s ročním obdobím u mlékáren nelze potvrdit.

Vzduchem vnitřního prostředí a mikroorganismy v něm obsaženými se zabývali také Haas et al. (2010), kteří hodnotili výskyt hub ve vzduchu 36 rakouských-štyrských vinných sklepů. Studie poukazuje na významnou souvislost mezi množstvím plísni rostoucím na povrchu materiálů a množstvím spor obsažených ve vzduchu interiéru.

Tento výzkum potvrzuje, že koncentrace spor ve vnitřním ovzduší se zvyšuje s rostoucím množstvím viditelných plísni na zdech či jiných materiálech (Klánová, 2013). V ovzduší sklepů s viditelnými nárůsty plísni na povrchu materiálů dosahovaly koncentrace plísni hodnot až $1,4 \times 10^4/\text{m}^3$. V nejlhčím místě minipivovaru, kterým je ležácký sklep, bylo v červnu dosaženo hodnoty 1050 KTJ/m³. V žádné části pivovaru nebyly v době vzorkování vzduchu zdi porostlé plísněmi.

Rozdíly mezi sklepy s kontaminovanými a nekontaminovanými zdi plísněmi ve studii Haase et al. (2010) panovaly také v rodovém zastoupení mikromycet. V obou případech se nejhojněji vyskytoval rod *Penicillium*. Ovšem v ovzduší sklepů bez viditelných nárůstů plísni byl na druhém místě rod *Cladosporium*, přičemž skladba plísni ve sklepním vzduchu byla velmi obdobná skladbě plísni venku. U sklepů se znečištěnými zdi či povrchy však zaujímal druhé místo nejvyššího zastoupení rod *Aspergillus* a až po té následoval rod *Cladosporium*.

Výsledky této studie nelze zcela srovnávat s výsledky bakalářské práce, jelikož v minipivovaru nebyly patrné porosty plísni na zdi či jiných pevných materiálech. Rozdíl byl také u rodu plísně, která ve vzduchu dominovala. Ve vinných sklepech to byl rod *Penicillium*, kdežto v minipivovaru dominoval *Cladosporium*, který tvořil průměrně 54,8 % z celkového počtu plísni. Rod *Penicillium* se nacházel až na druhém místě a zaujímal průměrně 31,6 % z celkového počtu plísni. Rod *Aspergillus* se vyskytoval ve výrazně menším množství, než předchozí dvě plísně, což koresponduje s prostředím bez patrného nárůstu plísni. *Aspergillus* tvořil pouze 1,8 % z celkového počtu plísni.

Přítomnost mikroorganismů v budovách významně ovlivňuje činnost klimatizace (Maier et al., 2000). Vliv činnosti klimatizačního zařízení na kvalitu prostředí uvnitř posluchárny České zemědělské univerzity v Praze zkoumali Kic et al. (2014).

Bylo zjištěno, že patnáct minut po spuštění klimatizace se snížil počet bakterií v posluchárně na 35 až 40 % a později dokonce až na 20 %, avšak konidie mikroskopických

vláknitých hub procházely z venkovního vzduchu skrz filtry. Dominantní byl rod *Cladosporium*, jehož výskyt se zvýšil vždy po spuštění klimatizace, a to jak při znečištěných filtrech, které byly používány přibližně rok, tak při čistých filtrech, po jejich bezprostřední výměně. Nejvyšší průměrná hodnota počtu plísni dosahovala 555 KTJ/m³ a byla naměřena v létě (za vlhkého a větrného počasí) po 5 hodinách činnosti klimatizace. Koncentrace konidií rodu *Aspergillus* se zvýšila šestnáctkrát po 15 minutách provozu klimatizace, ale pouze v případě znečištěných filtrů vzduchu. Výsledky bakalářské práce jsou ve shodě se studií Kice et al. (2014), ve které byl zjištěn stejný dominantní druh plísně, tedy *Cladosporium*.

Závěrem lze říct, že množství mikroorganismů, zejména plísni, ve vnitřním vzduchu je ovlivněno vnitřním prostředím, ale také počasím. V případě bakalářské práce byl nejhojnějším rodem plísně *Cladosporium*, což je ve shodě se studiemi, které provedli Dallongeville et al. (2015) a Kic et al. (2014).

7 Závěr

Jedním z cílů bakalářské práce bylo zpracovat literaturu týkající se mikroorganismů, které se vyskytují ve vzduchu potravinářských provozů a mohou zde ovlivnit kvalitu potravin. Dalším cílem bylo potvrdit, že mikrobiální kvalita ovzduší v potravinářském provozu je lepší než v běžném prostředí. Nejnižší množství mikroorganismů by se mělo vyskytovat především v místech, kde může dojít ke kontaminaci produktů.

Podle zjištěných celkových počtů mikroorganismů ve Výukovém a výzkumném minipivovaru se nejvyšší koncentrace vyskytovaly v sanitační stanici. Přesahovaly tak koncentrace zjištěné v chodbě, která představovala běžné prostředí a předpokládalo se zde největší znečištění. Vyšší výskyt v sanitační stanici však mohl souviset se zvýšeným pronikáním mikrobů z venkovního prostředí vzhledem k provizornímu využívání vchodu vedoucího do této místnosti. V ostatních částech provozu byl potvrzen nižší celkový počet mikroorganismů než v chodbě. Celkový počet plísni byl v celém provozu nižší než v chodbě pivovaru.

Jelikož jsou nádoby a potrubní systémy, které přicházejí do styku s produktem, proplachovány sanitačními prostředky, nehrozí zde velké riziko kontaminace jako je tomu v případě jiných potravinářských provozů. Rizikovým krokem je však stáčení piva, které v minipivovaru probíhá v ležáckém sklepě. V tomto místě byl potvrzen nižší výskyt mikroorganismů než v běžném prostředí a cíl práce byl tedy splněn.

Kromě stanovení celkového počtu mikroorganismů a počtu plísni, byly mikromycety určeny na úroveň rodu. Nejhojnější byl rod *Cladosporium*, který zaujímal průměrně 54,8 % ze všech plísni. Na druhém místě se nacházelo *Penicillium* s průměrným zastoupením 31,6 %. Dalšími rody byly *Alternaria*, který se vyskytoval průměrně v 2,9 % z celkového počtu plísni a *Aspergillus* s průměrem 1,8 %. Byla zde zachycena také *Mycelia sterilia* a to v průměru 5,9 % z celkového počtu plísni. Z rodového určení vyplývá, že se zde vyskytovaly pouze rody plísni typické pro vnitřní ovzduší.

8 Seznam literatury

Adams, M. R., Moss, M. O. 2000. Food microbiology. 2nd ed. Royal Society of Chemistry. Cambridge. p. 479. ISBN: 0854046119.

Bell, C., Neaves, P., Williams, A. P. 2005. Food microbiology and laboratory practice. Blackwell Science. Oxford. p. 324. ISBN: 9780632063819.

Dallongeville, A., Le Cann, P., Zmirou-Navier, D., Chevrier, C., Costet, N., Annesi-Maesano, I., Blanchard, O. 2015. Concentration and determinants of molds and allergens in indoor air and house dust of French dwellings. Science of the Total Environment. 536. 964-972.

Fassatiová, O. 1979. Plísně a vláknité houby v technické mikrobiologii: příručka k určování. Státní nakladatelství technické literatury. Praha. 211 s.

Görner, F., Valík, L. 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívateľín. Malé centrum. Bratislava. 528 s. ISBN: 8096706497.

Hampl, B., Šilhánková, L. 1957. Klíč k určování technicky důležitých plísní. Státní nakladatelství technické literatury. Praha. 130 s.

Haas, D., Galler, H., Habib, J., Melkes, A., Schlacher, R., Buzina, W., Friedl, H., Marth, E., Reinthaler, F. F. 2010. Concentrations of viable airborne fungal spores and trichloroanisole in wine cellars. International Journal of Food Microbiology. 144 (1). 126-132.

Hens, H. L. S. C. 1999. Fungal Defacement in Buildings: A Performance Related Approach. HVAC&Research. 5 (3). 265-280.

Hýsek, J. 1994. Aerobiologie, věda o životě ve vzduchu. Vesmír. 73 (10). 566-567.

Chládek, L. 2007. Pivovarnictví. Grada. Praha. 207 s. ISBN: 9788024716169.

Janíčková, H. 2009. Alergie na roztoče a plísně. Pediatrie pro praxi. 10 (3). 163-166.

Jokl, M. 2002. Zdravé obytné a pracovní prostředí. Academia. Praha. 261 s. ISBN: 8020009280.

Kalhotka, L. 2011. Mikrobiologie vzduchu a vody. In: Kuchtík, J., Šustová, K., Kozelová, M., Konečná H., Kroupová, D. (eds.). Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků VIII. Sborník referátů ze semináře a mezinárodních účastí. Mendelova univerzita v Brně. Brno. s. 17-19. ISBN: 9788073755096.

Kic, P., Růžek, L., Popelářová, E. 2014. Air-conditioning and microbiological Environment in the lecture room. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 45 (2). 104–109.

Klaban, V. 2001. Svět mikrobů. 2. vyd. Gaudeamus. Hradec Králové. 416 s. ISBN: 8070416874.

Klánová, K. 2002. Standardní operační postupy pro vyšetřování mikroorganismů v ovzduší a pro hodnocení mikrobiologického znečištění ovzduší ve vnitřním prostředí. *Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica*. (1). 1-21.

Klánová, K. 2013. Plísně v domě a bytě: odstraňování a prevence. Grada. Praha. 104 s. ISBN: 9788024747903.

Klánová, K., Kostičková, M. 1999. Mikrobiologicko-hygienické vyšetřovací metody vnitřního prostředí. *Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica*. (5). 1-13.

Kunová, G., Peroutková, J., Pechačová, M., Roubal, P. 2010. Využití aktivní a pasivní metody při monitoringu mikrobiální kontaminace ovzduší. *Mlékařské listy*. 123. 13-18.

Lignell, U., Meklin, T., Rintala, H., Hyvärinen, A., Vepsäläinen, A., Pekkanen, J., Nevalainen, A. 2008. Evaluation of quantitative PCR and culture methods for detection of house dust fungi and streptomycetes in relation to moisture damage of the house. *Letters in Applied Microbiology*. 47 (4). 303-308.

Maier, R. M., Pepper, I. L., Gerba, Ch. P. 2000. Environmental Microbiology. Academic Press. London. p. 585. ISBN: 0124975704.

Malíř, F., Ostrý, V., Bárta, I., Buchta, V., Dvořáčková, I., Paříková, J., Severa, J., Škarková, J. 2003. Vlákňité mikromycety (plísňě), mykotoxiny a zdraví člověka. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů. Brno. 349 s. ISBN: 8070133953.

Montville, T. J., Matthews, K. R. 2008. Food Microbiology. 2nd ed. ASM Press. Washington. p. 428. ISBN: 9781555813963.

Paříková, J., Kučerová, I. 2001. Jak likvidovat plísňě. Grada. Praha. 86 s. ISBN: 8024790297.

Rohilla, A. 2010. Handbook of Bacteriology. Oxford Book Co. New Delhi. p. 316. ISBN: 9789350431030.

Singh, U. S., Kapoor, K. 2010. Introductory microbiology. Oxford Book Co. India. p. 316. ISBN: 9789380179216.

Sprenger, R. A. 2003. The food hygiene handbook. 16th ed. Highfield. Doncaster. p. 64. ISBN: 1904544185.

Šilhánková, L. 2008. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. vyd. Academia. Praha. 363 s. ISBN: 9788020017031 .

Švec, F., Plesník, V. 1986. Hygiena a epidemiologie. Avicenum, zdravotnické nakladatelství. Praha. 264 s.

Vlková, E., Rada, V., Killer, J. 2009. Potravinářská mikrobiologie. Česká zemědělská univerzita. Praha. 168 s. ISBN: 9788021319882.

Vyhláška č. 6/2003 Sb., kterou se stanoví hygienické limity chemických, fyzikálních a biologických ukazatelů pro vnitřní prostředí pobytových místností některých staveb. In: Sbírka zákonů České republiky. 2003.

Yousef, A. E., Carlstrom, C. 2003. Food microbiology: a laboratory manual. Wiley & Sons. Hoboken, N. J. p. 277. ISBN: 047139105.

Hruška, M. Historie výukového a výzkumného pivovaru [online]. 13. prosince 2006. [cit. 2016-02-13]. Dostupné z <<http://www.pivovar.tf.czu.cz/?r=2884>>.