

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Mikrobiální kontaminace ovocných čajů

Bakalářská práce

Autor práce: Hana Kuřáková

Vedoucí práce: Ing. Eva Popelářová, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Mikrobiální kontaminace ovocných čajů" 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 15. dubna 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Evě Popelářové, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a odborné vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za psychickou podporu a trpělivost.

Mikrobiální kontaminace ovocných čajů

Souhrn

Čaje každý den konzumují ve světě milióny lidí, včetně dětí. Je proto důležité dbát na jejich mikrobiální nezávadnost.

Cílem bakalářské práce bylo zpracovat rešerši týkající se obecných informací o ovocných čajích, o jejich výrobě a možnosti kontaminace nežádoucími mikroorganismy. Dále byly v literární rešerši popsány významné bakterie a plísně a v neposlední řadě jsme se zaměřili na mykotoxiny a na eliminaci mikroorganismů z potravin.

V praktické části bylo zhodnoceno zastoupení mikroorganismů v sáčkových ovocných čajích. Zaměřili jsme se na celkové počty mikroorganismů, na koliformní bakterie, které mohou být ve větším zastoupení patogenní a na mikromycety. Rodová skladba mikromycet byla obzvláště důležitá, protože mohou produkovat metabolity – mykotoxiny, které mohou být příčinou mnoha onemocnění.

Rozbory byly provedeny dvěma metodami. Varianta označována jako A spočívala v převedení obsahu sáčků do fyziologického roztoku. Varianta označována jako B spočívala v zalití sáčků vroucí vodou. Při vyhodnocení byly tyto dvě varianty porovnávány.

Z výsledků této práce bylo zjištěno, že počty mikroorganismů ve vzorcích byly poměrně nízké. Bylo prokázáno, že při přípravě vzorku zalitím vroucí vodou (varianta B) se výrazně sníží počet mikroorganismů, v některých případech nebyly mikroorganismy přítomny vůbec. U varianty A bylo zjištěno více mikromycet. Dominantní zastoupení měly rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Cladosporium*. Zjištěné rody mohou být nebezpečné kvůli mykotoxinům, avšak u varianty B byly jedinými zástupci mikromycet rody *Cladosporium* a *Penicillium* v malé míře.

Klíčová slova: ovocný čaj, mikrobiologická kontaminace, mikromycety

Microbial contamination of fruit teas

Summary

Teas are consumed daily by millions of people on the World, therefore it is important to care for their microbial harmlessness.

The aim of this work was to conduct a research in regards to general information about fruit teas, their manufacturing and possibilities of contamination by undesirable microorganisms. In this research were also described important bacteria and fungi and we focused on mycotoxins and the elimination of microorganisms from a food.

Representation of microorganisms in teabags was evaluated in practical part of this research. We focused on total quantity of microorganisms, coliform bacteria, that can be pathogenic in higher representation and micromycetes. Genus structure of micromycetes was important in particular, because they can produce metabolites – mycotoxins, that can be a cause for many diseases.

Analyses were conducted by two methods. Variant classified as A was consisting of transformation of the teabag contents into the physiological solution. Variant classified as B was consisting of watering of the teabag contents. During evaluation, both of these variants were compared.

From the results of this work it was found out, that quantities of microorganisms were relatively small. It was discovered, that during the sample preparation by watering the sample with boiling water (variant B) the quantity of microorganisms will lower, in some cases they were not present at all. The presence of wider genera of micromycetes was also discovered. Three genera were dominant *Aspergillus*, *Penicillium* and *Cladosporium*. These free found of genera can be dangerous, because of mycotoxins, however micromycetes in variant B were only represented by genera *Cladosporium* and *Penicillium* and in small measure.

Keywords: fruit tea, microbial contamination, micromycetes

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce.....	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Ovocný čaj	10
3.2	Výroba ovocných čajů	10
3.2.1	Fermentace	10
3.2.2	Sběr a sušení	11
3.2.3	Výroba v potravinářském provozu.....	12
3.2.4	Konzervace ovocných čajů	12
3.2.5	Možnosti kontaminace potravin.....	12
3.3	Mikroorganismy	13
3.3.1	Význam mikroorganismů	13
3.4	Bakterie	13
3.4.1	Gramnegativní bakterie	14
3.4.1.1	Salmonella	14
3.4.1.2	Campylobacter.....	15
3.4.1.3	Escherichia	15
3.4.1.4	Shigella.....	16
3.4.1.5	Vibrio	17
3.4.2	Grampozitivní bakterie	17
3.4.2.1	Listeria	17
3.4.2.2	Staphylococcus	18
3.4.2.3	Clostridium	19
3.4.2.4	Bacillus	19
3.5	Plísně	20
3.5.1	Rozmnožování plísní	20
3.5.2	Nejvýznamnější plísně	21
3.5.3	Zygomycota.....	21
3.5.3.1	Mucor	21
3.5.3.2	Rhizopus	22
3.5.4	Ascomycota.....	23
3.5.4.1	Penicillium	23

3.5.4.2	Aspergillus	24
3.5.4.3	Fusarium	24
3.5.4.4	Cladosporium.....	25
3.5.5	Mykotoxiny	26
3.6	Eliminace mikroorganismů z potravin.....	26
4	Materiál a metody.....	28
4.1	Použité vzorky	28
4.2	Použitá média.....	30
4.3	Postup	31
5	Výsledky	33
5.1	Celkové počty mikroorganismů.....	33
5.2	Koliformní bakterie	34
5.3	Mikromycety	34
5.3.1	Kvantitativní zastoupení mikromycet	35
5.3.2	Kvalitativní zastoupení mikromycet v jednotlivých vzorcích.....	35
6	Diskuze	38
7	Závěr.....	42
8	Seznam literatury	43

1 Úvod

Čaje, ať už pravé z čajových lístků, ovocné, či bylinné se těší ve světě obrovské oblibě. Však jde také ve světovém měřítku, hned po vodě, o nejvíce konzumovaný nápoj. Důvodů pro tak velikou oblibu je několik. Zejména jde o jedinečnou chuť a aroma, dále můžeme zmínit historické aspekty a dobrou dostupnost. Čaj je oblíbený u lidí všech věkových kategorií, od dětí až po seniory. Zvláště oblíbené u dětí jsou ovocné čaje, protože neobsahují kofein. Je velmi důležité, aby byla dodržována a kontrolována mikrobiologická nezávadnost.

Nebezpečné pro člověka může být přítomnost mikromycet, zvláště pak jejich sekundárních metabolitů – mykotoxinů, které patří mezi závažné kontaminanty. Důležitá je i přítomnost koliformních bakterií, které by se v potravinách vyskytovat neměly, protože způsobují akutní nevolnosti, jako průjem nebo zvracení.

Pro zachování mikrobiální nezávadnosti je tedy nutné dodržovat hygienické návyky po celou dobu výroby, balení i distribuci. Dále je nutné dodržovat pokyny pro přípravu i uskladnění produktu určené výrobcem.

2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo stanovit mikrobiologickou kvalitu vybraných ovocných čajů se zaměřením na mikromycety, které byly hodnoceny kvantitativně a následně i kvalitativně na úroveň rodu. Práce byla dále zaměřena na počty celkových mikroorganismů a na koliformní bakterie.

Dalším cílem bylo porovnat změny v množství mikroorganismů při dvou různých variantách přípravy vzorků.

3 Literární rešerše

Ovocné čaje jsou oblíbeným nápojem dětí i dospělých. Jsou konzumovány ve velkém měřítku a je proto důležité, aby splňovaly mikrobiální nezávadnost.

3.1 Ovocný čaj

Ovocným čajem se rozumí nápoj ze sušeného ovoce a povolených sušených částí rostlin, kde podíl sušeného ovoce musí být vyšší než 50 % (Vyhláška č. 330/1997 Sb., k zákonu č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích). Nápoje pod označením čaj, kam se řadí čaje z čajovníku i ovocné čaje jsou druhým nejvíce konzumovaným nápojem ve světě, hned po vodě (Velković et al., 2013). Ovocné čaje neobsahují kofein, mají osvěžující, ale také léčivé účinky. Poskytují úlevu a vzpruhu v letních dnech, ale i za sychravého, zimního počasí (Kott, 1985).

3.2 Výroba ovocných čajů

Ovocné čaje se připravují buď z jednoho, nebo více druhů rostlin. Na výrobu ovocných čajů se ve většině případů nepoužívají rostliny nebo části rostlin v syrovém stavu, protože takový čaj by byl málo aromatický i méně chutný. Některé rostliny mohou být pro zvýraznění chuti fermentovány. Nejčastějším způsobem přípravy rostlin pro výrobu čajů je jejich sušení, následné řezání a drcení.

3.2.1 Fermentace

Fermentace neboli kvašení, je biotechnologický proces, kdy za pomoci mikrobiálních enzymů vznikají z látek složitějších ty jednodušší. Cílem fermentace je dosažení výraznější chuti, aroma a vůně.

Fermentují se hlavně mladé listy nebo mladé vrcholky lodyh. Zelené listy nebo výhonky lodyh se nechávají před fermentací zavadnout. Zavadlý materiál je rozprostřen rovnoměrně na tvrdé podložce a válečkem je rozrušen povrch. Následuje rolování do ruliček. Takto připravený materiál se nechá na teplém, vlhčím místě, aby se zapařil a tím se vytvořily podmínky pro fermentační procesy, které vyvolávají žádoucí látkové přeměny. Materiál je po 24 až 48 hodinách rozbalen a na stinném místě dosušen. Nejsou fermentovány rostliny, které mají léčebné účinky.

3.2.2 Sběr a sušení

Listy se sbírají zpravidla v době rozkvětu nebo na počátku vegetace. Suší se ve stínu v malých vrstvách, přitom optimální teplota pro sušení je 30 - 40 °C. Přirozeným teplem jsou listy usušené za 4 - 5 dní. Usušené listy by měly být křehké a lámavé, avšak ne drobivé. Nejčastěji jsou používány listy ostružiníku nebo maliníku.

Květy jsou sbírány na počátku, nikoliv v plném rozkvětu. Někdy se sbírají celá květenství, např. u řebříčku, heřmánku, černého bezu. Jindy se zase sbírají jenom květní plátky a to např. u růže. Suší se přirozeně na stinném místě nebo pod umělým světlem při teplotě maximálně 35 °C. Doba sušení je v letních měsících 5 - 7 dní. Usušené květy poznáme podle toho, že jsou suché i uvnitř semeníků nebo květních lůžek. Nejznámější používaný květ je z ibišku. Ibišek dodává čaji typickou červenou barvu a mírně nakyslou chuť.

Natě se sbírají, když jsou ještě mladé a šťavnaté. Správně usušené natě se poznají tak, že jsou lámavé. Po usušení se nechávají ve svazcích v silnějších vrstvách, aby se upravila jejich konzistence.

Kořeny a oddenky jsou odebírány v době vegetačního klidu, nejlépe na jaře před začátkem vegetace, kdy jsou v nich nashromážděny veškeré účinné látky. Suší se celé nebo podélně rozříznuté na stinném vzdušném místě nebo umělým teplem při 50 °C. Usušené kořeny a oddenky nemají být úplně lámavé, ale mají se pohybovat na rozhraní pružnosti a lámavosti. Používají se kořeny čekanky, lékořice, zázvoru.

Jako další využívaná část ovoce jsou plody. Používají se plody šípku (kvůli značnému množství vitamínu C), jablek, aronie nebo manga. Zde se technologie pro sušení mírně liší. Šípky se sbírají za plné zralosti buď celé, nebo rozpůlené zbavené stopek a okvětí. Plody jsou zbaveny chloupků a pecek. Suší se zpravidla rychle při umělém teple o teplotě 65 - 70 °C. Tím se zachová maximální množství vitamínu C. Borůvky, brusinky, černý rybíz se suší za přirozených podmínek v polostínu nebo na mírném slunci nebo pomocí umělého tepla, kdy počáteční teplota je 45 °C a dosouší se na 60 °C. Bezinky se suší i se stopkami, nejlépe na slunci. Po zavadnutí se oddělují od třapin a dosouší se při umělém teple o teplotě 50 - 60 °C. Usušené bezinky mají být pružné a suché i uvnitř peckoviček. Dále se může používat aroma, které je vždy odlišné podle příchutě čaje, např. ostružinové, malinové, pomerančové (Kott, 1985).

Takto připravený materiál je přesunut do potravinářského provozu, kde se připraví konečné směsi určené pro spotřebitele.

3.2.3 Výroba v potravinářském provozu

Výroba ovocných čajů začíná příjmem surovin, tedy sušeného ovoce a bylin, které jsou po vstupní kontrole uskladněny v klimatizovaných skladech. Sušené ovoce se ukládá do vzdušných a suchých prostor do těsně uzavřených kartónových nebo dřevěných krabic, kde je chráněno především před vlhkem a hmyzem. Někdy se sušené ovoce může uchovávat ve sklenicích nebo v zásobnících z umělé hmoty. Použitelnost skladovaného ovoce pro výrobu ovocných čajů je maximálně rok. Poté by se měl nevyužitý materiál zlikvidovat a nahradit novým (Kott, 1985).

Na základě dané receptury jsou naváženy jednotlivé druhy ovoce, které se smíchají a zhomogenizují. Přidána jsou potřebná aromata a poté se v případě sáčkových čajů balí pomocí balicího stroje do jednotlivých sáčků a následně pak do celých balení. Jako ochranná vrstva proti vnějším vlivům slouží papírová krabička chráněná plastovým obalem. Vše probíhá v uzavřeném prostoru, aby byla zaručena zdravotní nezávadnost ovocných čajů. Hotové čaje jsou následně převáženy do skladů, kde musí být dodrženy podmínky pro jejich skladování (Konečná a Kalhotka, 2009).

3.2.4 Konzervace ovocných čajů

Do ovocných čajů se nepřidávají žádné konzervační látky, protože jsou konzervovány sušením. Vodní aktivita je velmi nízká, kolem 0,6. Tato hodnota nepodporuje množení mikroorganismů. Některé však mohou přežít a pokud se dostanou do vhodného prostředí, tak se mohou začít množit (Konečná a Kalhotka, 2009).

3.2.5 Možnosti kontaminace potravin

To, zda bude potravina kontaminována mikroorganismem, který je schopen se rozmnožovat, a tím pádem ohrozit kvalitu potraviny, závisí na mnoha faktorech. Svou roli zde hraje pH, vodní aktivita, oxidačně-redukční potenciál, přirozeně se vyskytující látky, které ovlivňují růst mikroorganismů a přídatné sloučeniny sloužící jako konzervační látky. Uvolněné bakterie z biofilmů jsou častým kontaminantem potravin ve výrobním provozu. Biofilm je společenství mikrobiálních buněk nevratně přichycených k podložce nebo k okolním buňkám,

usazených v polymerní mimobuněčné hmotě, kterou samy produkují, jež mají změněný fenotyp (Schindler, 2014). Biofilm vzniká přichycením volně plavoucích buněk, které se nazývají planktonické, na pevný povrch, který skýtá dostatečný přísun živin. Poté co se planktonické buňky přichytí, změni své chování a fenotyp. Buňky začnou produkovat velké množství lepivého polysacharidu. Z tohoto polysacharidu se tvoří hlenová matrice, která drží buňky pohromadě a funguje jako voštinové lešení. V tomto lešení se buňky množí, vytvářejí mikrokolonie a síť kanálků. Některé buňky se z biofilmu na určitý impuls odlučují, přecházejí zpět do planktonického stavu a kolonizují další části povrchu. Tímto způsobem může dojít i ke kontaminaci potravin. Další možností, jak dochází ke kontaminaci potravin je volně se vyskytujícími mikroorganismy ze vzduchu (Karpíšková a Schlegelová, 2006, Rulík a kol., 2011).

3.3 Mikroorganismy

Jako mikroorganismy jsou považovány jednobuněčné nebo vícebuněčné organismy, které nejsou schopny tvořit diferenciované tkáně nebo pletiva. Jednobuněčné mikroorganismy jsou označovány jako Prokaryota, mezi ně patří cyanobakterie a bakterie. Vícebuněčné organismy jako Eukaryota, kam se řadí řasy, houby a protozoa. Houby se dělí na kvasinky a plísně (Šilhánková, 2008).

3.3.1 Význam mikroorganismů

Mikroorganismy rozkládají veškerou organickou hmotu a tím vrací chemické prvky zpět do koloběhu. Pozitivní schopnosti jsou využívány také v potravinářství, kdy se pomocí mikroorganismů vyrábí nepřeberné množství mléčných výrobků nebo pomocí některých skupin mikroorganismů prodlužuje trvanlivost potravin. Mikroorganismy mají i negativní účinky. Například způsobují nemoci lidí, zvířat i rostlin. Dále se podílejí na rozkladu potravin a tím přispívají k jejich znehodnocení (Šilhánková, 2008).

3.4 Bakterie

Bakterie jsou mikroorganismy o velikosti okolo 1 mikrometru. Tvar buněk je většinou tyčinkovitý, dále může být kulovitý nebo vláknitý. Mohou být sporulující nebo nesporulující. Pro potravinářský průmysl tvoří velký problém sporulující bakterie. Dále se dělí podle rozdílné stavby buněčné stěny na gramnegativní a grampozitivní (Montville and Matthews, 2008).

3.4.1 Gramnegativní bakterie

Gramnegativní bakterie jsou převážně tyčinky, ale můžou být i koky. Mezi nejdůležitější gramnegativní bakterie, které způsobují kažení potravin patří rody *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia*, *Shigella* a *Vibrio*. (Montvielle and Matthews, 2008)

3.4.1.1 Salmonella

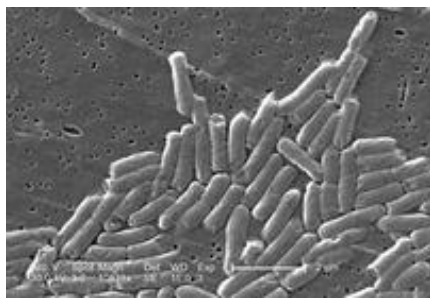
Rod *Salmonella* je pojmenován podle amerického veterinárního patologa a bakteriologa D. E. Salmona. V roce 2015 bylo identifikováno 2500 kmenů. Z toho kolem 100 je patogenních. Jedná se o gramnegativní, nesporulující, fakultativně anaerobní pohyblivé bakterie, které stojí za řadou onemocnění.

Způsobují řadu onemocnění jak u lidí, tak u některých živočichů. Jedná se především o gastroenteritidu, ale je také zodpovědná za břišní tyfus, který vyvolává druh *Salmonella typhi*, nebo myší tyfus. Některé kmeny se mohou přenášet ze zvířat na lidi a naopak. Salmonelózu u nás nejčastěji způsobuje *Salmonella enteritidis*.

Je možné se nakazit z kontaminované syrové potravy. Náchylná jsou vejce nebo maso. Nákaza je možná i z kontaminované vody znečištěné fekáliemi. Jako prevence se uvádí dostatečné tepelné opracování potravin a dodržení hygienických podmínek.

Nejčastějším příznakem salmonelózy je průjem, ale pokud se bakterie dostanou přes střevní epitel dál do těla, kde migrují, mohou způsobit horečky, bolesti hlavy, či záněty orgánů (Richard, 2016).

Obr. č. 1: *Salmonella*



<http://eds.b.ebscohost.com.infozdroje.czu.cz/>

3.4.1.2 *Campylobacter*

Campylobacter je esovitá nebo spirálovitá, nesorotvorná tyčinka. Za nevhodných podmínek může přecházet v kokovité útvary. *Campylobacter* je pohyblivá pomocí alimentárního bičíku na jednom nebo na obou koncích (Montville and Matthews, 2008).

Nejrozšířenějších je 6 druhů, přičemž nejvíce vyskytující se infekce jsou vyvolané *Campylobacter jejuni* (Klaban, 1999).

Onemocnění způsobené bakteriemi tohoto rodu se nazývá kampylobakterióza. Jedná se nejčastější o alimentární bakteriální infekci v rozvinutých zemích, projevující se průjmy. Nejčastějším přenašečem je drůbež (Meredith et al., 2013).

Obr. č. 2: *Campylobacter*



<http://lancastria.net/blog/supermarket-chickens-and-the-campylobacter-bug.html>

3.4.1.3 *Escherichia*

Escherichia je gramnegativní nesorulující, tyčinkovitá, bičíkatá bakterie, která je pojmenovaná podle německého lékaře Theodora Eschericha.

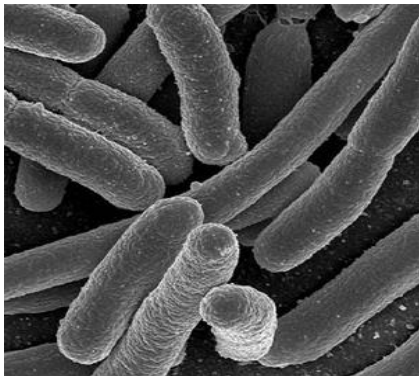
Rod *Escherichia* zahrnuje zvláště druhy *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermanii* a *Escherichia vulneris*, přičemž nejdůležitější a nejvíce prozkoumaná je *Escherichia coli* běžně se vyskytující u živočichů, v životním prostředí a u lidí ve střevním traktu i v ústech.

Escherichia coli kolonizuje člověka již během několika prvních hodin života. Pomáhá při trávení a ve střevě slouží jako obrana proti infekčním bakteriím, a tím má pozitivní účinky na lidský organismus. Dále produkuje malé množství vitamínu B12 a K.

Některé kmeny však způsobují nemoci gastrointestinálního, močového nebo

centrálního nervového systému. Konkrétně způsobují záněty močových cest, meningitidu a průjemové onemocnění. Infekci mohou způsobit i nepatogenní kmeny při oslabené imunitě nebo při poškození gastrointestinálního traktu (Nataro and Kaper, 1998). Nakazit se lze z kontaminovaných potravin nebo z vody znečištěné fekáliemi.

Obr. č. 3: *Escherichia*



<http://www.topsecretwriters.com/2016/01/is-it-possible-chipotle-e-coli-outbreaks-are-gmo-industry-sabotage/>

3.4.1.4 **Shigella**

Obr. č. 4: *Shigella*



<http://www.foodnewslatam.com/inocuidad/53-control-calidad/929-caracter%C3%ADsticas-de-la-bacteria-shigella.html>

Rod *Shigella* zahrnuje tyčinkovité, nesporotvorné, nepohyblivé bakterie, které jsou aerobní a velmi citlivé na nepříznivé činitele vnějšího prostředí (Klaban, 1999).

Bakterie *Shigella* je rozdělena do 4 druhů podle somatických antigenů: *Shigella dysenteriae* (skupina A), *Shigella flexneri* (skupina B), *Shigella boydii* (skupina C) a *Shigella sonnei* (skupina D) (Montville and Matthews, 2008).

Způsobují onemocnění shigelóza, též nazývanou bacilární úplavice, při níž bakterie napadá sliznici střeva a původcem je *Shigella flexneri*. Shigelóza je vysoce nakažlivá. Infekční dávka činí cca 200 zárodků. Dříve se nemoci říkalo „nemoc špinavých rukou“ (Zychlinsky et al, 1992). Onemocnění se projevuje vodnatými průjmy s příměsí krve a hlenu. Nákaza je možná z fekálně znečištěné vody a potravin (Klaban, 1999).

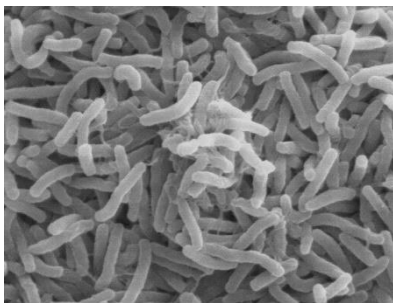
3.4.1.5 **Vibrio**

Do rodu *Vibrio* patří tyčinkovité, většinou zakřivené bakterie. Zahrnuje velké množství skupin bakterií, které jsou schopné tvořit biofilmy.

Patogenně nejvýznamnější je *Vibrio cholerae*. Ta způsobuje vodnaté průjmy. Do těla lidí se dostane s požitím kontaminované vody nebo potravin (Percival and Williams, 2014). Onemocnění zažívacího traktu může způsobit i *Vibrio vulnificus*, které se projevuje jako gastroenteritida nebo vyvolává průjmy (Klaban, 1999).

Vibria se vyskytují ve vodě a jejich koncentrace se zvyšuje s přítomností fytoplanktonu (Main et al., 2015).

Obr. č. 5: *Vibrio*



https://en.wikipedia.org/wiki/Vibrio_cholerae

3.4.2 **Grampozitivní bakterie**

Mezi nejvýznamnější grampozitivní bakterie jsou řazeny rody *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* (Montville and Matthews, 2008).

3.4.2.1 **Listeria**

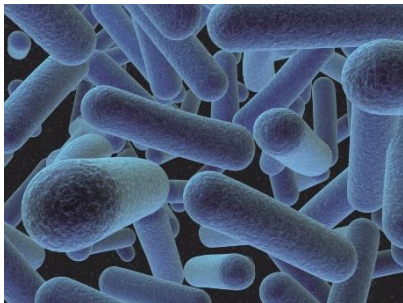
Listeria je krátká tyčinkovitá bakterie, která však může tvořit i vlákna. *Listerie* jsou pohyblivé při kultivační teplotě 20 - 25 °C, ale při teplotě 37 °C se téměř nepohybují. Svě

jméno získala po lékaři, vynálezci desinfekce Josephovi Listerovi (Montville and Matthews, 2008, Klaban, 1999).

Některé druhy Listerií mohou být patogenní. Nejznámější a nejnebezpečnější z nich je *Listeria monocytogenes*. Ta je původcem mnoha nebezpečných onemocnění. Listeriόza je nebezpečná hlavně pro těhotné ženy. Nejnáchylnější je tedy plod a novorozenec. Častá je potratovost, sepse nebo meningitida s úmrtností kolem 24 %.

Listeria se nachází běžně v potravinách, nejvíce byla zaznamenána v drůbežím mase a mořských živočiších (Farber and Perkins, 1991).

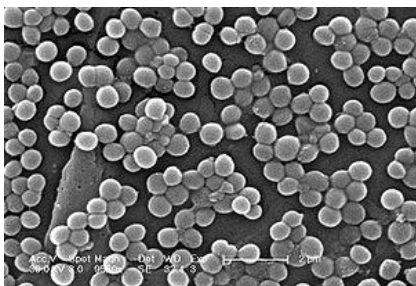
Obr. č. 6: *Listeria*



<http://reinproduct.de/disinfectant2.php?id=27>

3.4.2.2 **Staphylococcus**

Obr. č. 7: *Staphylococcus*



[https://cs.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus#/media/File:MRSA_SEM_7821_lores.jp](https://cs.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus#/media/File:MRSA_SEM_7821_lores.jpg)

g

Staphylococcus jsou nepohyblivé, nesporující koky nacházející se ve shlucích nebo i jednotlivě. Přirozeně se vyskytují v organismu. Nejobvyklejší kolonizační místo je nosní sliznice.

Souvislost mezi *Staphylococem* a alimentárním onemocněním byla poprvé upozorována v roce 1914, kdy bylo zjištěno, že pití kontaminovaného mléka způsobuje zvracení nebo průjmy.

Staphylococcus aureus patří mezi časté příčiny gastroenteritidy. Samotná bakterie nemoc nezpůsobí, za onemocnění jsou zodpovědny toxiny vyprodukované bakterií. Také je příčinou jednou z nejčastějších infekčních chorob u dětí (Montville and Matthews, 2008).

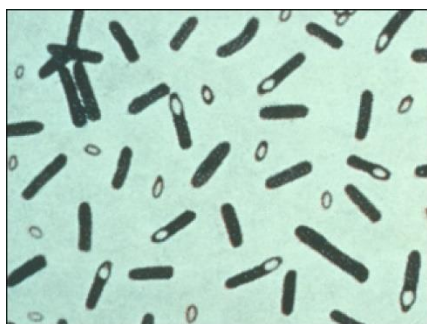
3.4.2.3 Clostridium

Jedná se o rozmanitý rod pohyblivých bakterií tyčinkovitého tvaru. Je pro ně charakteristická tvorba spor. Běžně se vyskytují v půdě, povrchových a odpadních vodách, ale i v trávicím traktu lidí a zvířat. Způsobují řadu alimentárních onemocnění (Klaban, 1999).

Jsou původci botulismu, tetanu, myonekrózy, pseudomembranózní kolitidy atd. Významným druhem je *Clostridium perfringens*, který je schopen se rychle množit a způsobovat potíže při pozření většího množství vegetativních forem této bakterie. Nejčastější nákaza je z masa, nejvíce z drůbeže. Nemoc se projevuje jako křeče v břiše a průjmem (Labbé and Juneja, 2013). Dále je významnou bakterií tohoto rodu *Clostridium botulinum*, což je také velmi nebezpečná bakterie. Způsobuje závažné onemocnění botulismus, tedy neurotoxické působení na lidi i zvířata projevující se obrnou.

Zvířata se nejčastěji nakazí z kontaminovaného krmiva. Lidé se nakazí z napadených potravin (Seyboldt et al., 2015).

Obr. č. 8: *Clostridium*



<http://parasites.czu.cz/food/parasite.php?idParasite=47>

3.4.2.4 Bacillus

Bacillus je sporotvorná tyčinkovitá bakterie. Některé druhy tvoří antibiotika, např.

bacitracin. Zástupci tohoto rodu se nacházejí v půdě a vodě, odkud se spory dostávají do ovzduší.

I tento rod zahrnuje několik patogenních druhů. *Bacillus anthrax* způsobuje anthrax (Klaban, 1999). *Bacillus cereus* je patogen, který se ale neprojevuje intenzivně a problémy samy odezní. Průjmové onemocnění je způsobeno enterotoxiny produkované při vegetativním růstu v tenkém střevě. Růstem v potravinách je produkován emetický toxin. Tento toxin je velmi stabilní.

Nejčastější nákaza je z masa, rýže, těstovin, omáček nebo mléčných výrobků (Montville and Matthews, 2008).

Obr. č. 9: *Bacillus*



<http://www.nyrture.com/blog/2015/5/23/the-subtle-beauty-of-bacillus-subtilis-part-ii>

3.5 Plísně

Neboli vláknité mikroskopické houby jsou rozšířeny po celém světě. Jejich stáří se odhaduje na 300 mil. let, ale lidstvo se s nimi mohlo seznámit až po objevení mikroskopu. Jako plísně jsou označovány eukaryotní vláknité organismy náležející mezi Fungi. Stélku (*thalus*) tvoří hyfy, které jsou buď nepřehrádkované (*Zygomycota*) nebo přehrádkované (*Ascomycota*, *Deuteromycota*). Hyfy plísní tvoří spleť, která je označována jako mycelium. Buňka plísní dále obsahuje jedno nebo více jader. V cytoplazmě se nacházejí mitochondrie, endoplazmatické retikulum, vakuoly, zrníčka polyfosfátů a kapičky tuku (Šilhánková, 2008).

3.5.1 Rozmnožování plísní

Plísně se rozmnožují rozrůstáním hyf a nebo pomocí spor. Spory vznikají buď při nepohlavním rozmnožování, vznikem tzv. vegetativních spor a nebo při pohlavním rozmnožování tzv. spájením. Vegetativní spory jsou tvořeny na vegetativních hyfách nebo

na fruktifikačních orgánech. Spory mohou být umístěny na povrchu, nebo uvnitř orgánů (tzv. exospory, neboli konidie a endospory). Tvar exospor není jednotný, může být kulovitý, válcovitý, elipsoidní, vřetenovitý, spirálovitě stočený apod. Vegetativní spory jsou též děleny podle způsobu tvorby na artrospory, jež vznikají rozpadem vláknem na jednotlivé buňky, blastospory, které se tvoří pučením a konidie, které vznikají ze základní buňky. Pokud je hyfa, která nese konidie odlišná od ostatních hyf, nazýváme ji konidiofor. Endospory, neboli sporangiospory vznikají ve sporangiu. Sporangium má kulovitý, hruškovitý nebo válcovitý tvar a je umístěno na sporangioforu. Pohlavní spory vznikají po spájení dvou buněk. U rodů tříd *Chytridiomycota* a *Oomycota* jsou samčí a samičí orgány morfologicky rozlišeny. Méně rozšířené jsou rody Homothalické. U těchto druhů dochází ke spájení buněk vyrůstajících ze stejné hyfy. Mezi pohlavní spory patří zygospory, askospory, oospory a bazidiospory (Šilhánková, 2008).

3.5.2 Nejvýznamnější plísně

Největším rezervoárem plísní v prostředí je půda, z níž se pak plísně dostávají do vzduchu, převážně na rostlinný materiál nebo na průmyslové předměty uložené ve vlhku (Šilhánková, 2008). Napadají řadu potravinových surovin, krmiv i hotových pokrmů, na nichž způsobují organoleptické změny (Polster, 1971). Pro potravinářský průmysl tvoří velký problém tepelně odolné houby (Montville and Matthews, 2008). V poslední době se objevuje stále větší negativní působení mikroskopických hub, což je dáno vhodnými podmínkami pro růst mikroorganismů a zároveň k tvorbě mykotoxinů. Také je vyšší výskyt spór nebo fragmentů vláken ve vzduchu, což souvisí s klinickými podmínkami (Ostrý, 1998).

3.5.3 Zygomycota

Třída *Zygomycota*, která je charakteristická jednobuněčným nepřehrádkovaným myceliem a pohlavním i nepohlavním rozmnožováním zahrnuje řád *Mucor*. Dál sem patří *Rhizopus*, *Absidia* a další. Zástupci žijí v půdě a způsobují kažení potravin (Sumbali, 2005).

3.5.3.1 Mucor

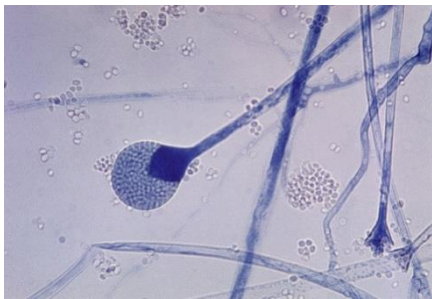
Rod *Mucor*, nazýván česky plíseň hlavičková náleží do řádu Mucorales. Rod zahrnuje přes 100 druhů. Některé druhy mohou být pro člověka patogenní (Sumbali, 2005).

Vytváří světlé i tmavěji zbarvené porosty. Sporangiofory jsou větvené a ukončené

sporangii. Typický límeček vytváří prasklá nebo rozpuštěná stěna sporangia (Klaban, 1999). U *Mucoru* se vyskytuje dimorfismus, tj. za přítomnosti kyslíku se jedná o vláknitou formu a při zaplynování CO₂ se vyskytuje ve formě kvasinkové (Ostrý, 1998).

Mucor se nejčastěji nachází v půdě, přičemž je velmi častým činitelem kažení potravin, ale může být i užitečný. Využívá se např. pro komerční výrobu kyseliny fumarové (Sumbali, 2005). Můžeme ho najít na mase, chlebu, másle, ovoci, zelenině. Tvoří volně vláknitý bělavý porost s kulovitými nahnědlými sporangii (Šilhánková, 2008).

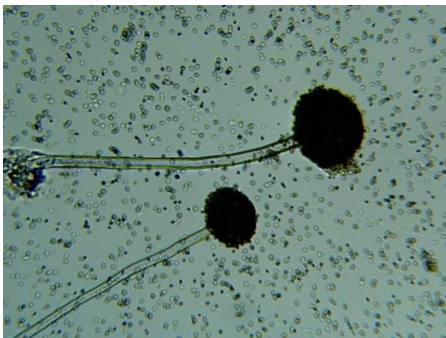
Obr. č. 10: *Mucor*



<https://en.wikipedia.org/wiki/Mucormycosis>

3.5.3.2 *Rhizopus*

Obr. č. 11: *Rhizopus*



<https://worldundermicroscope.wordpress.com/2013/01/17/rhizopus-bread-mold-under-microscope/>

Rod *Rhizopus* je vláknitá mikroskopická houba, jež je podobná *Mucoru*, ale liší se délkou vláken a sporangiofory vyrůstají z hyf po dvou až třech v místech, kde vznikají kořínkovité hnědavé útvary zvané rhizoidy. Tvoří tmavý, černošedý porost. V přírodě je také

velmi rozšířený.

Nejvíce působí kažení ovoce, ale podílí se na znehodnocení i jiných potravin. Některé druhy se používají ke zcukřování a ke zkvašování pro výrobu alkoholických nápojů (Šilhánková, 2008).

3.5.4 Ascomycota

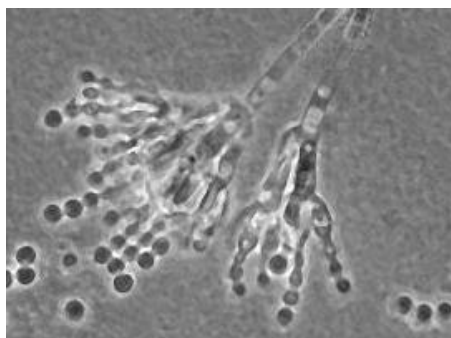
Ascomycota, neboli vřeckovýtrusné je největší třída hub. Název je podle tvorby výtrusů, které vznikají v asku čili vřecku. Její zástupci se nacházejí v půdě, ale i ve sladkých i slaných vodách. Mezi jejich zástupci najdeme známé rostlinné a živočišné patogeny. Do třídy *Ascomycota* řadí Šilhánková (2008) rody *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Botritis*, *Scopulariopsis*, *Bauveria*, *Monilia*, *Stachybotris* a *Aureobasidium*.

3.5.4.1 Penicillium

Jedná se o nejrozšířenější rod z třídy *Ascomycota*, do nějž náleží přibližně 150 druhů (Šilhánková, 2008). Mycelium tvoří přehrádkované, rozvětvené hyfy. Konidiofor je jednoduchý, vzpřímený, dlouhý. Konidie jsou kulovité nebo vejcovité, barvou žlutozelené až modrozelené. Pohlavní rozmnožování u rodu *Penicillium* nenastává (Sumbali, 2005).

Mnoho druhů je velmi rozšířených. Nalezneme je v potravinách, kde způsobují kažení ovoce a zeleniny, ve stavebních materiálech, ve vzduchu nebo např. i v produktech živočišné výroby, jako je hnůj (Frisvad and Samson, 2004). Některé druhy tvoří mykotoxiny, jiné tvoří pro člověka využitelné antibiotické látky (Šilhánková, 2008).

Obr. č. 12: *Penicillium*



http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/kitzmann_step/Classification.htm

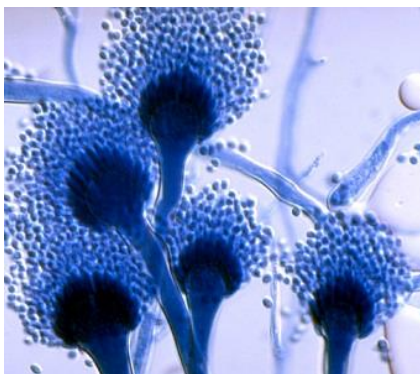
3.5.4.2 *Aspergillus*

Aspergillus je velmi rozšířeným rodem. Jeho hyfy jsou dobře vyvinuté, přehrádkované, bohatě větvené. Konidie jsou typicky kulovité a dobře se šíří větrem. Pohlavní rozmnožování je známo jen u několika málo druhů *Aspergillus*, většina ostatních druhů pravděpodobně ztratila svoji schopnost množit se sexuálně (Sumbali, 2005). U tohoto rodu se hojně vyskytují enzymy, které se používají v potravinářském průmyslu (např. v pivovarnictví, v konzervárenství, pro výrobu organických kyselin nebo při výrobě pracích prášků) (Šilhánková, 2008).

Aspergillus se nachází v půdě, vodě i ovzduší. Rozšířený je po celém světě, ale častější zastoupení má v tropech a subtropích (Klaban, 1999).

Tvoří mykotoxiny, konkrétně aflatoxiny, což jsou látky, které jsou mutagenní a způsobují rakovinu jater (Šilhánková, 2008). Tyto aflatoxiny se našly v řadě potravin a krmiv (v obilninách a výrobcích z nich, v ořechách, v luštěninách, v rybí moučce atd.) (Polster, 1971).

Obr. č. 13: *Aspergillus*



<http://www.blackmould.me.uk/Aspergillus%20toxic%20black%20mould.html>

3.5.4.3 *Fusarium*

Rod *Fusarium* se nachází v půdě, vodě i ovzduší. Mycelium je bohaté, plstnaté a charakteristická je pro ně tvorba dvou typů konidií, mikrokonidií a makrokonidií (Klaban, 1999).

Některé druhy způsobují nemoci rostlin, jako je onemocnění klasů (běloklasost – fuzáriová hniloba klasů), kořenů a pat stébel i odumíráním klíčících rostlin (Parry et al.,

1995). Nepříznivě ovlivňují výnos i kvalitu produkce (Nicholson, et al. 1998). K infekci může docházet kdykoliv během vegetace, pokud je vlhké či deštivé počasí. Jiné produkují toxiny, které mohou vést k vážnému onemocnění člověka. Z potravin napadá mléčné výrobky, obiloviny, jádroviny, jablka, rajčata a brambory (Polster, 1971).

Obr. č. 14: *Fusarium*



<http://fungi.myspecies.info/all-fungi/fusarium>

3.5.4.4 **Cladosporium**

Cladosporium je velmi rozšířený rod. Hyfy jsou přehrádkované a rozvětvené. Tvoří řetízky vícebuněčných blastospor, tj. vzniklé pučením. Jeho zbarvení je tmavé a nachází se na stěnách potravinářských provozoven, ve vinařských a pivovarských sklepích (Šilhánková, 2008). Dále se může vyskytnout v půdě a v potravinách jej můžeme najít ve vejcích, zmraženém mase, skladované zelenině, obilí nebo v tucích (Polster, 1971).

Obr. č. 15: *Cladosporium*



http://www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxid=251826

3.5.5 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity mikroskopických hub. V potravinách jsou významnými negativními toxiny. Způsobují řadu onemocnění a mykotoxikóz u člověka i u hospodářských zvířat. Vliv mykotoxinů je imunosupresivní nebo karcinogenní. Nebezpečí hrozí po požití jednorázových, či opakovaných koncentrací. Dělí se podle mnoha kritérií, např. podle toxicity k cílovým orgánům nebo podle způsobu jejich biosyntézy (Ostrý, 1998). Jedním z nejznámějších příkladů mykotoxinů jsou aflatoxiny, jež se nacházejí v krmivech hospodářských zvířat, na ně působí snížením imunity, fibrózou jater nebo dokonce zhoubnými nádory. Nebezpečné jsou polní plísně (*Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*), kdy jsou přítomny v rostlině již před sklizní. Mezi skladištní plísně patří *Penicillium* či *Aspergillus* (Ostrý, 1996).

3.6 Eliminace mikroorganismů z potravin

Většina potravin je vhodnou půdou pro mikroorganismy, proto se lidé musí proti nim efektivně bránit kombinací různých opatření (Šilhánková, 2008). Musí být dodrženo několik zásad: Stanovení rizikových skupin potravin, identifikace kritických bodů, opatření na snížení rizika, zvyšování informovanosti obyvatelstva.

Stanovení rizikových skupin potravin dle pH a vodní aktivity:

Do 1. skupiny náleží: vodní aktivita větší než 0,95 a pH je vyšší než 5,2 (čerstvé maso, některé masné výrobky, mléko, ovoce, zelenina) Rychlé pomnožování mikroorganismů.

2. skupina: vodní aktivita 0,91-0,95 a pH vyšší než 5. (pasterované masné výrobky, uzená masa, některé sýry, konzervovaná zelenina a ovoce v nálevu apod. Uchovávání do 10 °C stupňů celsia. Pomnožování mikroorganismů je pomalé.

3. skupina pH pod 5,2 a vodní aktivita pod 0,95, nebo při pH pod 5 a vodní aktivita pod 0,90 (fermentované masné výrobky, sušené maso, čokoláda, čaje, tedy výrobky, které je možné uchovávat mimo chlazené prostory). Růst mikroorganismů je zastaven. Pomnožení pouze při zvlhnutí.

Dalším krokem je identifikace kritických bodů. Kritické body se identifikují během výroby, distribuce, skladování, prodeje a konzumace potravin. Pojem kritický bod je technologický úsek výrobního procesu, ve kterém lze výrazně omezit zdravotní nezávadnost potravin. Opatření na snížení rizika znamená např. úprava teploty, pH, vodní aktivity. Nejspolehlivější mikrobiální překážkou je vysoká teplota, kterou nelze však použít pokaždé

a její nevýhodou je změna sensorických vlastností potravin.

Dalším důležitým bodem je zvýšení informovanosti obyvatelstva o možnostech prevence onemocnění je eliminace mikroorganismů z potravin (Steinhauserová, 1998).

Snížení vodní aktivity tedy patří mezi využívané postupy k omezení množství mikroorganismů v potravinách.

4 Materiál a metody

V praktické části bakalářské práce bylo v maloobchodní síti zakoupeno 10 druhů sáčkových ovocných čajů, které byly podrobeny mikrobiologickým rozborům. Všechny čaje byly uchovány v původním obalu až do doby těsně před rozbořem

4.1 Použité vzorky

Vzorek č. 1: LOYD ovocný aromatizovaný porcovaný s šípkem a jablkem

výrobce: Mokate S. A. ul. Katowicka 265a, 43-450 Ustroń, Poland

složení: květ ibišku, šípek 34 %, jablko 22,5 %, aroma, regulátor kyselosti: kyselina jablečná

balení: 20x2 g, sáčky balené samostatně

EXP: 10/2016

Vzorek č. 2: BABIČKA RŮŽENKA citrón se zázvorem

výrobce: Mokate S. A., ul. Katowicka 265a, 43-450 Ustroń, Poland

složení: rooibos 44 % (*aspalanthus linearis*), jablko, pražený kořen čekanky, aroma, kořen

lékořice 5 %, regulátor kyselosti: kyselina jablečná, citrónová kůra 1 %, zázvor 0,5 %

balení: 20x2 g, volně ložené sáčky

EXP: 02/2017

Vzorek č. 3: BABIČKA RŮŽENKA ovocná rozkoš

výrobce: Mokate S. A., ul. Katowicka 265a, 43-450 Ustroń, Poland

složení: květ ibišku, jablko 38,6 %, plody arónie 8 %, plody maliny 4 %, aroma, pomerančová

kůra 2 %, plody ostružiny 2 %, plody šípku 1 %, regulátor kyselosti: kyselina

citrónová, sušená šťáva černého rybízu 0,2 % (maltodextrin, šťáva černého rybízu)

plody borůvky 0,2 %

balení: 20x2 g, volně ložené sáčky

EXP: 02/2017

Vzorek č. 4: PICKWICK mango se zázvorem a limetkou

výrobce: D. E. Master Blenders 1753, P. O. Box 01753, 1000 BT Amsterdam, The Netherlads

složení: kousky jablek, kyseliny (kyselina jablečná, kyselina citrónová), zázvor 6 %, kořen

lékořice, aroma, kořen čekanky, šípek, limetkové oplodí 1 %, mango 0,5 %
balení: 20x2 g, sáčky balené samostatně
EXP: 02/2017

Vzorek č. 5: LOYD borůvky a ostružiny

výrobce: Mokate S. A. ul. Katowicka 265a, 43-450 Ustroń, Poland
složení: květ ibišku, jablko, aroma, malina, kořen lékořice 5 %, ostružina 1 %, borůvka 0,5 %
balení: 20x2 g, volně ložené sáčky
EXP: 12/2016

Vzorek č. 6: ZLATÝ ŠÁLEK

výrobce: D. E. Master Blenders 1753, P. O. Box 01753, 1000 BT Amsterdam, The Netherlands
složení: jablko, ibišek, šípek, černorybízová vláknina, kyselina: kyselina citrónová, aroma,
borůvky 0,5 %, jahody, ostružiny 0,5 %, maliny 0,5 %
balení: 20x1,75 g, volně ložené sáčky
EXP: 1/2016

Vzorek č. 7: TROPICAL FRUIT INFUSION

výrobce: vyrobeno ve více zemích, baleno v Polsku
složení: černý jeřáb, ibišek, jablko, šípky, pomerančová kůra 5 %, regulátor kyselosti: kyselina
citrónová, aroma, listy ostružiníku, citrónová kůra 1 %
balení: 20x2 g, volně ložené sáčky
EXP: 02/2017

Vzorek č. 8: CLEVER ovocný čaj s šípky

výrobce: Mokate S. A. ul. Katowicka 265a, 43-450 Ustroń, Poland
složení: plod šípku 64,5 %, květ ibišku, plod arónie
balení: 20x4 g, volně ložené sáčky
EXP: 10/2016

Vzorek č. 9: TEEKANE strawberry sunrise

výrobce: vyrobeno v EU

složení: ibišek, šípky, jablko, pomerančová kůra, aroma jahod 5 %, bezinky, jahody

balení: 20x2,5 g, sáčky balené samostatně

EXP: 12/2017

Vzorek č. 10: MILFORD Blackberry-Raspberry fruit infusion

výrobce: Milford Tee Austria Gesellschaft m.b.H., 6060 Hall in Tirol, Österreich

složení: ibišek, jablka, pomerančová kůra, šípky, aroma (ostružiny, maliny), listy ostružiníku,

červená řepa, kyselina: kyselina citrónová, ostružiny, maliny, bezinky

balení: 20x2,5 g, sáčky balené samostatně

EXP: 01/2017

4.2 Použitá média

Fyziologický roztok (g/l)

Sůl 8,0

Pepton 1,0

Fyziologický roztok byl před použitím vysterilován.

Standard Plate Count agar APHA (g/l) výrobce: OXOID

Enzymatický hydrolyzát kaseinu 5,0

Kvasničný extrakt 2,5

Glukóza 1,0

Agar 15,0

Bylo naváženo určené množství agaru, který byl rozpuštěn v destilované vodě a následně byl agar sterilován v autoklávu a vytemperován ve vodní lázni na teplotu vhodnou pro použití.

Violet Red Bile Lactose agar VRBL (g/l), výrobce: OXOID

Masový pepton 7,0

Kvasničný extrakt 3,0

Žlučové soli 1,5

Laktóza 10,0

Chlorid sodný 5,0

Agar 12,0
Neutrální červeň 30,0 mg
Krystalová violeť 2,0 mg

Tento agar nebyl sterilován. Před použitím byl rozvařen a následně vytemperován na vhodnou teplotu ve vodní lázni.

Rose Bengal agar RBA (g/l), výrobce: OXOID

mykologický pepton 5,0
glukóza 10,0
fosforečnan di-draselný 1,0
síran hořečnatý 0,5
růže bengálská 0,05
agar 15,5

Příprava agaru pro použití byla totožná jako u Standard Plate Count agaru.

4.3 Postup

Celkem bylo hodnoceno 10 vzorků ovocných sáčkových čajů. Pro zjištění množství mikroorganismů byly použity 2 způsoby ředící řady.

Varianta A: První způsob spočíval ve vysypání obsahu sáčku ovocného čaje do 90 ml fyziologického roztoku při pokojové teplotě.

Varianta B: Druhý způsob odpovídal běžnému způsobu úpravy čaje a spočíval v zalití čajového sáčku 100 ml vroucí vody. U obou variant následovalo promíchání na třepačce a byla asepticky připravena ředící řada.

Následovalo napipetování 1 ml na Petriho misky. Pro každé ředění byly vždy připraveny 2 opakování. Na to navazovalo zalití vybraným médiem a promíchání, aby se obsah rovnoměrně promísil. Pro stanovení CPM byl použit Standard Plate Count agar (APHA). Pro koliformní bakterie byl použit Violet Red Bile Lactose agar (VRBL) a ke stanovení plísní byl použit Rose Bengal agar (RBA). Poté následovala kultivace při dané teplotě a času.

Kultivace probíhala dnem vzhůru v odpovídajících termostatech. Kultivace mikromycet probíhala při teplotě 22 °C po dobu 120 hod. Kultivace celkového počtu mikroorganismů

probíhala při teplotě 30 °C po dobu 48 hod a kultivace koliformních bakterií probíhala při teplotě 37 °C též po dobu 48 hod.

Po dané době kultivace byly spočítané narostlé kolonie tvořící jednotky (KTJ) a výsledky byly přepočteny na 1g vzorku. Mikromycety byly po spočítání určovány na úrovni rodu. (HAMPL, B. a ŠILHÁNKOVÁ, L. 1957)

5 Výsledky

V této bakalářské práci jsme se věnovali mikrobiologické kontaminaci 10 ovocných sáčkových čajů. Pro zjištění počtu mikroorganismů byly použity dvě varianty. Varianta A - ředící řada s fyziologickým roztokem. Varianta B – přelití sáčku vroucí vodou (klasická příprava čaje). V případě plísní jsme se zaměřili i na kvalitativní vyhodnocení jednotlivých vzorků, kde byly jednotlivé plísně určeny na úrovni rodu.

5.1 Celkové počty mikroorganismů

Tab. č. 1: CPM (KTJ/g)

Číslo vzorku	Varianta A	Varianta B
1	7 500	7 500
2	4 130	2 880
3	P	N
4	35 500	1 800
5	480	N
6	168 570	570
7	2 200	300
8	390	30
9	6 000	80
10	2 600	N

Vysvětlivky: N = V daném vzorku nebyla zaznamenána žádná kolonie.

P = Petriho miska přerostlá kolonií plísně rodu *Mucor*

Tabulka č. 1 uvádí celkové počty mikroorganismů u 10 různých čajů. Počty bakterií u varianty A se pohybovaly v řádech 10^2 až 10^5 . Nejméně kolonií bylo napočítáno u vzorku č. 8 Clever ovocný čaj s šípky, konkrétně 390 KTJ/g a nejvyšší počet byl zjištěn u vzorku č. 6 Zlatý šálek, konkrétně 168 570 KTJ/g. U varianty B byly počty kolonií v řádech od 0 do 10^3 .

Velké rozdíly v počtu bakterií byly mezi jednotlivými čaji. Hodnoty narostlých kolonií se pohybovaly v řádech od 0 do 10^5 .

5.2 Koliformní bakterie

Tab. č. 2: koliformní bakterie (KTJ/g)

Číslo vzorku	Varianta A	Varianta B
1	N	N
2	N	N
3	125 + P	N
4	25	N
5	200	N
6	N	N
7	1 225	N
8	N	50
9	P	N
10	P	25

Vysvětlivky: N = V daném vzorku nebyla zaznamenána žádná kolonie.

P = Petriho miska částečně přerostlá kolonií plísně.

Přítomnost koliformních bakterií značí možné fekální znečištění. Z tabulky č. 2 lze vyčíst, že tyto bakterie se objevily ve 4 vzorcích u varianty A. Průměrné počty bakterií se u varianty A pohybovaly v řádech 0 až 10^3 a u varianty B se objevily ve dvou vzorcích v řádech 0 až 10^1 .

Jak je dále z tabulky č. 2 patrné, všechny kontaminované vzorky určené způsobem A byly u varianty B bez těchto bakterií. U varianty B byly tyto bakterie detekovány ve dvou případech.

U některých vzorků se vyskytl porost plísní.

5.3 Mikromycety

Následné tabulky ukazují jak kvantitativní, tak kvalitativní vyhodnocení plísní.

5.3.1 Kvantitativní zastoupení mikromycet

Tab. č. 3: Počty mikromycet v jednotlivých vzorcích (KTJ/g)

Číslo vzorku	Varianta A	Varianta B
1	13	N
2	188	N
3	1 700	N
4	625	N
5	400	N
6	375	N
7	1 300	200
8	13	25
9	100	N
10	175	25

Vysvětlivky: N = V daném vzorku nebyla zaznamenána žádná kolonie.

Z tabulky č. 3 vyplývá zjevný rozdíl v počtu narostlých kolonií mezi použitými variantami přípravy vzorků a i mezi jednotlivými vzorky.

Varianta A, u níž nebyl obsah sáčku spařen vroucí vodou, obsahoval mnohonásobně vyšší množství mikromycet. Průměrné hodnoty se pohybovaly u varianty A v řádech od 10^1 do 10^3 a u varianty B od 0 do 10^2 . Taktéž jsou zřejmé rozdíly v počtu mikromycet mezi jednotlivými čaji, tam se hodnoty pohybovaly od 0 do 10^3 .

U vzorku B bylo prokázáno rapidní snížení velké části počtu detekovaných plísní. V mnoha případech došlo až k úplné likvidaci všech vegetativních forem mikromycet. (Za to může s největší pravděpodobností vystavení letální teplotě při přípravě.)

5.3.2 Kvalitativní zastoupení mikromycet v jednotlivých vzorcích

Následující tabulka č. 4 uvádí rodové zastoupení mikromycet ve vzorcích ovocných čajů. Celkem jich bylo zaznamenáno 7 plus jedna neurčená.

Opět byly rozdíly mezi variantou A a variantou B. U varianty B byly zastoupeny pouze 2 rody.

Taktéž byl rozdíl v rodovém zastoupení mezi jednotlivými variantami. U varianty A byly dominantní rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Cladosporium*. V menším měřítku se objevilo ještě dalších 5 rodů, zatímco u varianty B byly určeny pouze rody *Cladosporium* a *Penicillium*.

Tab. č. 4: jednotlivé rody rody zastoupené ve vzorcích.

Číslo vzorku	Rodové zastoupení mikromycet ve vzorku A	Rodové zastoupení mikromycet ve vzorku B
1	<i>Penicillium</i>	N
2	<i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i> <i>Penicillium</i>	N
3	<i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i> <i>Mucor</i>	N
4	<i>Cladosporium</i> <i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Rhizopus</i>	N
5	<i>Aspergillus</i> neurčená	N
6	<i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i> <i>Mycelia sterilia</i>	N
7	<i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>
8	<i>Aspergillus</i>	<i>Cladosporium</i>
9	<i>Aspergillus</i> <i>Rhizopus</i> <i>Alternaria</i>	N
10	<i>Aspergillus</i> <i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>

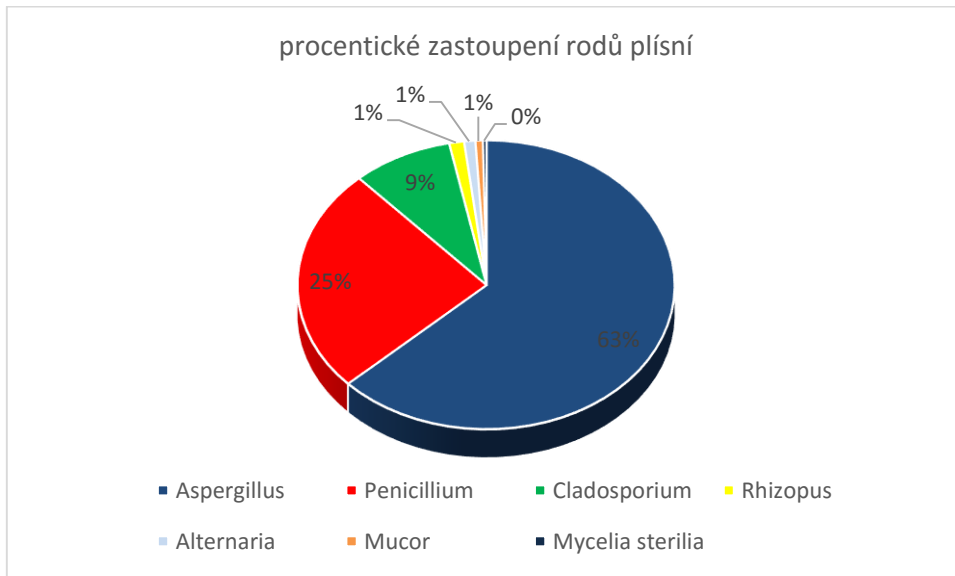
(Hampl, B. a Šilhánková, L. 1957)

Vysvětlivky: Plísňe jsou řazeny sestupně od největšího zastoupení k nejmenšímu.

N = V daném vzorku nebyla zaznamenána žádná kolonie.

Následující graf znázorňuje celkové procentické zastoupení rodů mikromycet společně pro variantu A i B.

Graf č. 1: celkové procentické zastoupení rodů plísní



Z grafu č. 1 plyne, že dominantní zastoupení v ovocných sáčkových čajích měly pouze 3 rody. *Aspergillus*, *Penicillium* a *Cladosporium*. Ostatní rody byly zastoupeny jedním nebo méně procenty.

6 Diskuze

Ovocné čaje patří díky svým vlastnostem (nízká vodní aktivita, nízké pH) do méně rizikových skupin potravin. Nejsou tedy napadány nežádoucími mikroorganismy v takové míře, jako třeba maso nebo čerstvé ovoce. Je však nutné dodržovat hygienické požadavky, aby i přesto nedošlo k napadení patogenními mikroorganismy.

V bakalářské práci byly sledovány celkové počty bakterií v 10 vzorcích ovocných čajů. Konečná a Kalhotka (2009) uvádějí ve 3 testovaných vzorcích hodnoty od 68 do 987 KTJ/g. V této bakalářské práci vyšly celkové počty MO u varianty B od 0 až do 7 500.

U varianty A byly zaznamenány kolonie u všech vzorků a to v podstatně vyšších hodnotách. Počty CPM u varianty A se pohybují od 390 do 168 570.

Nejvyšší hodnota byla detekována u vzorku č. 6 Zlatý šálek a to 168 570 KTJ/g. Koliformní bakterie nebyly u tohoto čaje zaznamenány a i mikromycety se pohybovaly v nižších hodnotách. Následuje vzorek č. 4, kde bylo napočítáno 35 500 KTJ/g. Vysoké hodnoty byly zjištěny ještě u vzorků č. 1 a 9. Konkrétně pak vzorek č. 1 obsahoval 7 500 KTJ/g a vzorek č. 7 6 000 KTJ/g.

Nejnižší napočítaný počet CPM byl u vzorku č. 8. Clever ovocný čaj s šípkou, kde bylo zjištěno 390 KT/g. U tohoto čaje bylo zaznamenáno i nejmenší množství mikromycet ze všech 10 testovaných vzorků. Koliformní bakterie byly pouze u varianty B. Tento čaj tedy vyšel ze všech testovaných na přítomnost mikroorganismů nejlépe.

U vzorku č. 3 se objevil porost plísní v takové míře, že nebylo možné narostlé kolonie mikroorganismů spočítat.

U varianty B, kde byl čaj připraven podle návodu, tedy vzorky byly zality vroucí vodou, byl CPM u většiny vzorků výrazně snížen nebo dokonce nebyl detekován. Žádné narostlé kolonie nebyly zaznamenány u vzorků č. 3, 5 a 10. Ani jeden z těchto vzorků nevykazoval u varianty A vysoké hodnoty CPM. Snížení množství kolonií bylo zaznamenáno u vzorků č. 2, 4, 7, 8 a 9. Výrazně pak u č. 6 z 168 580 na 570 KTJ/g. U vzorku č. 1 zůstal počet kolonií totožný u varianty A i B.

Tyto výsledky se liší od práce Konečné a Kalhotky (2009). Ti po přelití vzorku vroucí vodou zaznamenali u celkového počtu mikroorganismů u každého vzorku narostlé kolonie. Jejich hodnoty se pohybují od 68 do 987 KTJ/g. Zatímco v této práci se počty pohybují od 0 do 7500 KTJ/g.

Z výše uvedených hodnot tedy vyplývá, že CPM se u jednotlivých vzorků výrazně lišil. Souvislosti se složením, způsobem zabalení sáčků ani s výrobcem nebyly zaznamenány.

Přítomnost koliformních bakterií značí možné fekální znečištění. Jejich přítomnost může být patogenní.

Tyto bakterie byly zaznamenány u 4 vzorků u metody A. U vzorku č. 3 Babička Růženka ovocná rozkoš byl jejich počet 125, ale opět zde byl nalezen porost plísní, který mohl bránit většímu nárůstu kolonií. Tento čaj vykazoval abnormální množství plísní, které byly určeny nejen na selektivním médiu, ale i na všeobecném prostředí. Velké zaplísnění mohlo být dáno nejvyšším počtem položek ve složení. Sáčky byly volně ložené, což také mohlo napomoci k pomnožení mikromycet.

Malý počet koliformních bakterií (25 KTJ/g) byl zjištěn u vzorku č. 4. Nejvíce koliformních bakterií obsahoval vzorek č. 7, konkrétně 1225 KTJ/g. Jedná se o čaj Tropical fruit infusion, který má uvedeného jako výrobce více zemí a balen byl v Polsku. Ve složení je nejvíce zastoupen černý jeřáb, který se nenachází v žádném jiném testovaném čaji.

Varianta B obsahovala ve dvou vzorcích malé množství koliformních bakterií. Vzorek č. 8 obsahoval 50 KTJ/g a ve vz. č 10 bylo 25 KTJ/g.

U všech vzorků, kde se u varianty A koliformní bakterie vyskytovaly, nebyly u varianty B zaznamenány a naopak.

Tyto výsledky se liší od práce Konečné a Kalhotky (2009). V této práci je uveden u koliformních bakterií negativní výskyt u všech testovaných vzorků.

Plísně byly vyhodnoceny kvantitativně i kvalitativně. Přítomnost mikromycet je nežádoucí kvůli znehodnocení potravin a také kvůli produkci mykotoxinů, které mohou být patogenní.

Počty mikromycet se u jednotlivých vzorků lišily. Hodnoty se pohybovaly od 10^1 do 10^3 . U varianty B se mikromycety téměř nevyskytovaly, naopak u metody A byly zjištěny v každém vzorku.

Nejvíce mikromycet obsahoval již zmiňovaný vzorek č. 3. Babička Růženka ovocná rozkoš. Množství bylo 1700 KTJ/g. 1300 KTJ/g byl zaznamenán u vzorku č. 7. Tady zalití vroucí vodou nezpůsobilo zničení, ale pouze snížení narostlých kolonií o 1 řád. Hodnoty nad 1000 KTJ/g už nebyly zjištěny u žádného jiného vzorku. Vysoký počet 625 KTJ/g byl ale

zaznamenán u vz. č. 4, který měl také jeden z nejvyšších počtů celkových bakterií a byly u něj zjištěny i koliformní bakterie, i když jen ve velmi malém množství.

Nejmenší počet mikromycet měly vzorky 1 a 8, oba shodně pouhých 13 kolonií. Oba tyto čaje mají ve svém složení ve velké míře zastoupen šípek, který může mít mikrobiostatické vlastnosti. Také mají oba stejnou dobu spotřeby a to do 10/2016, což je jeden z nejbližších dat pro spotřebování výrobku u všech testovaných vzorků. Hrubý (2000) uvádí, že počty mikroorganismů klesají s délkou skladování u sušených potravin, tedy že sušení má bakteriostatické nebo dokonce baktericidní účinky.

U varianty B se mikromycety vyskytly jen u 3 vzorků. Počty plísni byly výrazně sníženy až na vzorek č. 8, kde nastal mírný nárůst oproti variantě A.

Rodové zastoupení mikromycet zahrnovalo celkem 8 plísni včetně jedné neurčené. Dominovaly 3 rody plísni a to *Aspergillus*, *Penicillium* a *Cladosporium*. Ostatní mikromycety byly detekovány jen výjimečně. To se shoduje se studií Tian et al. (2013), kdy ve vybraných vzorcích čajů určili jako dominantní rody *Aspergillus* a *Penicillium*. Tyto rody dominují i v produktech s nízkou vodní aktivitou, senu a slámě, ale i v obilí nebo v píce v práci Kharchenka et al. (1993).

Valík (2004) konstatuje, že přítomnost rodu *Aspergillus* je v potravinách nežádoucí, protože produkuje mykotoxiny. Avšak po dodržení doporučeného postupu přípravy čajů, tedy po zalití sáčku čaje vroucí vodou *Aspergillus* v této práci nefiguruje.

Vzorek č. 4 Pickwick mango se zázvorem a limetkou obsahoval rody *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*. U tohoto vzorku byl zaznamenán porost po větší části Petriho misky, který byl vyhodnocen jako *Rhizopus*, který mohl znemožnit nárůst většího počtu kolonií nebo i jiných rodů mikromycet.

U vzorku č. 5 byl zaznamenán pouze rod *Aspergillus* a blíže neurčená plíseň.

Největší rodové zastoupení mikromycet vykazoval vzorek č. 6, kde kromě rodů *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* byla zjištěna přítomnost *Mycelia Sterilia*.

U vzorku č. 7 dominoval rod *Penicillium*, který se vyskytl i u varianty B. Dále byly přítomny rody *Aspergillus* a *Cladosporium*.

Vzorek č. 8 obsahoval pouze rod *Aspergillus*. U varianty B se zase vyskytl pouze rod *Cladosporium*. Lze předpokládat, že přítomnost rodu *Aspergillus* znemožnila rozvoj rodu *Cladosporium*. *Aspergillus* se vroucí vodou zničil, takže dal prostor pro růst jiných plísni.

U posledního z testovaných vzorků byly přítomny dva rody plísní. *Aspergillus* a *Alternaria*. Při zalití vzorku vroucí vodou byl detekován rod *Cladosporium*.

Z výsledků vyplývá, že většina mikromycet byla vroucí vodou zničena. Některé však mohou přetrvat. Je pravděpodobné, že některé rody z varianty A vytlačují a znemožňují růst jiných rodů. To dokazuje fakt, že u varianty B, pokud se objevil nárůst plísní, šlo většinou o jiný rod, než ve variantě A.

Celkové počty mikroorganismů byly ve sledovaných vzorcích nízké. Variabilita rodového zastoupení také nebyla nikterak vysoká. Rody plísní, které by mohly svými sekundárními metabolity kontaminovat čaje nebyly při správné přípravě čajů zjištěny.

7 Závěr

Bakalářská práce se zabývala mikrobiologickou kontaminací ovocných čajů. Lze konstatovat, že celkový počet mikroorganismů nebyl v takovém množství, aby ohrožoval zdraví lidí.

Množství KTJ/g se u jednotlivých vzorků značně lišilo. Nebyla prokázána žádná souvislost s výrobcem, způsobem balení jednotlivých sáčků ani složením.

Naopak se prokázalo snížení až úplná eliminace mikroorganismů ze vzorků připravených podle varianty B oproti variantě A.

Ve zkoumaných vzorcích se objevilo 8 rodů plísní. Byly tam zastoupeny i mikromycety, jež tvoří mykotoxiny, avšak nevyskytovaly se ve velkém množství a při správné přípravě čajů nebyly zaznamenány.

Celkově dominovaly tři rody mikromycet: *Aspergillus*, *Penicillium* a *Cladosporium*. U přípravy vzorků přelitím sáčku čaje vroucí vodou se vyskytl pouze rod *Cladosporium* a *Penicillium*.

8 Seznam literatury

Farber, J. M., Perkins, P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.* 55 (3). 476–511

Frisvad, J. Ch., Samson, R. A. 2004. *Penicillium* subgenus *Penicillium* - A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology.* 49. 1-173

HAMPL, B., ŠILHÁNKOVÁ, L. 1957. Klíč k určování technicky důležitých plísní. Státní nakladatelství technické literatury. 130 s.

Hrubý, S. 2000. Sušení jako šetrný způsob konzervace. *Výživa a potraviny.* 2. 23

Karpíšková S., Schlegelová J. 2006. Biofilmy: riziko mikrobiální kontaminace potravin. *Veterinářství.* 5. 314-316

Kharchenko, S.N., Latsyshin, A. I., Tea, E. M., Pototskiĭ, N. K., Pavlenko, O. I. 1993. The species composition of the micromycetes in feed and their role in animal kojic acid toxicosis. *Mikrobiologicheskii Zhurnal.* 55 (3). 78-84

Klaban, V. 1999. Svět mikrobů, malý mikrobiologický slovník. Gaudeamus. 303 s. ISBN: 80-7041-639-4

Konečná, H., Kalhotka, L., 2009. Microbial Contamination of Fruit Teas. *MendelNet '09 Agro.* Brno. 481-488.

Kott, V. 1985. Ovocné a zeleninové nápoje. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 205 s. ISBN: 07-073-85

Labbé, R. G., Juneja, V. K. 2013. *Clostridium perfringens* Gastroenteritis. Foodborne Infections and Intoxications 4th Ed. 99-112. ISBN: 978-0-12-416041-5

Main, C. R., Salvitti L. R., Whereat E. B., Coyne K. J. 2015. Community-Level and Species-Specific Associations between Phytoplankton and Particle-Associated *Vibrio Species* in Delaware's Inland Bays. Applied and environmental microbiology. 81 (17).

Meredith, H., Walsh, D., McDowell, D. A., Bolton, D. J. 2013. An investigation of the immediate and storage effects of chemical treatments on *Campylobacter* and sensory characteristics of poultry meat. International Journal of Food Microbiology. 166 (2). 309-315

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

Nataro, P. J., Kaper, B. J. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews. 11 (1). 142-201

Nicholson, P., Simpson, D. R., Weston, G., Rezanoor, H. N., Lees, A. K., Parry, D. W., Joyce, D. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assay. Physiological and Molecular Plant Pathology. 53. 17–37.

Ostrý, V. 1996. Plísňe a mykotoxiny. Náš chov. 8 . 18

Ostrý, V. 1998. Vlákňité mikroskopické houby (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. Státní zdravotní ústav. 20 s. ISBN: 80-7071-102-7

Parry, D. W., Jenkinson, P., Mcleod, L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals- a review. Plant Pathology. 44. 207–238.

Percival, S. L., Williams, D. V. 2014. Microbiology of Waterborne Diseases Edition: 2nd Ed. Elsevier Ltd. p. 696. ISBN: 978-0-12-415846-7

Polster, M. 1971. Toxigenní plísně a mykotoxiny v potravinách. Ústav pro další vzdělávání středních zdravotnických pracovníků v Brně. 84 s.

Rulík, M., Holá, V., Růžička, F., Votava, M. 2011. Mikrobiální biofilmy. Univerzita Palackého. 448 s. ISBN: 978-80-244-2747-8

Seyboldt, C., Discher, S., Jordan, E., Neubauer, H., Jensen, K. C., Campe, A., Kreienbrock, L., Scheu, T., Wichern, A., Gundling, F., DoDuc, P., Fohler, S., Abdulmawjood, A., Klein, G., Hoedemaker, M. 2015. Occurrence of *Clostridium botulinum* neurotoxin in chronic disease of dairy cows. *Veterinary Microbiology*. 177 (3-4). 398-402.

Schindler, J. 2014. Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. 2. vyd. Grada. Praha. 27-35. ISBN: 978-80-247-4771-2.

Steinhauserová, I. 1998. Možnosti eliminace mikroorganismů z potravy. *Výživa a potraviny*. 53. 45

Sumbali, G. 2005. *The Fungi*. Alpha Science International. Harrow. p. 298. ISBN: 1842651536.

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

Tian, J., Zhu, Z., Wu, B., Wang, L., Liu, X. 2013. Bacterial and fungal communities in Pu'er tea samples of different ages. *Journal of food science*. 78 (8). 1249-1256

Valík, L., Görner, F. 2004. Aplikovaná mikrobiológia potravín. Malé centrum. Bratislava. 528 s. ISBN 80-967064-9-7

Veljković, N. J., Pavlović, N. A., Mitić, S. S., Tošić, B. S., Stojanović, S. G., Klič, M. B., Stanković, M. A-D., Stojković, B. M., Mitić, N. M., Bracanović, M. J. 2013. Evaluation of individual phenolic compounds and antioxidant properties of black, green, herbal and fruit tea infusions

consumed in Serbia: spectrophotometrical and electrochemical approaches. *Journal of Food*. 52 (1). 12-24

Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 330/1997 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro čaj, kávu a kávoviny § 1. Ministerstvo zemědělství.

Zychlinsky, A., Prevost, M. C., Sansonetti, P. J. 1992. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*. 358 (6382). 167-169

Richard W. Salmonella. *Salem Press Encyclopedia of Health* [online]. 2016. [cit. 2016-03-14] Dostupné z: <http://eds.b.ebscohost.com.infozdroje.czu.cz/eds/detail/detail?sid=b98a1184-e0b7-4cd7-8ab1-feb923ee1b7e@sessionmgr110&vid=4&hid=117&bdata=Jmxhbmc9Y3Mmc2l0ZT1lZHMtbGl2ZQ==#db=ers&AN=94417120>