

Hodnocení mikrobiální kvality sýrů zrajících pod mazem dle ČSN 56 9609

Bc. Marcela Stratilová Jermářová

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Marcela STRATILOVÁ JERMÁŘOVÁ**
Osobní číslo: **T090270**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Hodnocení mikrobiální kvality sýrů zrajících pod mazem dle ČSN 56 9609**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizujte sýry zrající pod mazem, popište technologii výroby a faktory ovlivňující mikroflóru.
2. Zdokumentujte legislativu související s bezpečností sýrů zrajících pod mazem včetně systému HACCP a RASFF.

II. Praktická část

1. Provedte mikrobiologický rozbor šesti vybraných sýrů zrajících pod mazem od českých výrobců.
2. Vyhodnoťte výsledky dle ČSN 56 9609 a Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny ve znění pozdějších předpisů.
3. Zpracujte údaje o výskytu *Listeria monocytogenes* ve zrajících sýrech dle monitoringu kontrolních orgánů (Státní zemědělská a potravinářská inspekce, Státní veterinární správa, Rapid Alert System for Food and Feed).

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1]KAZUKI, M. Francouzské sýry. 1st ed. Banská Bystrica: Slo-vert, 2007. 288 s. ISBN 978-80-7209-994-8.

[2]E. TOMÁNKOVÁ, V. RADA, J. KILLER. Potravinářská mikrobiologie, ČZU v Praze, Praha, 2006. 168 s., ISBN 80-213-1583-0.

[3]ROBINSON, R. Dairy microbiology handbook : [microbiology of milk and milk products]. 3rd ed. New York : Wiley Interscience, 2002. 765 s. ISBN 0-471-38596-4.

[4]International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Micro-organisms in foods. 2nd ed. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. 763 s. ISBN 0-306-48675-X.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

25. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2011

Ve Zlíně dne 21. března 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Stratilová Jermářová Marcela Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 16.05.2011

Bo. Marcela Jermářová Stratilová

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Tato diplomová práce byla zaměřena na hodnocení výskytu nežádoucích mikroorganismů v sýrech zrajících pod mazem od českých výrobců, zakoupených v tržní síti. Vyhodnocení bylo provedeno dle ČSN 56 9609 a Nařízení Komise a (EP) 2073/2005. U těchto vzorků byly sledovány celkové počty mikroorganismů, koliformní bakterie, koagulázopozitivní stafylokoky, plísně, kvasinky a *Listeria monocytogenes*. Všechny testované vzorky byly vyhodnoceny jako vyhovující. Dále bylo provedeno srovnání výsledků rozborů sýrů zrajících pod mazem provedených dozorovými kontrolními orgány v ČR týkajících se *Listeria monocytogenes* a byla provedena analýza hlášení nebezpečných potravin, mikrobiologických kontaminantů do systému RASFF.

Klíčová slova: ČSN 56 9609, Nařízení Komise a (EP) 2073/2005, sýry zrající pod mazem, *Listeria monocytogenes*, RASFF.

ABSTRACT

This thesis focused on the evaluation of undesirable microorganisms in smear-ripened cheeses from Czech manufacturers, purchased in the market network. The evaluation was performed according to ISO 56 9609 and Commission Regulation (EP) 2073/2005. These samples were observed for total counts of microorganisms, coliform bacteria, coagulase-positive staphylococci, moulds, yeasts and *Listeria monocytogenes*. All tested products were evaluated as suitable. Furthermore, the results of *Listeria monocytogenes* analyses of smear-ripened cheeses performed by the supervisory control institutions in the Czech Republic were compared and an analysis of reports of unsafe food and microbiological contaminants in RASFF was conducted.

Keywords: ČSN 56 9609, Commission Regulation (EP) 2073/2005, smear ripening cheeses, *Listeria monocytogenes*, RASFF.

Chtěla bych poděkovat vedoucí práce Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, věcné připomínky, ochotu, vstřícnost a čas věnovaný při vypracování diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat pracovnícům laboratoří Ústavu technologie a mikrobiologie potravin FT UTB za ochotu a pomoc při vykonání praktické části diplomové práce.

Děkuji všem lidem, kteří mi při studiu pomáhali.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 SÝRY	12
1.1 HISTORIE SÝRŮ	12
1.2 PRODUKCE A SPOTŘEBA SÝRŮ	13
1.3 ROZDĚLENÍ SÝRŮ	15
1.4 SÝRY ZRAJÍCÍ POD MAZEM	15
1.4.1 Technologie výroby.....	16
1.4.2 Mikroflóra zrajících sýrů.....	19
1.4.3 Faktory ovlivňující výskyt mikroorganismů	21
1.4.4 Vady sýrů zrajících pod mazem	24
1.4.5 HACCP (The Hazard Analysis Critical Control Points).....	25
2 LEGISLATIVA	28
2.1 KONTROLNÍ ORGÁNY.....	29
2.2 NAŘÍZENÍ ES 2073/2005	30
2.3 ČSN 56 9609	31
2.4 SYSTÉM RYCHLÉHO VAROVÁNÍ PRO POTRAVINY (RASFF).....	33
II PRAKTICKÁ ČÁST	35
3 CÍL PRÁCE	36
4 MATERIÁL A METODY	37
4.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	37
4.2 CHEMIKÁLIE	38
4.2.1 Kultivační média	38
4.2.2 Konfirmační testy	42
4.2.3 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu	43
4.3 METODY	45
4.3.1 Hodnocené vzorky.....	46
4.3.2 Příprava vzorků	47
4.3.3 Mikrobiologický rozbor	48
4.3.4 Základní konfirmační testy.....	50
4.3.5 Izolace DNA z bakteriálních kultur varem.....	52
4.3.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	52
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	55
5.1 MIKROBIOLOGICKÉ TESTY	55
5.1.1 Experiment 1 a 2	55
5.1.2 Experiment 3	60
5.2 VYHODNOCENÍ KMENŮ IZOLOVANÝCH ZE VZORKŮ.....	62
5.2.1 Konfirmační testy	62

5.2.2	PCR	63
5.3	VZORKY ODEBRANÉ KONTROLNÍMI ORGÁNY	64
5.3.1	Výsledky <i>Listeria monocytogenes</i> SZPI za rok 2007 - 2010	64
5.3.2	Výsledky <i>Listeria monocytogenes</i> SVS za rok 2007 - 2010	65
5.4	VÝSLEDKY HLÁŠENÍ RASFF V ROCE 2005 – 2009.....	66
5.5	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ DOZOROVÝCH ORGÁNŮ A RASFF	70
5.5.1	Dozorové orgány	70
5.5.2	RASFF.....	72
ZÁVĚR		76
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		78
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		87
SEZNAM OBRÁZKŮ		88
SEZNAM TABULEK.....		89
SEZNAM GRAFŮ		90
SEZNAM PŘÍLOH.....		91

ÚVOD

Výživa obyvatelstva a její skladba - obsah živin, vitamínů, minerálních látek, cukrů, bílkovin je základním ukazatelem sledovaným státem a také náplní práce kontrolních orgánů státu. Z tohoto důvodu jsou v ČR nastaveny ochranné systémy RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) a databáze EK CIRCA (Communication Information Resource Centre Administrator) sledující situaci na našem trhu a v Evropské unii. Tyto systémy jsou zaměřeny především na ochranu spotřebitele a produkci bezpečných potravin provozovateli potravinářských podniků, kteří mají zodpovědnost nad vyráběnými potravinami. Protože kvalita potravin, jejich jakost a bezpečnost, tedy míra mikrobiální kontaminace, obsah aditiv, kontaminujících látek, jejich zplodin a produktů má významný vliv na zdravotní stav člověka. Konzumace nekvalitních, zdraví škodlivých potravin má vliv na psychickou pohodu lidí, a v neposlední řadě také na vznik civilizačních chorob.

Podle výživové pyramidy je důležitá konzumace mléčných výrobků. Z nichž je pak významná konzumace sýrů a zvláště přírodních sýrů, které jsou zdrojem látek tělu prospěšných jako je například vápník, bílkoviny nebo vitamíny, ale mohou být i zdrojem možných kontaminujících látek jako jsou mikroorganismy podmíněně patogenní nebo patogenní. Ty mohou být pro člověka nebezpečné a vyvolat některá závažná onemocnění. Z tohoto důvodu je dodržení hygienických podmínek při výrobě potravin, jejich distribuci, prodeji a zároveň cílená kontrola kontrolními orgány základním předpokladem pro uvádění bezpečných potravin na trh. Evropská unie patří mezi významné producenty sýrů a Česká republika mezi spotřebitele s vyšší konzumací sýrů, patřící do první poloviny pětadvacítky EU.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SÝRY

„Ulehni se mnou na zelené listoví: máme zralé ovoce, měkké kaštiny a spoustu čerstvého sýra“ (Vergilius, 4. stol. př. n. l.). Tato myšlenka dokazuje, že sýry byly součástí jídelníčku již v dávných dobách.

1.1 HISTORIE SÝRŮ

První důkazy o sýrech podává Sumerský rukopis z období kolem roku 3000 př. n. l [1]. Ten se zmiňuje o dvaceti druzích čerstvého sýra. Jsou však dohady o tom, kdy byly položeny základy sýrařství. Nejpravděpodobnější teorie předpokládají, že se tak stalo 10 000 let př. n. l. v době zdomácnění ovcí a koz, kde první pastevci začali využívat toho, že kyselé mléko se přirozeně odděluje na syrovátku a pevnou sraženinu. Sraženina po odkapání, vytvárování a vyschnutí poskytla výživnou stravu [2].

Této náhody dokázal člověk využít ve svůj prospěch a naučil se jí využívat vědomě. Začal vyrábět sýr z kyselého mléka. Sýr byl pro staré Řeky důležitým zbožím. Římané dokázali vyrobit sýry fermentované a tvrdé. Pochutnávali si na sýrech, jako byl předchůdce pecorina, parmazánu, předchůdce francouzského cantal nebo švýcarského bergkase. V této době byl výběr sýrů velký, využívali řadu receptů jeho úpravy. Ve středověkých kláštorech, kde znali písmo, se dokonce dochovaly konkrétní recepty [3].

Poslední tajemství výroby sýrů byla odhalena v 19. století. Ferdinand Julius Cohn byl německý biolog, který se zabýval výzkumem bakterií. Je považován za jednoho ze zakladatelů bakteriologie [4]. Ten jako první zjistil, že zrání sýrů způsobují mikroorganismy. Další představitelé jako: Pasteur, Mečnikov, Liebig a Tyndal se zasloužili o znalosti fermentace a očkovacích kultur objasněním procesů podílejících se na výrobě sýrů, včetně hlediska biologických a chemických proměn. Mikrobiologické znalosti ve spojení s technickým know – how inženýrů vedly k zavedení těchto technik do ruční výroby [4].

Z rozsáhlé literatury o sýrech vyplývá, že historie sýrů je velmi bohatá. Významné unikáty s velmi dlouhou tradicí pocházejí jak ze světových velmocí, tak i našeho domácího prostředí. Významnými producenty sýrů zrajících pod mazem, jsou země jako Francie, Německo, ale je třeba zmínit také Českou republiku (ČR) a Olomoucké tvarůžky, jež se pyšní nejslavnější pověstí. Tento sýr se dodnes udržel na trhu jako jediný představitel sýrů domácího původu [5].

Jedním z nejvýznamnějších představitelů francouzských sýrů zrajících pod mazem je měkký sýr Munster, jehož domovem jsou Vogézy, oblast lemující údolí řeky Rýn, na východě Francie. Jeho historie sahá již do roku 660 n.l. [4] a vyrábí se na obou stranách Vogéz pod různými názvy. Na západě v Lotrinsku je známý jako Géromé, kdežto na východě v Alsasku se mu říká Munster. Ve Francii v roce 1978 došlo ke sjednocení sýrů směrnicemi AOC (Appellation d'Origine Contrôlée) [2]. Pečeť AOC představuje sýry s kontrolovaným označením původu, čímž nesou známku kvality [2].

Významným představitelem německých měkkých zrajících sýrů je Limburger. Původně z Belgie pochází Romadur, příbuzný Limburgeru. Je však jeho tučnější a pikantnější variantou. Dalším německým sýrem postříkovaným kulturami červeného mazu je Mainzer Käse vyráběný z kyselého mléka [4].

Z domácí produkce sýrů zrajících pod mazem, je nutné zmínit Olomoucké tvarůžky. První doložená zmínka pochází již z 15. století, v dopisech Karla staršího ze Žerotína psaných manželce. Předpokládá se však, že historie tvarůžků sahá ještě dál. Nejprve výroba probíhala v domácnostech skoro na každém statku v Olomouci, později tento sýr začali vyrábět živnostníci. V Olomouci se konaly největší specializované trhy, kam bylo zboží svázeno výrobci, překupníky a formany. Odtud získaly tvarůžky přívlastek olomoucké. Průmyslová výroba se dostala do Loštic díky povozníkovi Josefu Wesselsovi. V roce 1892 ji převzal syn Alois, který se stal velkovýrobcem, jež dokázal udržet kvalitu a charakteristickou chuť sýra. V tradici pak pokračovaly jeho děti. Dnes vyrábí tvarůžky v Lošticích společnost A.W., spol. s r. o. podle původních receptur a technologií rodiny Wesselsových [6]. Jsou vyváženy do evropských zemí, dokonce i do USA pod ochrannou známkou Echte olmutzer quargel [5]. Tvarůžky byly v červenci 2010, po letitém sporu, který trval od roku 2004 [7], byly zapsány na Úřadu průmyslového vlastnictví do rejstříku chráněných označení původu (CHOP) a označení původu zemědělských produktů a potravin. Dne 1. července 2010 schválil Stálý výbor pro chráněná zeměpisná označení (CHZO) a chráněná označení původu (CHOP) pro zemědělské produkty a potraviny návrh Evropské komise zapsat zeměpisné označení Olomoucké tvarůžky do rejstříku CHZO/CHOP vedeného Evropskou komisí [8].

1.2 PRODUKCE A SPOTŘEBA SÝRŮ

Sýry jsou jedním z nejvýznamnějších produktů mlékárenského průmyslu. Světová produkce sýrů neustále roste. V roce 2004 vzrostla přibližně o 17,8 % oproti roku 1997 a to

z 15,1 mil. tun na 17,8 mil. tun [9]. Spojené státy americké jsou největším výrobcem sýrů na světě. V Americe jsou nejoblíbenějšími sýry mozzarella, čedar a tavené sýry [10]. V Evropské unii vzrostla celková produkce o 11,9 % z 6,5 mil. tun v roce 1997 na 7,2 mil. tun v roce 2004. U sýrů „soft“ tedy měkkých, kam patří sýry: Camembert, Brie, Chaumes, Romadur, tato produkce činila v roce 2004 1,1 mil. tun [11].

Evropská unie představuje další významnou oblast výroby sýrů, kde se vyrobí přibližně 8,5 mil. tun této potraviny ročně. Nejvýznamnějšími výrobci jsou Německo (24,2 %), Francie (22 %), Itálie (12,7 %), Nizozemí (8,8 %) a Polsko (6,5 %). Dalšími významnými výrobci jsou také Argentina, Oceánie nebo Egypt. Okolo 40 % celosvětově vyrobených sýrů pochází z kravského mléka [12].

V ČR bylo v roce 2004 vyrobeno 148,6 tis. tun sýru. Naproti tomu následující rok produkce klesla na 141,2 tis. tun, což je přisuzováno dovozu z EU. Z toho nejvyšší podíl tvořil objem výroby přírodních sýrů 65 %, pak tvarohů 21 % a tavených sýrů 14 %. ČR se podílí na celosvětové produkci přibližně 0,9 %, v rámci EU pak 1,75 %, čímž se řadí na 9 místo pětadvacítky. V ČR jsou sýry vyráběny ve 36 podnicích [13].

USDA (United States Department of Agriculture) uvádí, že průměrná spotřeba sýrů se celosvětově ztrojnásobila v letech 1970 a 2003, a to z 11 liber (4,5 kg) na 31 liber (14,1 kg) na osobu [10]. V roce 2004 v USA a Kanadě činila spotřeba sýrů 4,7 mil. tun, v EU 8,5 mil. tun [14]. Prvenství v konzumaci sýrů v EU patří Řekům s konzumací 28 kg sýra/osobu/rok [15], následují Francouzi s 25 kg sýra/osobu/rok [13] a další západoevropské země. Spotřeba sýrů v EU činí 19 kg sýra/osobu/rok [15].

Celková spotřeba sýrů v ČR v roce 2004 činila přibližně 0,1 mil. tun., tj. 12,0 kg/osobu/rok, z toho se konzumovalo 9,4 kg/osoba/rok přírodních sýrů a 2,6 kg/osoba/rok tavených sýrů. Z přírodních měkkých sýrů činila spotřeba 2,1 kg/osobu/rok, u tvrdých sýrů 5,7 kg/osobu/rok [16]. Nejvyšší byla spotřeba tvrdých sýrů 6,6 kg kg/osobu/rok v roce 2008, u přírodních sýrů měkkých spotřeba vzrostla na 2,3 kg/osoba/rok. Od roku 2000, kdy činila spotřeba měkkých sýrů 1,6 kg /osobu/rok, tato spotřeba rostla, až na 2,3 kg sýra/osoba/rok v roce 2008, tj. nárůst o 30,4 % [16].

V případě celosvětových prognóz spotřeby sýrů, odborníci předpokládají nárůst spotřeby až 20 % oproti roku 2008. V roce 2015 by se spotřeba tedy mohla dostat až na 21 mil. tun.

Důvodem tohoto růstu je zlepšující se životní úroveň, sílící důvěra spotřebitelů a rostoucí přijetí západního stylu v potravinářství a to ve všech asijských a rozvojových zemích [10].

Odborníci odhadují nárůst spotřeby sýrů i u nás, mohla by se ustálit se na úrovni 17 až 18 kg na osobu, čímž bychom se dostali na průměrnou roční spotřebu evropské pětadvacítky [15, 16].

1.3 ROZDĚLENÍ SÝRŮ

Sýry lze rozdělit podle mnoha hledisek. Podle typu mléka: kravské, kozí, ovčí, kobyli, oslí, lamí, velbloudí, a dále podle tepelného ošetření mléka na sýry z pasterovaného a nepasterovaného mléka. Podle tvrdosti (konzistence) sýra, obsahu sušiny a vody: čerstvé, měkké, polotvrdé, tvrdé. Podle obsahu tuku v sušině: vysokotučný, plnotučný, polotučný, nízkotučný, odtučněný. Podle technologie výroby: sladké, kyselé a tavené [2, 17, 18].

Podle národní legislativy [19] jsou sýry děleny do skupin a podskupin následovně:

1. přírodní;
 - nezrající, termizované
 - zrající, zrající pod mazem, zrající v celé hmotě, zrající na povrchu, s plísní uvnitř hmoty, dvouplísňové, v solném nálevu, bílý
 - extra tvrdý (ke strouhání), tvrdý, polotvrdý, poloměkký, měkký
2. tavené;
 - nízkotučné a vysokotučné
3. syrovátkové.

1.4 SÝRY ZRAJÍCÍ POD MAZEM

Tato skupina sýrů má měkkou sýřeninu s omyvatelnou kůrou, jejich povrch se několikrát omývá startovací kulturou a solankou. Tyto sýry se vyznačují významnými mikrobiálními změnami sýrového těsta, způsobující jejich charakteristickou vůni a chuť. Tyto proteolytické reakce jsou způsobeny bakteriemi, které se pomnožují na povrchu těsta a tvoří typickou oranžovočervenou barvu [5, 20]. Sýry zrající pod mazem jsou vyráběny enzymatickým srážením sladkého mléka (tzv. sladké sýry) s následným technologickým postupem dle

druhu sýra, českými zástupci jsou Romadur, Romadůžek, Hermadur a Pepin. Druhým způsobem výroby je samovolné kysnutí mléka a jeho srážení za vzniku tvarohu a syrovátky, který se dále zpracovává pro výrobu tzv. kyselých sýrů, kde hlavním českým zástupcem jsou Olomoucké tvarůžky [20]. Ze světových zástupců můžeme jmenovat: Munster, Herve, Maroilles, Livarot a Limburger [2].

1.4.1 Technologie výroby

A) Sladké srážení mléka

Romadur

Výroba tohoto druhu sýra probíhá ve třech fázích:

1. Bakterie mezofilní kyslové kultury druhu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *cremoris* zajišťují kysání těsta. Kysání probíhá několik hodin při teplotě 20 °C. Doba kysání je velmi důležitá, aby nedošlo k nadměrnému kysání, čímž by nedošlo k množení proteolytických mikroorganismů. Při tomto procesu dochází vlivem kyslové kultury ke snížení pH vhodného pro dokonalé vysrážení kaseinu vlivem enzymů syřidla [20]. Syření probíhá po dobu 30 – 50 minut, poměr srážení a vylučování syrovátky má být 1:1. Proveďte se formování ve vaničkách nebo koagulatoru, kdy se na pás dopravuje rozkrájené zrno a zároveň je zajištěno odkapávání syrovátky. Dochází ke spojení hmoty vlastní vahou a následně krájecí nože určují tvar sýru. Relativní vlhkost prostředí je zajištěna na 90 %, provede se nasolení a mlhový postřík kulturou kvasinek [18].
2. Fáze masivního nárůstu kvasinek *Candida vini*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* a plísně *Geotrichum candidum*. Rozvoj kvasinek probíhá při 20 °C po dobu 3 - 6 dnů. Kvasinky svou činností rozkládají kyselinu mléčnou [20], za současného zvýšení pH z hodnot pH 4,8 – 5,0 až na hodnoty neutrální oblasti [18], tím kvasinky připraví vhodné prostředí pro proteolytické bakterie třetí fáze [20], ale zároveň zabraňují rozvoji nežádoucích plísní [18].
3. Zde probíhá rozvoj aerobních mikroorganismů druhu *Brevibacterium linens* a *Micrococcus*, díky kterým je na povrchu sýra vytvořen oranžový maz. Současně probíhá rozklad bílkovin a tím vzniká typické aroma sýra [20]. Teplota je ve třetí fázi 14 – 16 °C, relativní vlhkost vzduchu 95% a doba zrání 10 – 14 dní [18] až do

dozrání sýra. Při této fázi je důležité dodržet dostatečnou vlhkost vzduchu pro rozvoj bakterií, tj. musí probíhat při 90 – 95 % relativní vlhkosti prostředí [20]. Tyto procesy probíhají v komorách, kde je zajištěno optimální proudění vzduchu, teplota a vlhkost prostředí.

Hermadur

Tento výrobek je produktem společnosti Pribina spol. s r.o., provozovna Hesov, Přibyslav. Jedná se o nový výrobek, vyráběným jen několik let, jehož technologie je chráněna výrobem. V literatuře výroba tohoto výrobku zatím není popsána.

Pepin

Tento zrající sýr je výrobkem společnosti Povltavské mlékárny, provozovny v Sedlčanech. Základem pro výrobu je tepelně ošetřené mléko pasterací s přidavkem mezofilních kyselinotvorných kultur, kdy probíhá zrání tzv. 1. macerace při teplotě 10 – 14 °C po dobu 12 – 20 hodin. Následující den se provede opět pasterace a následně jsou přidány další mezofilní a termofilní kultury, kvasinky rodu *Kluyveromyces*, bakterie *Staphylococcus xylosum*, *Brevibacterium* a mikroorganismy *Geotrichum*, čímž probíhá 2. macerace, za současného přidání CaCl_2 z důvodu podpory srážení při sýření. Po této maceraci, probíhající při teplotě 35 – 38 °C po dobu 30-60 minut, je přidáno syřidlo a mléko se sráží za vzniku gelu. Ten se krájí a z kostiček sýřeniny se odděluje syrovátka. Následně probíhá míchání po dobu 15 – 40 minut, sýřenina se plní do forem a odkapává v odkapních sálech 24 hodin, při teplotě 32 – 16 °C a relativní vlhkosti přibližně 98 % [21].

Následně se sýry vyklopí z forem, provede se nasolení a sýry se uskladňují do zracích sklepů.

Zrání probíhá ve dvou fázích:

1. Kvasinková fáze zrání - jejímž cílem je připravit povrch sýra pro rozvoj bakteriální mikroflóry, probíhající při teplotě 14 – 20 °C,
2. Bakteriální fáze zrání – probíhající při teplotě pod 13 °C.

Během zrání se sýry několikrát strojově omývají (kartáčují) pomocí omývacího roztoku složeného ze soli, barviva a kultury. Sýry jsou následně baleny a expedovány [21].

Romadůžek

Tento zrající sýr je rovněž výrobkem Povltavské mlékárny, provozovny Sedlčany.

Technologie výroby je obdobná výrobku Pepin. Oproti technologii výrobku Pepinu je rozdíl ve druhé maceraci, kdy nejsou přidávány mezofilní kultury a standardizované mléko obsahuje více tuku. V Romadůžku jsou dodány silnější kvasinky *Debaryomyces hansenii* místo *Kluyveromyces*. Zrání probíhá při vyšších teplotách, čímž je silnější. Vliv na zrání má i tvar Romadůžku, což je kolečko s dírkou uprostřed. Romadůžek tak má větší povrch a dochází k masivnějšímu rozvoji povrchové zrací kultury [21].

B) Kyselé srážení tvarohu

Olomoucké tvarůžky

Výroba Olomouckých tvarůžků probíhá podle tradic a zavedeném technologickém postupu, dle získaných poznatků a zkušeností, který se nemění. Výchozí surovinou pro výrobu tvarůžků je průmyslový tvaroh, vyrobený samovolným kysáním mléka [22]. Tento tvaroh má vysokou kyselost 120 °SH (dle Soxhlet-Henkela) [20].

Výroba tvarůžků:

1. příprava suroviny

Průmyslový tvaroh se drtí [7] smíchá s kuchyňskou solí v množství 4,0 % až 4,5 % [18] a skladuje v zásobnících [7] 1 – 2 týdny, kdy dochází k rozložení soli a nastává fyzikálně chemické zrání, díky kterému získává tvaroh tuhou konzistenci [22]. Takto připravená hmota se mísí s uhličitanem vápenatým a sodným, které působí na kyselinu mléčnou a bílkoviny. Uhličitan vápenatý vyvolává tuhou a pevnou konzistenci, uhličitan sodný způsobují měkkou až roztékavou konzistenci. Poměr těchto solí se mění dle ročního období [22].

2. vlastní výroba

Tvaroh s přísadami, kulturními mikroorganismy se pomele a formuje na formovacím stroji dle požadovaného tvaru, které se ukládají na podložky a přesunou do zracích místností [7]. Zrání probíhá při 20 °C po dobu 2 – 4 dnů, kdy dochází k rozvoji kvasinkové kultury *Candida* a *Torulopsis* [18]. Kvasinky oxidují nadbytečnou kyselinu mléčnou, čímž stoupá pH z kyselé do neutrální oblasti [18, 20]. Následuje omývání tvarůžeky se odstraní tzv. Křís a ponrchová mikroflóra [18]. Následuje zrání při relativní vlhkosti 80 – 90 % , při teplotě 15 – 20 °C po dobu 4 – 8 dnů. Při této fázi zrání dochází k masivnímu rozvoji kulturní proteolytické bakterie *Brevibacterium linens* a probíhá proteolýza. Dochází k prozrávání tvarůžků

směrem dovnitř probíhá působením difundujících enzymů povrchové mikroflóry, doprovázené žádoucími biochemické změny [18]. Zároveň se tvoří oranžový maz a sýry získávají charakteristickou vůni a chuť [7, 18, 20, 22].

Takto dozrálé tvarůžky se balí a zabalené dozrávají v chladu a vlhku. Následně jsou expedovány [22]. Olomoucké tvarůžky mají tvar koleček, kroužků, tyčinek, o hmotnosti 20 – 30 g nebo tvar kousků [7].

1.4.2 Mikroflóra zrajících sýrů

Mikroflóru sýrů lze rozdělit na žádoucí a nežádoucí. Mezi žádoucí mikroorganismy řadíme: mezofilní a termofilní zákysové kultury, kulturní druhy bakterií, kvasinek a plísní. Mezofilní zákysové kultury jsou *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*. Termofilní zákysové kultury jsou *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbruecki* ssp. *laris*, *Lactobacillus helveticus* [23].

U sýrů zrajících pod mazem jsou významné:

1. bakterie – *Brevibacterium linens* (Obr. 1), *Staphylococcus xylosus*, rod *Micrococcus*,
2. kvasinky – rod *Kluyveromyces*, *Debaryomyces hansenii*, *Torulopsis*, druhy *Candida vini*, *C. krusei*, *C. lipolytica* [20],
3. plísně – *Geotrichum candidum* [23].



Obr. 1. *Brevibacterium linens* [24].

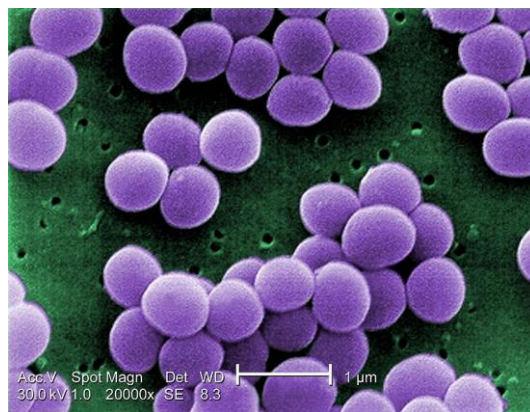
Mezi významné nežádoucí mikroorganismy sýrů patří verocytotoxin produkující *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. [25, 26, 27], *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Shigella* spp., *Clostridium butyricum*, *Campylobacter jejuni*, [25].

Listeria monocytogenes (Obr. 2) je patogenem schopným růst v širokém teplotním rozmezí včetně chladničkových teplot [25]. Způsobuje závažné a často smrtelné onemocnění - listeriózu. U těhotných žen způsobuje potraty, dále postihuje batolata, oslabené nebo starší jedince, může způsobit meningitidu. U zdravých jedinců má toto onemocnění lehký průběh, obdobný chřipce [28].



Obr. 2. *Listeria monocytogenes* [29].

Staphylococcus aureus (Obr. 3) je grampozitivní bakterie produkující termostabilní toxin, který způsobuje otravy z poživatin. Nejčastějším zdrojem je člověk a hnisavé záněty v krku, na ruce, kůži a nosu. Ke kontaminaci potravin může dojít během výroby nebo distribuce, vzduchem nebo přímým dotykem. Za vhodných podmínek se enteropatogenní stafylokoky mohou pomnožit a vyprodukovat toxiny [28].



Obr. 3. *Staphylococcus aureus* [30].

1.4.3 Faktory ovlivňující výskyt mikroorganismů

Faktory ovlivňující výskyt mikroorganismů lze rozdělit na vnitřní a vnější.

Vnější faktory: relativní vlhkost prostředí, teplota skladování, výskyt a koncentrace plynů, výskyt a aktivita mikroorganismů [20].

Relativní vlhkost prostředí

Vlhkost je významným faktorem hlavně v době zrání sýrů, kdy je nutno dodržet stanovenou výši vzdušné vlhkosti, dle technologie výroby a vyráběného druhu sýra. Při nedodržení těchto kritérií může dojít k vadám sýrů. U hotových výrobků je významná ochrana sýrů vhodnými obaly, balení do ochranných folií nebo použití inertní atmosféry. Ochranné folie mají zásadní význam. V případě netěsnosti obalů může docházet k pronikání plísní a jejich spor do sýrů, kde se mohou množit. Především jsou to druhy méně náročné na potřebu kyslíku jako rod *Penicillium* s produkcí modré plísně a rod *Cladosporium* s plísní černou. Sladké zrající sýry mohou být napadány plísněmi rodu *Penicillium*, dále bakteriemi rodu *Proteus*, jejichž působením vzniká tzv. rakovina kůry. Významnými kontaminanty sýrů zrajících pod mazem jsou nekulturní rody plísní *Penicillium* [20]. Na povrchu sýrů s nadměrnou vlhkostí se množí kvasinky. Nejčastější rody kvasinek způsobující kontaminaci jsou *Yarrowia*, *Candida*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces* a *Pichia*. Častým zdrojem bývají solné lázně [20]. U tvarůžků může dojít při brzkém vzduchotěsném zabalení k tvarohovitosti značící nezralý výrobek. Tvarohovitost může vzniknout také v případě, že povrch tvarůžků vyschne a mikroorganismy zastaví svoji činnost [23].

Teplota skladování

Při nedodržení teplotních podmínek technologického procesu může dojít u sýrů zrajících pod mazem k jejich roztékání, způsobené buď nízkou teplotou při sýření, zamezením odtoku syrovátky nebo naopak vysokou teplotou při zrání těchto sýrů [23]. Pro růst nežádoucích mikroorganismů je typické široké teplotní rozmezí. Z tohoto důvodu je důležité zajistit takové podmínky při výrobě a skladování, které jsou nevhodné pro jejich množení [20]. Největší význam mají mezofilní (optimum růstu při teplotě 20 – 30 °C) a psychrotrofní mikroorganismy (schopné růst při teplotě 7 °C). Při zvýšené skladovací teplotě hotových tvarůžků může dojít k pomnožení bakterií *Bacillus cereus* a *B. subtilis* a následnému roztékání tvarůžků [23]. Ze zástupců psychrotrofních mikroorganismů způsobujících kažení mléčných výrobků jsou to především bakteriální rody *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Flavo-*

bacterium, *Vibrio*, *Acinetobacter* a další. Z kvasinek jsou to rody *Candida*, *Rhodotorula* a *Saccharomyces*, z plísní to mohou být rody *Mucor*, *Penicillium*, *Botrytis*, *Rhizopus* a další. Z termofilních mikroorganismů jsou z potravinářského hlediska významnými zástupci sporulující bakterie *Bacillus* a *Clostridium* [20]. Za optimální teplotu skladování sýrů zrajících pod mazem je považována teplota chladírenská. *Listeria monocytogenes* je schopna růst v rozmezí 0 – 44 °C, tedy i za chladírenských teplot, s optimem růstu 37 °C [25]. Tato bakterie byla izolována z podpovrchových vrstev sýrů Romadur, Olomoucké tvarůžky a Camembert [18].

Výskyt a koncentrace plynů

Pro rozvoj mikroorganismů je významný obsah plynů v atmosféře, především obsah kyslíku. Tento parametr lze ovlivnit vhodným obalem potraviny, řízením atmosféry s optimálním složením plynů, nebo vakuovým balením [20].

Výskyt a aktivita mikroorganismů

Jedná se o mikroorganismy, mající schopnost produkovat látky působící na jiné mikroorganismy protichůdně. Těmito látkami jsou bakteriociny, antibiotika, organické kyseliny a peroxid vodíku. Platí zde, že přirozená mikroflóra potlačuje růst mikroflóry patogenní. Ta však musí být početnější a skupiny nesmí být blízce příbuzné. Tyto kultury inhibují růst např. salmonel a listerií. Z těchto kultur jsou významné bakterie mléčného kvašení (BMK), produkující bakteriociny (nisin), diacetyl, H₂O₂, způsobující pokles pH a úbytek živin [20]. Nisin je přírodním antibiotikem, významným při působení na bakterii *Listeria monocytogenes*, mající vysokou antibakteriální aktivitu a zároveň nemá příznivý účinek na člověka. Jedná se o protein produkovaný bakterií *Lactococcus lactis* [31]. Je tedy zároveň konzervantem, dle platné legislativy označen E234 a v příloze č. 6 tabulka 5 vyhlášky č. 4/2008 Sb., lze tuto přídatnou látku přidávat do zrajících a tavených sýrů ve stanoveném maximálním množství [32].

Vnitřní faktory: vodní aktivita, obsah soli, aerobní nebo anaerobní podmínky, pH a redox potenciál [20, 33].

Vodní aktivita a obsah soli

Mikroorganismy potřebují pro svoji činnost dostatečné množství volné vody, tedy vody v okolním prostředí. V případě jejího nedostatku dochází ke ztrátě vody vázané a tím

ke zpomalení, zastavení činnosti jejich buněk. Využitelnost vody mikroorganismy je vyjadřována jako vodní aktivita (a_w) neboli voda dostupná pro mikroorganismy.

Hodnota a_w optimální pro růst bakterií činí 0,99 – 0,91, avšak halofilní bakterie, které rostou i v prostředí s obsahem chloridu sodného vyšším než 15 %, se množí v prostředí, jehož a_w dosahuje hodnot okolo 0,75 [20]. Vodní aktivita sýrů dosahuje hodnot 0,98 – 0,91 [34].

pH

Koncentrace vodíkových iontů v prostředí ovlivňuje biologickou aktivitu mikroorganismů. Všechny mikroorganismy jsou schopny růst v určitém rozmezí pH. Optimum růstu pro bakterie je většinou v neutrální oblasti pH nebo slabě kyselé. Výjimkou jsou bakterie, jejichž hlavním produktem metabolismu jsou kyseliny, především BMK. Kvasinky rostou optimálně při mírně kyselém pH a jsou schopny upravovat méně vhodné prostředí, k dosažení optimálního pH, a to produkcí hlavního metabolitu etanolu a glycerolu v poměru, který je příznivý pro zajištění optimálního pH. Jsou-li hodnoty pH nižší než je optimum daného druhu, dochází k omezení vývoje. Pro prostředí a jeho pH má vliv na vegetativní buňky, ale i na spory. Kyselé pH zabraňuje vyklíčení spor rodů *Bacillus* a *Clostridium* a k jejich přeměně na vegetativní buňky [20]. Optimum růstu pH pro kvasinky je v rozmezí 1,5 – 8,5; pro BMK 3,2 – 10,5; *Staphylococcus aureus* 4,0 – 9,7; *Salmonella* sp. 4,1 – 9,0 [35].

Prostředí potravin a jeho hodnota pH ovlivňuje funkci enzymů daného mikroorganismu, ale také transport živin do buňky. Při hodnotách pH mimo optimum se prodlužuje lag fáze růstu, čímž se prodlužuje doba přizpůsobování mikroorganismu a fáze intenzivního růstu se opožďuje [20]. Hodnota pH u hotových výrobků sýrů je 4,9 – 5,9 [35]. U sýrů zrajících pod mazem má pH velký význam, v jednotlivých krocích technologického procesu, kdy se hodnota pH mění z důvodu navazujících kroků dle použitých mikroorganismů. V první fázi vzniká působením zákysové kultury kyselina mléčná, která sníží pH. Ve druhé fázi nastupují kvasinky, které naopak svou činností hodnotu pH zvýší až do neutrální oblasti [18], kdy mohou ve třetí fázi nastoupit proteolytické bakterie. Při nedodržení jednotlivých hodnot pH, by byl znemožněn rozvoj proteolytických bakterií a naopak umožněn rozvoj nežádoucích mikroorganismů [20].

Redox potenciál

Oxidačně-redukční potenciál prostředí potravin ovlivňuje růst a vývoj mikroorganismů. Při oxidaci dochází ke ztrátě elektronů naopak při redukci k jejich příjmu. Oxidačními činnidly jsou kyslík, železité ionty peroxidy, redukčními ionty železnaté, vodík a další. Hodnota redox potenciálu prostředí (měří se v mV) udává schopnost látek odevzdávat nebo přijímat elektrony. Pozitivní redox potenciál poskytují silná oxidační činidla a naopak.

Aerobní mikroorganismy potřebují pro svůj růst kyslík, tj. vysoký redox potenciál. Fakultativně anaerobní mikroorganismy jsou schopny růst za přítomnosti kyslíku i bez jeho přístupu, mají pozitivní i negativní redox potenciál. Například hodnota redox potenciálu druhu *Staphylococcus aureus* je -200 až +200, toxiny je však schopen tvořit jen v aerobním prostředí. Anaerobní mikroorganismy rostou bez přístupu kyslíku, mají záporný redox potenciál [20].

Hodnota redox potenciálu zralých sýrů činí -100 mV [35], což je hodnota vhodná pro růst kulturních mikroorganismů přítomných v sýrech.

1.4.4 Vady sýrů zrajících pod mazem

Vstupní, prvotní surovinou při výrobě sýrů zrajících pod mazem je mléko. Základním faktorem ovlivňující mikrobiální kažení sýrů je mikrobiální kvalita použitého syrového mléka pro výrobu. Například termostabilní zástupci rodů *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Micrococcus* a *Streptococcus* mohou přežít tepelné ošetření mléka a růst v některých produktech sýrů [36]. Z uvedeného vyplývá, že počáteční ošetření mléka je základním předpokladem pro výrobu nezávadné potravin.

Při vlastní výrobě sýrů mohou vzniknout vady způsobené použitím nevhodné suroviny, nedodržením technologie výroby a hygienických požadavků v průběhu výroby.

Sýry vyrobené kyselým srážením mléka

- Časné duření – nedodržením technologie výroby, došlo k pomnožení plynotvorných koliformních bakterií.
- Křidovité a pískovité sýry – poruchy zrání a vysoká kyselost suroviny.

- Roztékání sýrů – nízká teplota při sýření, zamezení odtékání syrovátky, slabé přesolení sýrů, vysoká teplota zracích prostor nebo vysoká relativní vlhkost zracích místností.
- Hořká chuť – slabě odkapané sýry, napřed jsou překyselené potom zhořknou.
- Bílý potom žlutý maz – přílišné zchlazení při prosolování nebo zrání.

Při nedodržení technologických postupů může dojít ke kontaminaci mikroorganismy *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* a toxinogenní stafylokoky [23].

Kyselé sýry

- Roztékání tvarůžků – aerobními sporulujícími bakteriemi *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* nebo pomnožením plísní *Geotrichum candidum*.
- Bílá mazovitost tvarohu – při vysoké vlhkosti, kdy dochází k uvolňování volné vody a současnému zrání při nízkých teplotách.
- Černání tvarůžků – vysoký obsah železa a mědi v surovině
- Tvarohovitost tvarůžků – nezralý výrobek, příliš brzo a vzduchotěsně zabalené, nebo povrch tvarůžků vyschne a mikroflóra nemůže růst [23].
- Hořká chuť tvarůžků – nesprávné zrání spojené s jejich roztékáním, působením bakterie *Bacillus cereus* a jiných [20, 23].
- Zatuchlá chuť – nedostatečný přístup vzduchu při sušení tvarůžků nebo silným pomnožením plísní *Geotrichum candidum* [23].
- Hnilobná chuť – v případě použití tvarohu dlouho skladovaného, který byl kontaminován bakteriemi *Clostridium sporogenes* a *Proteus vulgaris* [20].

1.4.5 HACCP (The Hazard Analysis Critical Control Points).

Základním požadavkem celého potravinového řetězce je bezpečnost potravin. Každý článek řetězce je zodpovědný za produkci nezávadných potravin. Tato povinnost provozovatelů potravinářského podniku je ošetřena legislativou, konkrétně zákonem č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících předpisů, ve znění pozdějších předpisů. Ve zmiňovaném zákoně jsou stanoveny povinnosti provozovatelů potravinářského při výrobě potravin a uvádění potravin do oběhu [37].

Od vstupu České republiky do Evropské unie jsou provozovatelé potravinářských podniků ČR povinni dodržovat předpisy Evropské unie. Zde je tato problematika ošetřena Nařízením Evropského parlamentu (EP) a Rady (ES) č. 852/2004 o hygieně potravin, ve znění pozdějších předpisů [38]. Výrobci potravin mají za úkol vyrobit a uvádět na trh potravinu bezpečně dle Nařízení Komise ES 178/2002, o bezpečnosti potravin. K tomuto účelu slouží systém HACCP, zaváděný prvovýrobci, přes výrobce potravin, distribuční síť, jako ochrana bezpečnosti potravin až ke spotřebiteli.

System HACCP byl vyvinut v r. 1971 jako součást programu zabezpečujícího výživu kosmonautů [20]. System je okamžitý, jelikož zdravotní a jakostní nedostatky jsou odhalovány okamžitě po jejich vzniku a následně již ve výrobě odstraňovány. System je zároveň souhrnný zahrnující výrobní postup, včetně jednotlivých úseků, zacházení s vstupními surovinami, polotovary, hotovými výrobky ve fázi výroby, ale také po jejím ukončení. Tento system je využíván při samotné výrobě potravin, skladování, při její přepravě a distribuci [20].

Základem tohoto systému je vypracování analýzy nebezpečí a následné vyhodnocení úseků s nejvyšším možným rizikem vyprodukování zdravotně závadných potravin. Z takto získaných informací jsou pak stanoveny tzv. kritické kontrolní body označovány CCP (critical control points) a to ve výrobě, zpracování, distribuci potravin a jejich uvádění do oběhu. U těchto CCP jsou stanoveny kritické meze, které jsou pravidelně ve stanovených intervalech monitorovány a jsou o nich vedeny záznamy [20].

Vypracovat tyto ochranné systémy se staly pro provozovatele potravinářských podniků v ČR tak u celé EU povinností. Tuto povinnost jim dává článek 5 výše zmiňovaného Nařízení Evropského parlamentu (EP) a Rady (ES) č. 852/2004 o hygieně potravin, ve znění pozdějších předpisů. V tomto článku mají provozovatele potravinářského podniku stanoveny povinnosti provést identifikaci všech rizik, na základě které budou předcházet těmto možným rizikům, dále identifikovat kritické kontrolní body, stanovit jejich limity, zajistit jejich účinné sledovací postupy, včetně nápravných opatření, provádění pravidelného ověřování správného fungování tohoto systému a vedení odpovídající dokumentace [38].

Z výše uvedeného vyplývá, že nejvýznamnějším krokem je provedení správné a důkladné analýzy nebezpečí. Tato nebezpečí lze rozdělit na biologická, fyzikální a chemická [20]. Významným biologickým nebezpečím je nebezpečí mikrobiologické. Mikroorganismy mohou způsobit svým růstem nebo produkovanými metabolity kažení potravin. Mikrobio-

logické kažení je významným faktorem ovlivňující zdravotní nezávadnost a bezpečnost potravin [20, 39].

Chemické kažení může být způsobeno nemikrobiální enzymatickou aktivitou, oxidací, neenzymatickým hnědnutím tzv. Maillardovou reakcí [39]. Mezi možné fyzikální kažení patří ztráta vody, zvýšení vlhkosti suchých potravin, spálení mrazem, rekrystalizace zmrazených potravin. Příčina kažení může být způsobena kombinací těchto druhů nebezpečí [39].

2 LEGISLATIVA

Produkce bezpečných potravin je ošetřena legislativou národní, ale i nadnárodní tj. legislativou Evropské unie. Stěžejním národním předpisem týkajícím se potravin je zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, ve znění pozdějších předpisů (zákon o potravinách), zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči, a o změně některých souvisejících předpisů, ve znění pozdějších předpisů, zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících předpisů, ve znění pozdějších předpisů a zákon č. 634/1992 Sb., na ochranu spotřebitele, ve znění pozdějších předpisů [37]. Ochranu nad dodržováním bezpečnosti potravin a těchto zákonů zajišťuje stát pomocí kontrolních orgánů.

Evropskou legislativu představuje tzv. „Hygienický balíček“:

- nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004, o hygieně potravin, ve znění pozdějších předpisů,
- nařízením Evropského Parlamentu a Rady (ES) 853/2004, kterým se stanoví specifické hygienické předpisy pro potraviny živočišného původu, ve znění pozdějších předpisů,
- nařízením Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 854/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví specifická pravidla pro organizaci úředních kontrol výrobků živočišného původu určených pro lidskou spotřebu, ve znění pozdějších předpisů,
- nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 882/2004 ze dne 29. dubna 2004, o úředních kontrolách za účelem ověření, zda se dodržují právní předpisy o krmivech a potravinách a ustanovení o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat, ve znění pozdějších předpisů [40].

Zastřešujícím předpisem hygienického balíčku je nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 178/2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro potraviny a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin, ve znění pozdějších předpisů [41].

2.1 KONTROLNÍ ORGÁNY

V zákoně o potravinách jsou nastaveny kompetence jednotlivých dozorových kontrolních orgánů.

Těmito kontrolními orgány jsou:

- *orgány ochrany veřejného zdraví*, vykonávající státní dozor nad dodržováním povinností uvedených v tomto zákoně a v zákoně na ochranu zdraví lidu pro poskytování stravovacích služeb, zjištění příčin poškození nebo ohrožení zdraví a zamezení šíření infekčních onemocnění nebo jiného onemocnění z potravin,
- *orgány státní veterinární správy* vykonávající státní dozor nad dodržováním povinností uvedených v tomto zákoně a veterinárním zákoně nad dodržování povinností potravin živočišného původu,
- *Státní zemědělská a potravinářská inspekce*, vykonávající státní dozor nad dodržováním povinností uvedených v tomto zákoně a vykonávající dozor nad dodržováním potravin ostatních než živočišného původu,
- *Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský*, vykoná státní dozor nad prováděním klasifikace jatečných zvířat [37].

Všechny tyto kontrolní orgány v rámci své činnosti provádějí odběry vzorků pro tzv. monitoring, dále dle přijatých stížností a vlastních projektů vedoucích k prověření bezpečnosti potravin na trhu. Výsledky jednotlivých rozborů jsou vyhodnocovány dle příslušné legislativy. V případě nevyhovujících – zdravotně závadných potravin, tedy nebezpečných potravin je v evropské unii nastaven ochranný systém RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). Mikrobiologická kritéria pro potraviny jsou ošetřena Nařízením Komise (ES) č. 2073/2005, o mikrobiologických kritériích pro potraviny, ve znění Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 ze dne 5. prosince 2007 a Nařízení Komise (EU) 365/2010 ze dne 28.4.2010 (dále jen „Nařízení ES 2073/2005“). Pro mikrobiologické hodnocení potravin na českém trhu byla vytvořena norma ČSN 56 9609, Pravidla správné hygienické a výrobní praxe – Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace (dále jen ČSN 56 9609), která však není pro provozovatele potravinářských podniků závazná, ale pouze doporučující.

2.2 NAŘÍZENÍ ES 2073/2005

Nařízení stanoví mikrobiologická kritéria pro některé mikrobiologické parametry a prováděcí pravidla, která jsou povinni provozovatelé potravinářských podniků dodržovat při provádění obecných a zvláštních hygienických opatření podle článku 4 nařízení (ES) č. 852/2004. Nařízení ES 2073/2005 stanovuje povinnosti provozovatelů potravinářského podniku, kteří musí zajistit mikrobiologická kritéria uvedena v příloze č. I. tohoto nařízení, u potravin uváděných na trh. Ve všech fázích výroby, zpracování a distribuci, včetně maloobchodu, v souladu se stanovenými postupy dle zavedených systémů HACCP, zajistit produkci bezpečných potravin. Příloha I stanovuje mikrobiologická kritéria pro potraviny, jejich bezpečnost, kritéria hygieny výrobního procesu a pravidla odběru vzorků. Příloha je rozdělena na 3 kapitoly.

Kapitola 1 stanovuje kritéria bezpečnosti potravin pro jednotlivé patogenní mikroorganismy, jejich metabolity a toxiny: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, stafylokokové enterotoxiny, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, a histamin [42].

Z pohledu sýrů zrajících pod mazem je mikroorganizmem vyskytující se u těchto sýrů uvedených v této kapitole *Listeria monocytogenes*, která bývá sekundárním zdrojem kontaminace při nedodržení hygienických podmínek během výrobního procesu [23]. Pro tento významný patogen jsou v kapitole 1 stanovena kritéria dle kategorie potravin. Článek 1.2. upravuje hodnoty pro potraviny určené k přímé spotřebě které podporují růst *L. monocytogenes*, jiných než pro kojence a pro zvláštní léčebné účely. U těchto potravin podporujících růst jsou stanoveny dva limity:

- 100 KTJ (kolonie tvořící jednotku)/g, u produktů uvedených na trh během doby použitelnosti. Tento limit lze uplatnit v případě, že je výrobce schopen prokázat kontrolním orgánům, že výrobek je schopen dodržet tuto hodnotu po celou dobu použitelnosti. Předložením studie podle přílohy II. s cílem prošetřit, zda potravina dodrží stanovený limit po celou dobu použitelnosti. Provozovatelé potravinářských podniků musí dle článku 3 odst. 2 provádět u potravin podporujících růst tohoto mikroorganismu studie podle přílohy II, a tím prověřit, zda je vyráběná potravina určená k přímé spotřebě schopna dodržet limit 100 KTJ po celou dobu použitelnosti.
- nepřítomnost ve 25 g, tj. limit před tím, než potravina opustí okamžitou kontrolu provozovatele potravinářského podniku, který potravinu vyrobil, pokud není schopen

kontrolnímu orgánu prokázat, že výrobek nepřekročí 100 KTJ po celou dobu použitelnosti, nemá tedy vypracovanou studii.

Článek 1.3. stanovuje hodnoty pro potraviny určené k přímé spotřebě nepodporující růst *L. monocytogenes*, jiné než pro kojence a pro zvláštní léčebné účely, pro potraviny uvedené na trh během doby použitelnosti. Limitem je stanoven 100 KTJ/g.

Rozbor je prováděn v počtu $n = 5$, tj. jeden vzorek má 5 podvzorků, stanovení mikroorganismu *L. monocytogenes* je prováděn 5x. Stanovené limity nesmí být překročeny v žádném z 5-ti stanovení. Rozbory jsou prováděny dle předepsaných norem.

Kapitola 2 stanovuje kritéria hygieny výrobního procesu pro maso a masné výrobky, mléko a mléčné výrobky, vaječné výrobky, produkty rybolovu, zeleninu, ovoce a výrobky z nich. V oddíle mléčných výrobků, konkrétně pro sýry vyrobené z tepelně ošetřeného mléka či tepelně ošetřené syrovátky jsou zde nastavena kritéria pro mikroorganismus *Escherichia coli* limit 10^2 KTJ/g ve třech případech z pěti vzorků a 10^3 KTJ/g ve dvou případech z pěti vzorků daného rozboru. Pro sýry vyrobené z mléka, které bylo podrobena nižšímu tepelnému ošetření než pasterací, a zrající sýry vyrobené z pasterovaného či silněji tepelně ošetřeného mléka nebo z pasterizované či tepelně ošetřené syrovátky jsou zde nastavena kritéria pro koagulázopozitivní stafylokoky se stejným limitem jako *Escherichia coli*.

Kapitola 3 upravuje pravidla odběru vzorků a přípravu zkušebních vzorků [42].

Tímto Nařízením jsou stanoveny povinnosti provozovatelům potravinářského podniku provádět v případě potřeby rozbory podle mikrobiologických kritérií stanovených v příloze I. při validaci a ověřování správného fungování svých postupů založených na zásadách HACCP a správné hygienické praxe [42].

2.3 ČSN 56 9609

Bezpečnost potravin je založena na principech systému kritických kontrolních bodů HACCP a pravidlech správné hygienické praxe, součástí kterých jsou mikrobiologické rozbory od vstupních surovin, kontrol během výroby a zpracování, distribuce, skladování, prodeje.

Tuto normu vydal Český normalizační institut v roce 2008 [43] a slouží jako návod pro stanovení a aplikaci mikrobiologických kritérií pro potraviny ve všech částech potravinového řetězce od prvovýroby až po konečného spotřebitele.

Norma má doporučující charakter, není tedy závazná, její dodržování není vymahatelné kontrolními orgány. Je však účinným ověřovacím kritériem systému HACCP. Umožňuje zjištění stavu surovin, polotovarů a potravin v celém potravinovém řetězci. V normě jsou stanovena mikrobiologická kritéria pro potraviny, což vyznačuje přípustnost výrobku nebo šarže potraviny na základě nepřítomnosti, přítomnosti nebo počtu mikroorganismů v jednotce, včetně parazitů nebo množství toxinů v kontrolované dávce. Součástí normy je tabulka B.6, která uvádí bakteriální původce onemocnění z potravin, kategorie potravin a jejich nejvyšší mezní hodnoty na g (ml), tabulka B.7 uvádí původce kažení a tabulka B.8 uvádějící toxické produkty mikroorganismů [43].

V oddíl B.5.2., této normy, jsou uvedeny tolerované hodnoty pro jednotlivé druhy, skupiny nebo podskupiny potravin. Sýry zrající pod mazem a jejich tolerované hodnoty jsou uvedeny v oddílu B.5.5.4.9.4. (Tab. 1.). Zde jsou stanoveny tolerované (přípustné) hodnoty pro koliformní bakterie, *Escherichia coli*, koagulázopozitivní stafylokoky a *Listeria monocytogenes*. Rozbory jsou prováděny pět krát. Pro stanovení *Escherichia coli*, koagulázopozitivní stafylokoky norma umožňuje překročení ve dvou případech z pěti do hodnoty M, limity jsou uvedeny jako počet KTJ/g. *Listeria monocytogenes* musí být ve všech 5 stanoveních negativní a stanovuje se v 25 g [43].

Tab. 1. Mikrobiologické limity měkkých sýrů zrajících, dle ČSN 56 9609.

	n	c	m	M
Koliformní bakterie	5	2	10 ⁴	10 ⁵
<i>Escherichia coli</i>	5	2	10 ²	10 ³
Koagulázopozitivní stafylokoky	5	2	10 ²	10 ³
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	0/25	-

Kde: *n* – počet stanovení vzorku; *c* – počet vzorků z počtu *n*, u nichž může počet mikroorganismů dosáhnout hodnot *M*; *m* – udává počet mikroorganismů, který se povoluje u všech vzorků *n*; *M* – udává počet mikroorganismů, který se povoluje pro počet stanovení *c* nebo nižší [43].

Norma svými limity nahradila již zaniklou vyhlášku č. 132/2004 Sb., o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsoby jejich kontroly a jejich hodnocení, která byla zrušena v roce 2006. Novým předpisem nastavující mikrobiologická kritéria pro potraviny, která

jsou provozovatelé potravinářských podniků povinni dodržovat, se stalo výše zmiňované Nařízení ES 2073/2005.

2.4 SYSTÉM RYCHLÉHO VAROVÁNÍ PRO POTRAVINY (RASFF)

Systém včasného, rychlého varování pro potraviny představuje propojení všech členských států Evropské unie (27 států) s Evropskou komisí a Evropským úřadem pro bezpečnost potravin EFSA (European Food Safety Authority), za pomoci internetové sítě. Systém je stanoven Nařízením Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002. V České republice je fungování tohoto systému ošetřeno Nařízením vlády č. 98/2005, kterým se stanoví Systém rychlého varování o vzniku rizika ohrožení zdraví lidí z potravin a krmiv.

Tento systém má za cíl ochranu spotřebitele před nebezpečnými potravinami, krmivy nebo surovinami použitými pro výrobu těchto surovin, zabránit jejich uvádění na trh a zajistit jejich stažení z trhu, jestliže představují vážné riziko poškození zdraví spotřebitele [44].

V EU tento systém funguje již od roku 1979 [45], členem této sítě se Česká republika stala v roce 2004 [46]. V České republice bylo zřízeno národní kontaktní místo pro shromažďování informací ze všech dozorových orgánů, provádějících dozor nad potravinami a krmivy. Tímto kontaktním místem je Státní zemědělská a potravinářská inspekce. Tato organizace shromažďuje informace od orgánů veterinární správy, orgánů ochrany zdraví lidu, Státní zemědělské a potravinářské inspekce, Státní rostlinolékařské správy a Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského [44]. Schéma fungování systému RASFF v ČR znázorňuje *Obr. 4*.

Ministerstvo zemědělství vydává každý rok Zprávu o činnosti systému rychlého varování pro potraviny a krmiva. Ve zprávách jsou shromážděny informace o podaných oznámeních z České republiky do tohoto systému a oznámení podaná z EU. Tyto zprávy jsou veřejnosti přístupné [45].

V případě zjištění nebezpečné potraviny v ČR některým dozorovým orgánem, předává tento úřad informace národnímu kontaktnímu místu, které následně informuje Evropskou Komisi. V rámci zpětné vazby je Česká republika informována Evropskou Komisí o kontrolním zjištění v ostatních státech EU. Tento systém poskytuje informace o nebezpečných výrobcích nebo krmivech jednak vycházejících z našeho domácího trhu, ale také od ostat-

ních států EU, systém je tedy obousměrný. Dozorové orgány na základě získaných informací provádějí následná šetření, opět probíhá zpětná vazba předávání informací [44].

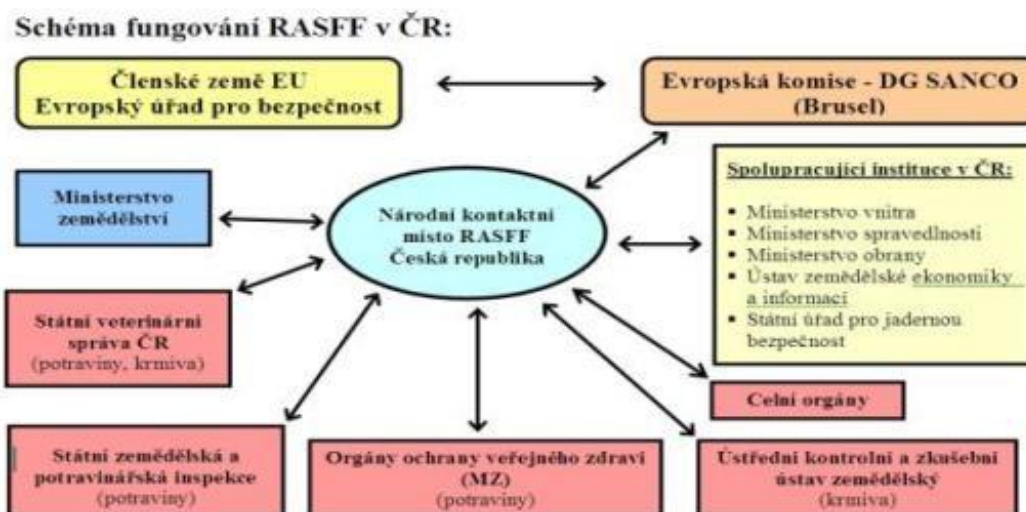
Typy informací tzv. „notifikace“ jsou rozděleny: varování (alert notification), informace (information notification), odmítnutí na hranici (border rejection notification) a novinka (news notification).

Varování – představuje závadné potraviny nebo krmiva, kdy hrozí vážné riziko pro člověka nebo zvíře. Notifikaci zasílá země zjištění této potraviny nebo krmiva a je rozesílána všem státům EU.

Informace – povaha rizika to nevyžaduje nebo v případě potravin, surovin a krmiv umístěných na trh, u nichž bylo zjištěno riziko, ale výrobek se nedostal do všech zemí EU, proto nemusí ostatní členské státy ihned zasahovat.

Odmítnutí na hranici – jedná se o ochranu trhu EU před vniknutím zdravotního rizika na vnějších hranicích EU.

Novinka – zahrnuje všechny druhy informací týkající se bezpečnosti potravin, které nebyly oznámeny členskými státy (varování, informace, odmítnutí na hranici), ale které považovány za důležité z pohledu dozorových orgánů [45].



Obr. 4. Schéma fungování RASFF v ČR [47].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo:

- provést mikrobiologický rozbor (CPM, koliformní bakterie, plísně, kvasinky, koagulázopozitivní stafylokoky – *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes*) vybraných sýrů zrajících pod mazem od českých výrobců;
- vyhodnotit získané výsledky dle ČSN 56 9609 a Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, ve znění pozdějších předpisů;
- zpracovat údaje o výskytu *Listeria monocytogenes* ve zrajících sýrech dle monitoringu kontrolních orgánů (Státní zemědělská a potravinářská inspekce, Státní veterinární správa, Rapid Alert System for Food and Feed).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- předvážky, KERN 440-47N (max 2000g, d=0,1g), Německo;
- digitální váha, KB800-2- Kern & Sohn GmbH, Německo;
- inkubátor mikrobiologický, MEMMERT, Německo;
- bezpečnostní box, Schoeller, Česká republika;
- laboratorní homogenizátor, Stomacher Seward, Velká Británie;
- Vortex, Heidolph REAX top, Německo;
- horkovzdušný sterilizátor, PREMED, Polsko;
- parní sterilizátor VARIOKLAV 75S,135S, H+P Labortechnik, Německo;
- mikrovlnná trouba Elektrolux EMM 2005, Švédsko;
- pH metr HANNA pH 211 Fischer Scientific, spol. s r.o., Česká republika;
- chladnička ERB3046- Elektrolux, Švédsko;
- vodní lázeň, MEMMERT, WB 22, Německo;
- mikropipety: Hirschmann Laborgerate (Německo), Nichipet (Japonsko), Ependorf;
- počítadlo kolonií;
- mikroskop laboratorní, Motic, Type BA 200, Intraco micro, Česká republika;
- termoblok Bio TDB-100, Biotech, Česká republika;
- laboratorní centrifuga chlazená Z 300 K, HERMLE, Labortechnik, Německo;
- termostat BT I20, Česká republika;
- termocykler DNA Engine, Biotech, Česká republika;
- transiluminátor vizualizace při elektroforéze, Česká republika;
- elektroforetická souprava model B1A, OWL Separation Systems, Inc., USA;
- zdroj napětí Major Science MP-300N, Taiwan;
- fotoaparát PowerShot G6 Canon, Japonsko;

- běžné laboratorní sklo.

4.2 CHEMIKÁLIE

4.2.1 Kultivační média

Složky kultivačních médií byly rozpuštěny v definovaném množství destilované vody, byla provedena kontrola pH media a následně byla provedena sterilizace parním autoklávem při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Media byla vychlazena na požadovanou teplotu.

Celkový počet mikroorganismů (CPM)

Agar s glukózou, tryptonem a kvasničným extraktem (GTK), BIO-RAD, Francie (20,5 g/l).

Složení:	enzymaticky natrávený kasein	5,0 g
	kvasničný extrakt	2,5 g
	glukóza bezvodá	1,0 g
	agar	9 – 18 g
	voda	1000 ml

Koliformní bakterie

agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi a laktózou VRBL (Violet Red Bile Lactose agar), BIO-RAD, Francie (38,0 g/l).

Složení:	enzymatický hydrolyzát živočišné tkáně	7,0 g
	kvasničný extrakt	3,0 g
	laktóza	10,0 g
	chlorid sodný	5,0 g
	žlučové soli	1,5 g
	neutrální červeň	0,03 g
	krystalová violet'	0,002 g
	agar	12 – 18 g
	voda	1000ml

Plísně a kvasinky

Agar s glukózou, kvasničným extraktem a chloramfenikolem (GKCH), BIO-RAD, Francie (40 g/l).

Složení:	kvasničný výtažek	5,0 g
	glukóza	20,0 g
	chloramfenikol	0,1 g
	agar	15,0 g
	voda	1000 ml

Koagulázopozitivní stafylokoky, *Staphylococcus aureus*

Baird – Parker agar (B-P agar) agar s vaječnou emulzí a teluričitanem draselným, HiMedia Laboratories, India (63 g/l).

Složení:	pankreaticky natrávený kasein	10,0 g
	kvasničný extrakt	1,0 g
	masový extrakt	5,0 g
	pyruvát sodný	10,0 g
	L – glycin	12,0 g
	chlorid litný	5,0 g
	agar	12 – 22 g
	voda	do objemu 1000 ml

složky půdy se rozpustí ve vodě, provede se úprava pH (je-li třeba) a půda se sterilizuje 15 min. při 121 °C. k takto připravené půdě se po vychlazení 45 °C přidá teluričitan draselný 1ml (1,0 g /100ml vody) a 50 ml žloutkové emulze, HiMedia Laboratories, India.

Listeria monocytogenes

½ Fraser bujon - tekutá selektivní půda pro primární pomnožení.

Složení:	masový pepton	5,0 g
	trypton	5,0 g

masový extrakt	5,0 g
kvasničný extrakt	5,0 g
chlorid sodný	20,0 g
hydrogenfosforečnan disodný dihydrát	12,0 g
dihydrogenfosforečnan draselný	1,35 g
eskulin	1,0 g
voda	1000 ml

Základní půda byla vysterilizována a před použitím byly přidány vysterilizované roztoky:

chlorid litný	10 ml (3 g v 10 ml vody)
hydrochlorid akriflavinu	5,0 ml (0,25 g v 100 ml vody)
citran železitoamonný	10 ml (5,0 g v 100 ml vody)
sodná sůl kyseliny nalidixové	1,0 ml do 1000 ml (0,1 g v 10 ml roztoku NaOH o koncentraci 0,05 mol/l)

Plný Fraser bujon - tekutá selektivní půda pro pomnožení.

Složení:	masový pepton	5,0 g
	trypton	5,0 g
	masový extrakt	5,0 g
	kvasničný extrakt	5,0 g
	chlorid sodný	20,0 g
	hydrogenfosforečnan disodný dihydrát	12,0 g
	dihydrogenfosforečnan draselný	1,35 g
	eskulin	1,0 g
	chlorid litný	3,0 g
	sodná sůl kyseliny nalidixové	0,02 g
	voda	1000 ml

Základní půda byla vysterilizována a před použitím byly přidány vysterilizované roztoky:

hydrochlorid akriřlavinu	10 ml (0,25 g v 100 ml vody)
citran řelezitoamonný	10 ml (5,0 g v 100 ml vody)

Listeria Oxford agar (LOA), agar pro listerie dle Otavaniho a Agustiho, selektivní půda, HiMedia Laboratories, India.

Složení:	pepton	23,0 g
	řkrob	1,0 g
	chlorid sodný	5,0 g
	agar (dle ztuřovací schopnosti)	9 až 18 g
	eskulin	1 g
	citran řelezitoamonný	0,5 g
	chlorid litný	15 g
	voda	1000 ml

Suplement, HiMedia Laboratories, India (vysterilizované složky) pro 1000 ml sterilní půdy.

Složení:	cykloheximid	400 mg
	sulfát kolistinu	20 mg
	hydrochlorid akriřlavinu	5,0 mg
	cefotetan	2,0 mg
	fosfomycin	10,0 mg
	etanol	5 ml
	voda	5 ml

selektivní agar XLD (Salmonella)

Agar s xylózou, lyzinem, deoxycholátem, HiMedia Laboratories, India (56,68 g/l).

Složení:	kvasničný extrakt	3,0 g
	L – Lyzin HCl	5,0 g
	xylóza	3,5 g

chlorid sodný	5,0 g
laktóza	7,5 g
sacharóza	7,5 g
deoxycholát sodný	2,5 g
tiosulfát sodný	6,8 g
citrát železito – amonný	0,8 g
fenolová červeň	0,8 g
agar	3,5 g
voda	1000 ml

Fyziologický roztok

NaCl, Ing. Petr Lukeš, Česká republika	8,5 g
Destilovaná voda	1000 ml

4.2.2 Konfirmační testy

KOH, Ing. Petr Lukeš, Česká republika 3% vodný roztok

Kataláza (H₂O₂) 3% vodný roztok

OXI test, detekční proužky, Lachema Micro-LA-Test, Česká republika

Zkvašování cukrů:

Složení:	masový výtazek, HiMedia Laboratories, Indie	3 g
	chlorid sodný, Ing. Petr Lukeš, Česká republika	5 g
	pepton, HiMedia Laboratories, Indie	10 g
	bromkrezolová červeň	0,1 g
	voda	1000 ml
	laktóza, Lach-Ner s.r.o., Česká republika	1 g
	ramnóza, Lachema a.s., Česká republika	1 g
	xylóza, Lachema a.s., Česká republika	1 g

OF test oxidačně fermentační test:

Složení:	masový výtazek, HiMedia Laboratories, Indie	3 g
	pepton, HiMedia Laboratories, Indie	5,0 g
	NaCl, Ing. Petr Lukeš, Česká republika	3,0 g
	D-glukóza, Lachema a.s., Česká republika	10,0 g
	bromtymolová modř – 1,5% alkoholicky roztok	10,0 ml
	agar, HiMedia Laboratories, Indie	15 g
	voda	1000 ml

Gramovo barvení

Gram I. Roztok krystalové violeti

Složení:	Krystalová violet'	10 g
	96% etanol	100 ml

Gram II. Lugolův roztok

Složení:	jod	1 g
	jodid draselný	2 g
	destilovaná voda	100 ml

Gram III.

Složení: Etanol

Gram IV. Roztok karbolfuchsinu

Složení:	Fuchsin bazický	0,1 g
	96% etanol	10 ml
	Fenol	100 ml

Před použitím byl roztok zfiltrován.

4.2.3 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

50x TAE pufr (TRIS-acetátový pufr)

Složení:	TRISMA-base, Sigma, USA	121 g
	0,5 M EDTA, pH 8, Lach. – Ner. s.r.o., Česká republika	50 ml
	ledová kyselina octová, Lachema a.s., Česká republika	28,55 ml

destilovaná voda do 500 ml

Nanášecí pufr:

Složení:	bromtymolová modř, SERVA Electrophoresis GmbH, Německo	10 mg
	10% SDS, SERVA Electrophoresis GmbH, Německo	600 µl
	Glycerol, PENTA, Česká republika	1,2 ml
	destilovaná voda	do 10 ml.

Agarózový gel

Složení:	agaróza pro elektroforézu DNA, SeaKem, USA	2,0 g
	1x koncentrovaný TAE pufr	200 ml
	etidium bromid	10 µl
	(roztok 10 mg/ml, SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)	

PCR reakční směs:

PCR pufr Thermopol (New England Biolabs, USA), dNTP mix (Jena Bioscience, Německo), *Taq* DNA polymeráza (New England Biolabs, USA), primery – F a R (dodavatel KRK, Česká republika), templátová DNA (příprava viz. 3.4.5), sterilní destilovaná voda.

PCR pufr

Základ pufru je tvořen síranem amonným/chloridem draselným, další složky jsou chlorid hořečnatý, a Tris – HCl pH 8,8 (při 25 °C). PCR pufr jsou dodávány i bez chloridu hořečnatého, čímž jsou optimalizovány reakční podmínky [48].

dNTP mix

Je vodný roztok nukleozidtrifosfátů, směs čtyř nukleotidů (adenin, guanin, cytosin a thymin) [48, 49].

Primery – F a R

Primery jsou oligonukleotidy, odpovídající svou sekvencí DNA templátu, vymezující amplifikovaný úsek templátu, z nichž jeden určuje začátek a druhý konec vymezeného amplifikovaného úseku [49]. Tyto úseky tvoří geny, které má *L. monocytogenes* umístěny v jednom úseku DNA obsahující činitele zodpovědné za patogenitu listerií [50]. Mezi tyto geny

patří: *prfA* gen (regulační protein hemolyzinu) [51], *plcA* (fosfatidylinositol specifická Fosfolipáza C), *hly* (prekurzor hemolyzinu), *mpl* (prekurzor metaloproteinázy) *actA* (prekurzor proteinu spojující aktinové molekuly) a *plcB* (fosfolipáza C) [50]. Pro rozbor byly použity DNA primery uvedené v Tab. 2. Jednalo se o primery LMrt3Rbis R/F specifikuující *actA* gen, který má velikost 1920 bp [50, 52, 53].

Tab. 2. Použité primery pro PCR.

Primery	Sekvence nukleotidu 5' - 3'	Velikost PCR produktu	Citace
LMrt3Rbis	TAATTTCCGCTGCGCTATCCG	109 bp	[53]
LMrt3F	CAAAGCGAGAATGTGGCTATAAATGA		

Taq DNA- polymeráza

Prvním krokem mnohonásobné amplifikace je denaturace, kdy dochází k inaktivaci běžných enzymů vysokou teplotou 95 °C. Při reakci je používán enzym termostabilní DNA – polymeráza, která je schopna této teplotě odolávat až po dobu 40 minut i déle a slouží k syntéze nové DNA. Nejčastěji používaným enzymem je *Taq* DNA polymeráza, získávaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* [49, 54, 55].

4.3 METODY

Bylo provedeno mikrobiologické testování: stanovení celkového počtu mikroorganismů, koliformních bakterií, plísní a kvasinek metodou zalití kultivačním médiem, dne příslušných norem. Stanovení koagulázopozitivních stafylokoků, *Staphylococcus aureus*, bylo provedeno metodou roztěru na povrchu kultivační půdy. Stanovení *Listeria monocytogenes* bylo provedeno metodou průkazu.

4.3.1 Hodnocené vzorky

Pro testy byly použity vzorky sýrů zrajících pod mazem od českých výrobců zakoupených v tržní síti. Zakoupeny byly vždy dvě balení každého druhu sýru. Jedno balení bylo uloženo do chladicího zařízení a skladováno při teplotě 8 °C, druhé balení bylo skladováno v laboratoři při teplotě 25 °C po dobu 7 dnů (vzorky Hermadur, Tvarůžky kolečka, Tvarůžky kousky s kmínem) a 14 dnů (vzorky Romadur, Pepin a Romadůžek).

Testování vzorků bylo provedeno ve třech etapách: vzorky skladované při teplotě chladničky do 8 °C (1 a 2 etapa) a vzorky skladované při pokojové teplotě 25 °C po dobu 7 a 14 dnů (3 etapa). Testy byly u sledovaných vzorků (Tab. 3. a 4.) provedeny odběrem z povrchu a zevnitř sýrů zrajících pod mazem.

Tab. 3. Tabulka vzorků sýrů zrajících pod mazem pro 1. a 2. experiment, skladováno při 8 °C.

Vzorek	Název	Výrobce	Očkováno
1	Romadur	Madeta, a.s., České Budějovice	povrch
2	Romadur	Madeta, a.s., České Budějovice	zevnitř
3	Pepin	Povltavské mlékárny, a.s., Sedlčany	povrch
4	Pepin	Povltavské mlékárny, a.s., Sedlčany	zevnitř
5	Romadůžek	Povltavské mlékárny, a.s., Sedlčany	povrch
6	Romadůžek	Povltavské mlékárny, a.s., Sedlčany	zevnitř
7	Hermadur	PRIBINA, spol. s r.o., Hesov,	povrch
8	Hermadur	PRIBINA, spol. s r.o., Hesov,	zevnitř
9	Tvarůžky kolečka	A.W.spol. s r.o., Loštice	povrch
10	Tvarůžky kolečka	A.W.spol. s r.o., Loštice	zevnitř
11	Tvarůžky kousky s kmínem	A.W.spol. s r.o., Loštice	povrch
12	Tvarůžky kousky s kmínem	A.W.spol. s r.o., Loštice	zevnitř

Vzorky ke stanovení *L. monocytogenes* byly označeny: A – Romadur, B – Pepin, C – Romadůžek, D – Hermadur, E – Tvarůžky kolečka, F – Tvarůžky kousky s kmínem.

Tab. 4. Tabulka vzorků sýrů zrajících pod mazem pro 3. experiment, skladováno při 25 °C.

Vzorek	Název	Výrobce	Očkováno
13	Romadur	Madeta, a.s., České Budějovice	povrch
14	Romadur	Madeta, a.s., České Budějovice	zevnitř
15	Pepin	Povltavské mlékárny, a.s., Sedlčany	povrch
16	Pepin	Povltavské mlékárny, a.s., Sedlčany	zevnitř
17	Romadůžek	Povltavské mlékárny, a.s., Sedlčany	povrch
18	Romadůžek	Povltavské mlékárny, a.s., Sedlčany	zevnitř
19	Hermadur	PRIBINA, spol. s r.o., Hesov,	povrch
20	Hermadur	PRIBINA, spol. s r.o., Hesov,	zevnitř
21	Tvarůžky kolečka	A.W.spol. s r.o., Loštice	povrch
22	Tvarůžky kolečka	A.W.spol. s r.o., Loštice	zevnitř
23	Tvarůžky kousky s kmínem	A.W.spol. s r.o., Loštice	povrch
24	Tvarůžky kousky s kmínem	A.W.spol. s r.o., Loštice	zevnitř

4.3.2 Příprava vzorků

Ze vzorků bylo pro stanovení CPM, koliformních bakterií, koagulázopozitivních stafylokoků, plísní a kvasinek asepticky naváženo 10,0 g (z povrchu a zevnitř výrobku odděleně) do sterilního sáčku a přidáno 90 ml fyziologického sterilního roztoku. Následně byla provedena homogenizace v homogenizátoru po dobu 2 minut. Z takto získaného základního ředění byla inokulována následná ředění dle předpokládaného počtu stanovovaných mikroorganismů.

Pro stanovení CPM, koliformních bakterií, plísní a kvasinek byl, metodou zalití inokula tuhou půdou, inokulován 1 ml vzorku z každého ředění, vždy na 2 Petriho misky. Po zatuhnutí media byly misky uloženy dnem vzhůru do termostatů dle předepsaných teplot a délky kultivace příslušných norem. Po inkubaci byl proveden odečet charakteristických kolonií pomocí počítač tužky kolonií. Charakteristické kolonie byly použity pro následné konfirmační testy.

Pro stanovení koagulázopozitivních stafylokoků byla použita metoda rozteru inokula na povrchu tuhé půdy. Na povrch media 2 Petriho misek bylo inokulováno 100 µl vzorku každého vybraného ředění a následného desetinasobného ředění. Inokulum bylo rozetřeno

asepticky sterilní kličkou. Pro vsáknutí inokula do půdy byly Pepiho misky inkubovány dnem vzhůru v termostatu při teplotě 37 ± 1 °C po dobu 24/48 hodin). Po inkubaci byl proveden odečet charakteristických kolonií.

Výsledky byly vypočítány dle předepsaných vzorců jednotlivých norem a vyjádřeny v hodnotách KTJ/g vzorku.

Pro stanovení *Listeria monocytogenes* bylo asepticky odebráno 25 g vzorku z povrchu do sterilní skleněné nádoby s 225 ml ½ bujonu dle Frasera.

4.3.3 Mikrobiologický rozbor

Připravené vzorky byly podrobeny mikrobiologickému testování: CPM, koliformní bakterie, plísně a kvasinky, koagulázopozitivní stafylokoky a *Listeria monocytogenes*. Při rozbo-rech byla použita media, jejichž složení je uvedeno v kapitole 4.2.

Stanovení celkového počtu mikroorganismů

Stanovení celkového počtu mikroorganismů bylo provedeno dle ČSN EN ISO 4833 [56], metoda zalití 1 ml inokula pevnou půdou GTK, kultivace při teplotě 30 ± 1 °C po dobu 72 hodin, aerobně.

Stanovení koliformních bakterií

Stanovení koliformních bakterií bylo provedeno dle ČSN ISO 4832 [57] metoda zalití 1 ml inokula pevnou půdou VRBL, kultivace při teplotě 37 ± 1 °C po dobu 24/48 hodin, aerobně.

Stanovení plísní a kvasinek

Stanovení plísní a kvasinek bylo provedeno dle ČSN ISO 7954 [58] metoda zalití 1 ml inokula pevnou půdou, kultivace při teplotě 25 ± 1 °C po dobu 3 až 5 dní, aerobně.

Stanovení koagulázopozitivních stafylokoků, *Staphylococcus aureus*

Stanovení koagulázopozitivních stafylokoků bylo provedeno dle ČSN EN ISO 6888-1 [59] metoda rozřeru 0,1 ml inokula na povrchu pevné půdy B-P agar, kultivace při teplotě 37 ± 1 °C po dobu 24/48 hodin, aerobně.

Stanovení *Listeria monocytogenes*

Přítomnost *L. monocytogenes* v potravinách lze stanovit několika metodami detekce:

- klasické kultivační metody ČSN EN ISO 11290;
- moderní kultivační metody – API Listeria test, RAPID L. mono test, ALOA a COMPASS L. mono Agar;
- molekulárně genetické metody – určující mikroorganismus pomocí jeho genetické informace – Hybridizace a PCR;
- imunochemické techniky – základem je interakce protilátky s antigenem - enzymová imunoanalýza, imunochromatografická technika na membráně, imunosenzor;
- komerční testy pro detekci listerií v potravinách [60].

V této práci bylo stanovení *Listeria monocytogenes* provedeno dle ČSN EN ISO 11290-1 [61] metoda průkazu v krocích:

1. primární pomnožení,
2. sekundární pomnožení,
3. vyočkování na povrch pevné půdy,
4. konfirmační testy.

Krok 1: Bylo odváženo asepticky 25g vzorku do selektivního pomnožovacího media 225 ml ½ bujonu dle Frasera a následně inkubováno při teplotě 30 ± 1 °C po dobu 24 hodin, aerobně.

Krok 2: Odebraných 100 µl vzorku z kroku 1 bylo inokulováno do 10 ml plného bujonu dle Frasera a bylo inkubováno při teplotě 37 ± 1 °C po dobu 24 hodin, aerobně.

Vyočkování celkem 1 ml inokula z kroku 1 na povrch 3 Petriho misek průměru 90 mm se selektivní pevnou půdou Listeria Oxford agar, kultivace při teplotě 37 ± 1 °C po dobu 24 hodin, aerobně.

Krok 3: Byl vyočkován celkem 1 ml inokula z kroku č. 2 z plného bujonu dle Frasera na povrch 3 Petriho misek průměru 90 mm se selektivní pevnou půdou Listeria Oxford agar, kultivace při teplotě 37 ± 1 °C po dobu 24 hodin, aerobně.

Dle výsledků konfirmačních testů byla u podezřelých vzorků provedena PCR.

4.3.4 Základní konfirmační testy

Barvení dle Grama

Barvení dle Grama je základním mikroskopickým testem pro rozlišení bakterií dle složení bakteriální stěny na bakterie grampozitivní, gramnegativní a gramlabilní [49]. Nativní preparát vzorku se fixuje plamenem na podložním skle, provede se barvení krystalovou violetí a moření bakteriálních buněk roztokem KI za vzniku komplexu složek buněčné stěny s barvivem a jodem. Následuje promytí organickým rozpouštědlem (acetone/etanolem). Grampozitivní bakterie barvivo z vytvořeného komplexu neuvolní (bakterie zůstanou modré). Gramnegativní bakterie působením organického rozpouštědla z komplexu barvivo uvolní. Následným dobarvením safraninem/karbofuchsinem zůstanou bakterie červené [49, 62].

Postup barvení dle Grama:

1. sledovaná 24 hodinová kultura (starší kultury se hůře barví) byla nanesena do kapky destilované sterilní vody, rozetřena,
2. po zaschnutí byla provedena fixace preparátu trojnásobným protažením podložního skla plamenem,
3. fixovaný preparát byl přelit krystalovou violetí (Gram I) po dobu 60 sekund,
4. byl proveden oplach preparátu vodou přibližně 2 sekundy,
5. preparát byl přelit Lugulovým roztokem (Gram II) po dobu 30 sekund a následně promyt vodou,
6. následně bylo provedeno odbarvení preparátu acetone (Gram III), 20-30 sekund,
7. karbofuchsinem (Gram IV) po dobu 30-60 sekund byl preparát dobarven a opláchnut vodou,
8. dobarvený preparát byl osušen filtračním papírem.

Takto připravený preparát byl podroben pozorování pod mikroskopem s imezním objektivem o zvětšení 10 x 100. Gram – negativní bakterie se barví červeně, gram – pozitivní modře a gramlabilní tvoří přechod mezi oběma [49].

KOH test

Grampozitivní bakterie mají tendenci se při Gramově barvení snadno odbarvovat a poskytovat tak falešné výsledky. Proto v případě zjištění, že se jedná o gramnegativní mikroorganismus, se jako potvrzující test využívá KOH test. Jedná se o sklíčkový test za použití 3 % hydroxidu draselného. Principem je rozrušení bakteriální stěny gramnegativních bakterií působením KOH. Suspenze se stane viskózní za současného uvolnění vláken deoxyribonukleové kyseliny. U grampozitivních bakterií k narušení bakteriální stěny nedochází [63].

Na podložní sklíčko byla nanесena kapka 3% KOH, ke které byla přidána kolonie 24 hodinové kultury a rozmíchána. Následně byla hodnocena tvorba vytažení vlákna z kapky do vzdálenosti 2cm. Vytažení vlákna značilo pozitivní výsledek a potvrzení gramnegativního typu bakterií.

Test průkazu katalázy

Test je založen na principu tvorby enzymu katalázy, který tvoří většina aerobních a fakultativně anaerobních bakterií. Tento enzym rozkládá peroxid vodíku na kyslík a vodu. Je pozorován únik kyslíku v podobě bublinek a značí pozitivní reakci [49].

Na podložní sklo byla nanесena kapka 3% peroxidu vodíku čerstvě připraveného, do které byla rozetřena testovaná kultura, a byl pozorován únik kyslíku.

OF test

Jedná se o oxidačně-fermentační test, jehož cílem je zjistit, zda testovaná kultura je schopna zpracovat glukózu aerobní oxidací nebo kvašením tedy fermentací. K testování slouží kultivační půda s glukózou a bromtymolovou modří jako indikátoru pH [49]. Glukóza je při fermentaci štěpena za vzniku kyseliny pyrohroznové [62]. Test se provádí ve dvou zkumavkách s půdou. Testovaná kultura je očkovaná vpichem do půdy vždy ve dvou zkumavkách. První je kultivována za aerobních podmínek, druhá kultivovaná za anaerobních podmínek, je na povrchu kultivační půdy navíc překryta vrstvou parafinu. Po kultivaci se provede hodnocení rozkladu glukózy, provázeno okyselením půdy a změnou barvy půdy. V případě fermentace dochází k okyselení, zežloutnutí obou zkumavek. Dojde-li k okyselení glukózy oxidací, dochází k této reakci pouze u zkumavky bez parafinu. V případě, že bakterie nerozkládají glukózu, půda zůstane nezměněna [49, 62]. Do půdy ve zkumavce byl proveden vpich kultury. Zkumavky byly inkubovány při teplotě 37 °C / 24

hodin. Pozitivní reakce značila žluté zbarvení, zelené/modré zbarvení značilo negativní reakci, tedy reakci beze změny.

Zkvašování cukrů

Podstatou testu je průkaz glykosidáz. Test je prováděn v tekutých půdách s přidavkem sacharidů, glykosidů nebo vícesytných alkoholů 0,5 – 1%. Pozitivní reakce značila zkvašování cukru změnou zbarvení (žlutá barva) vznikem organických kyselin za použití indikátoru zbarvení bromtymolové modří [49].

Byla testována schopnost uklizovat ramnózu a xylózu. Do zkumavek bylo rozplněno 5 ml připraveného media obsahujícího 1 % uvedeného cukru a byla provedena sterilizace v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Sterilní kličkou byla do zkumavek zaočkována testovaná kultura a byla provedena inkubace při 30 °C po dobu 2 dní. Po inkubaci byly barevné změny vyhodnoceny.

4.3.5 Izolace DNA z bakteriálních kultur varem

Z 24 hodinové bakteriální kultura inkubované na GTK byly odebrány 3 kolonie do 100 µl PCR pufru ThermoPol, zhomogenizovány (vertex) a krátce odstředěny při 3000 ot./1 minutu.

Získaná suspenze byla v termobloku inkubována při teplotě 95 °C po dobu 20 minut a následně byla provedena centrifugace při 10 000 ot./4 minuty. Převedený sediment do čisté ependorfy sloužil jako templát pro PCR reakci.

4.3.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Principem PCR je opakované nakopírování vzorové (templátové) molekuly DNA. Inkubací vzorku při vysoké teplotě dojde k denaturaci templátové DNA, uvolnění vazeb vodíků mezi bázemi komplementárních nukleotidů a rozpojení dvoušroubovice DNA na dvě šroubovice. Následuje hybridizace reakční směsi, kdy dojde k nasednutí komplementárních primerů na specifická místa DNA při teplotě 60 °C. Posledním krokem je syntéza nového řetězce DNA působením enzymu DNA polymerázy. Při teplotě 74 °C dochází k prodlužování primerů podle templátu. Tento cyklus je opakován přibližně 30 krát [49].

Složení PCR reakční směsi – celkový objem 25 µl:

- PCR pufr ThermoPol	2,5 µl
- dNTP mix	0,5 µl
- <i>Taq</i> DNA polymeráza	0,1 µl
- primer - F (dle Tab. č. 2)	0,25 µl
- primer - R (dle Tab. č. 2)	0,25 µl
- templátová DNA (matrice)	2,5 µl
- destilovaná voda	18,9 µl

Amplifikační reakce probíhající v termocykleru

Počáteční denaturace	95°C/5 minut
Počet opakovaných cyklů	35x
Denaturace	95 °C/1 minuta
Annealing	60 °C/1 minutu
Extenze	70 °C/1 minuta
Závěrečná extenze	70 °C/3 minut
Chlazení	4 °C/ ∞

Detekce získaných PCR produktů byla provedena elektroforézou v 1,0% agarózovém gelu za použití barviva etidium bromidu. Působením elektrického pole došlo k migraci záporně nabitě DNA ke kladně nabitě anodě [49]. Následně byl gel pozorován pod UV světlem a zdokumentován.

Agarózový gel 1,0%

Agaróza	2,0 g
Koncentrovaný TAE pufr	198 ml

Po rozpuštění agarózy bylo provedeno rozvaření směsi v mikrovlnné troubě. Do vychlazeného roztoku na 45 °C bylo přidáno 10 µl barviva etidium bromidu (EtBr). Agarózový gel byl do formy elektroforézy přelit k zatuhnutí, současně byly vloženy hřebínky pro vpravení

vzorků. Zatuhnutí probíhalo za laboratorní teploty ve vodorovné poloze, následně byly hřebínky vytaženy.

Elektroforéza:

Připravený gel byl zalit takovým množstvím 1x TAE pufrem, aby byl celý ponořen. Do první jamky bylo nanášeno 15 μ l markeru 100 bp DNA Ladder. Další jamky obsahovaly 25 μ l testovaných vzorků a 5 μ l nanášecího pufu LB. Elektroforéza probíhala po dobu 40 minut.

Vizualizace DNA:

Po ukončení elektroforetických reakcí byl gel z elektroforetické vany vyjmut a po umístění na UV transiluminátor a pozorován pod UV světlem. Byla pořízena fotodokumentace.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Součástí praktické části byly mikrobiologické testy provedené ve třech experimentech:

1. experiment – výrobky zakoupené 23. 5. 2010, stanovení mikroorganismů ve vzorcích sýrů zrajících pod mazem 1 až 6 (*Tab. 3*), skladovaných při teplotě do 8 °C a to vždy z povrchu a uvnitř výrobku. *Listeria monocytogenes* byla odebírána ze vzorku jedenkrát vždy z povrchu sýrů. Studie ukazují výskyt *L. monocytogenes* hlavně na povrchu sýrů [64, 65, 66, 67].
2. experiment – výrobky zakoupené 30. 5. 2010, stanovení mikroorganismů ve - vzorcích sýrů zrajících pod mazem č. 7 až 12 (*Tab.3*), skladovaných při teplotě do 8 °C a to vždy z povrchu a uvnitř výrobku. *Listeria monocytogenes* byla odebírána z povrchu vzorků.
3. experiment – stanovení mikroorganismů v 6 vzorcích sýrů zrajících pod mazem (*Tab. 4.*), skladovaných při laboratorní teplotě 25 °C, po dobu 7 dnů (vzorky 7 až 12) a 14 dnů (vzorky 1 až 6) a to vždy z povrchu a uvnitř výrobku.

Výpočty získaných výsledků byly provedeny dle vzorců uvedených v jednotlivých normách (CPM, koagulázopozitivní stafylokoky, *L. monocytogenes*). Vyjádření výsledků koliformních bakterií, plísní a kvasinek bylo provedeno dle ČSN EN ISO 7218 [68].

5.1 MIKROBIOLOGICKÉ TESTY

5.1.1 Experiment 1 a 2

V experimentech 1 a 2 byly provedeny mikrobiální rozborů 6 vzorků sýrů skladovaných při 8 °C. Výsledky stanovení sledovaných mikroorganismů (CPM, koliformní bakterie, plísně a kvasinky, koagulázopozitivní stafylokoky) jsou uvedeny v *Tab. 5 a 6*.

Stanovení přítomnosti bakterie *Listeria monocytogenes* bylo v těchto sledovaných vzorcích vyhodnoceno jako negativní v 25 g.

Tab. 5. Výsledky rozborů vzorků experimentu č. 1 v hodnotách KTJ/g.

Druh stanovení	Romadur		Pepin		Romadůžek	
	1	2	3	4	5	6
CPM	$5,4 \cdot 10^7$	$2,9 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^6$	$5,2 \cdot 10^7$	$4,1 \cdot 10^7$
koliformní bakterie	$2,1 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^2$	95	82	< 10	< 10
plísňe a kvasinky	$1,4 \cdot 10^6$	< 10^3	$1,1 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^6$	$8,0 \cdot 10^7$	$2,9 \cdot 10^7$
koagulázopozitivní stafylokoky	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

Kde: 1 – Romadur povrch, 2 – Romadur zevnitř, 3 – Pepin povrch, 4 – Pepin zevnitř, 5 – Romadůžek povrch, 6 – Romadůžek zevnitř

Tab. 6. Výsledky rozborů vzorků experimentu č. 2 v hodnotách KTJ/g.

Druh stanovení	Hermadur		Tvarůžky kolečka		Tvarůžky kousky s kmínem	
	7	8	9	10	11	12
CPM	$1,0 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$8,5 \cdot 10^8$	$6,1 \cdot 10^8$
koliformní bakterie	$2,4 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^2$	< 10	< 10	$3,6 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^3$
plísňe a kvasinky	$5,1 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^7$	$3,6 \cdot 10^7$
koagulázopozitivní stafylokoky	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

Kde: 7 – Hermadur povrch, 8 – Hermadur zevnitř, 9 – Tvarůžky kolečka povrch, 10 – Tvarůžky kolečka zevnitř, 11 – Tvarůžky kousky s kmínem povrch, 12 – Tvarůžky kousky s kmínem povrch zevnitř.

Ze získaných hodnot dle Tab. 5 a 6. lze vyhodnotit jednotlivé počty mikroorganismů KTJ/g u testovaných vzorků sýrů. Z pohledu nařízení 2073/2005 [42], kde jsou stanoveny hodnoty pro mikroorganismus *Listeria monocytogenes* a koagulázopozitivní stafylokoky, byly získané výsledky vyhovující ve všech případech. V tomto nařízení nejsou limity pro CPM, koliformní bakterie, plísňe a kvasinky stanoveny.

Celkový počet mikroorganismů

ČSN 56 9609 [43] neuvádí limit pro stanovení CPM u zrajících sýrů, nelze tedy tento výsledek vyhodnotit. Tento limit pro sýry zrající pod mazem není stanoven, pravděpodobně z důvodu záměrně přidávané kulturní mikroflóry ve vysokých počtech, jejichž počty jsou rozdílné dle použité technologie zrajících sýrů. Na množství a druhu použité kulturní povrchové mikroflóry, závisí také aroma tj. produkce těkavých sloučenin [69]. *Brevibacterium*

linens je hlavním představitelem mikroorganismu rostoucího na povrchu těchto sýrů [70]. V době zabalení výrobků, jeho expedice, skladování v maloobchodech a konečně u spotřebitele doma, probíhají neustálé reakce spojené se změnami při dozrávání těchto sýrů a přítomné mikroflóře záměrně přidávané dle jednotlivých druhů sýrů. U sledovaných vzorků byly zjištěny hodnoty CPM mezi 10^6 - 10^8 KTJ/g. Tyto zjištěné počty mikroorganismů mohou zahrnovat mezofilní kyselé kultury rodů *Lactococcus* a *Leuconostoc*, termofilní kyselé kultury rodů *Streptococcus* a *Lactobacillus*, dále bakterii *Brevibacterium linens*, *Staphylococcus xylosus*, rody *Corynebacterium*, *Microbacterium* a kvasinky *Debaryomyces hansenii* [71] a další rody *Kluyveromyces*, *Torulopsis*, *Candida*, popřípadě kulturních plísní *Geotrichum candidum* [20, 23].

Koliformní bakterie

ČSN 56 9609 [43] stanovuje limit m 10^4 a M 10^5 , při provedení rozboru 5x. Ze zjištěných hodnot je zřejmé, že vzorky 5, 6, 9 a 10 (Romadůžek povrch a zevnitř, Tvarůžky kolečka povrch) byly bez přítomnosti koliformních bakterií, což značí vysokou úroveň čistoty při výrobě těchto potravin. Ve vzorku 2, 3, 4, 8 a 12 (Romadur zevnitř, Pepin povrch a zevnitř, Hermadur zevnitř, Tvarůžky kousky s kmínem zevnitř) byla zjištěna přítomnost koliformních bakterií odpovídající stanovenému limitu normy m 10^4 . Vzorek 1, 7 a 11 (Romadur povrch, Hermadur povrch a Tvarůžky kousky s kmínem povrch) se zjištěnými hodnotami v rozmezí $> 10^4$ a $< 10^5$ byl vyhodnocen jako vyhovující stanoveným limitům limit m 10^4 a M 10^5 , ale pouze s přihlédnutím k provedení pouze jednoho stanovení, norma stanovuje provedení rozboru 5x. V případě provedení rozboru jedenkrát platí hodnota vyšší, tedy M 10^5 , které zjištěné výsledky vyhovují. Výsledky provedených rozborů ukazují na skutečnost, že na povrchu sýrů zrajících pod mazem byly zjištěny vyšší počty koliformních bakterií než u vzorků odebraných zevnitř výrobků, což potvrzuje i irská studie [72].

Koliformní bakterie jsou fakultativně anaerobní mikroorganismy patřící společně s bakterií *Escherichia coli* O157: H7 [20, 73, 74], enterokoky a bifidobakteriemi do skupiny tzv. indikátorů fekálního znečištění a jsou přirozenou mikroflórou trávicího traktu člověka a zvířat. Koliformní bakterie představují skupinu čtyř rodů bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* – *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia* a *Klebsiella*. Při výskytu v potravinách poukazují na nedodržení hygienických požadavků při výrobě [73, 75, 76, 77, 78]. U vzorků 1 a 2 (Romadur povrch a zevnitř) narostly na mediu VRBL mimo typické kolonie i kolonie bílé barvy - laktózanegativní. Pro vyloučení přítomnosti bakterií rodu *Salmonella* bylo prove-

deno vyočkování těchto laktóza negativních kolonií bílé barvy na XLD agar. Kultivace byla provedena v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin, aerobně. Kultivací nebyly zjištěny typické průsvitné kolonie s černým středem poukazující na salmonely.

Plísně a kvasinky

Při hodnocení plísní a kvasinek ve vzorcích lze pozorovat, že nárůsty na daného druhu sýrů na povrchu a uvnitř jsou obdobné ($10^3 - 10^7$ KTJ/g). Kvasinky jsou fakultativně anaerobní mikroorganismy, schopny za anaerobních podmínek změnit metabolismus na fermentační. Pro tento druh sýrů je charakteristický výskyt vysokých počtů kvasinek, protože patří mezi základní mikroorganismy, díky kterému získává sýr při dozrávání charakteristické aroma, chuť a požadovanou konzistenci [20, 73, 75]. Na povrchu sýrů lze nalézt kvasinky *Debaryomyces hansenii*, *Galactomyces Geotrichum* byly zjištěny v syřidlech sýrů, *Kluyveromyces marxianus* a *Pichia membranifaciens* byly přítomny v kyselém tvarohu sýrů [75, 77, 79].

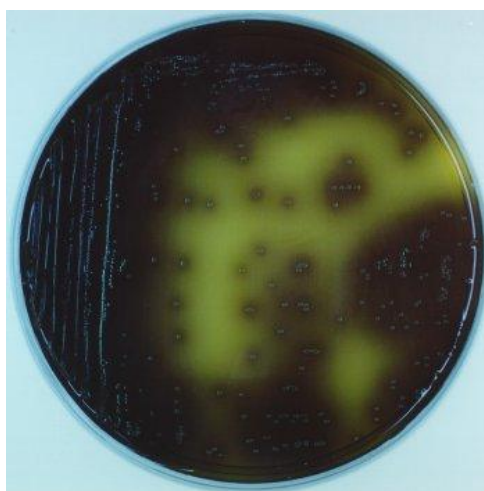
***Staphylococcus aureus*, koagulázopozitivní stafylokoky**

Při provedených testech na půdě Baird – Parker nebyl po inkubaci zjištěn nárůst typických černých nebo šedých, lesklých a vypouklých kolonií, obklopených zónou projasnění [59]. *Staphylococcus aureus* nebyl provedenými rozbory zjištěn u žádného z testovaných vzorků.

Počty *Staphylococcus aureus* jsou ve většině sýrů nejvyšší 2 – 3 dny po výrobě. Jejich počty mohou být výrazně sníženy během skladování, především skladováním při chladírenských teplotách. Pokud však koncentrace *S. aureus* v každém výrobním kroku překračuje hodnotu 10^5 KTJ/g, pak existuje riziko, že *S. aureus* může tvořit enterotoxiny, které v sýru zůstanou bez ohledu na zbývající počty této bakterie [79]. Nařízení 2073/2005 stanovuje pro sýry, sušené mléko a sušenou syrovátku nulový limit stafylokokových enterotoxinů ve 25 g stanovovaného vzorku. Dále stanovuje pro sýry vyrobené z mléka, které bylo podrobena nižšímu tepelnému ošetření než pasterací a zrající sýry vyrobené z pasterovaného mléka či silně tepelně ošetřeného mléka limit m 10^2 KTJ/g a M 10^3 KTJ/g [42]. Z uvedeného vyplývá, že velký význam má způsob ošetření vstupní suroviny. Právě u sýrů vyrobených z nepasterovaného mléka ovčího, kozího [80], kravského byl zjištěn výskyt stafylokokových enterotoxinů [81]. K výskytu *S. aureus* ve výrobcích může dojít také sekundární kontaminací prostřednictvím nehygienické manipulace s produkty [75, 79].

Listeria monocytogenes

Při stanovení *Listeria monocytogenes* metodou průkazu [61] došlo po inkubaci na půdě Listeria Oxford Agar k nárůstu typických tmavých drobných kolonií, obklopených černou zónou. Po 48 hodinách měly tyto kolonie vpáčený střed, což je charakteristické pro *L. monocytogenes* (Obr. 5).



Obr. 5. Růst *L. monocytogenes* na Listeria Oxford Agar [82].

Počty narostlých kolonií na půdě Listeria Oxford Agar ve stanovovaných vzorcích jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7. Počty typických/atypických kolonií na půdě Listeria Oxford Agar ve stanovovaných vzorcích v KTJ/g.

Vzorek	Sýr	Půda LOA ½ Fraser	Půda LOA plný Fraser	Výskyt typických/atypických kolonií
A	Romadur	5	1	Černé kolonie, bez zbarvení půdy
B	Pepin	0	0	Bez nárůstu
C	Romadůžek	0	0	Bez nárůstu
D	Hermadur	51	Přerostlé	Černé kolonie, vpáčený střed, černé zbarvení půdy
E	Tvarůžky kolečka	3	Přerostlé	Černé kolonie, vpáčený střed, černé zbarvení půdy
F	Tvarůžky kousky s kmínem	13	Přerostlé	Černé kolonie malé a velké, vpáčený střed, černé zbarvení půdy

Kde: 19 – Hermadur povrch, 20 – Hermadur zevnitř, 21 – Tvarůžky kolečka povrch, 22 – Tvarůžky kolečka zevnitř, 23 – Tvarůžky kousky s kmínem povrch, 24 – Tvarůžky kousky s kmínem povrch zevnitř.

Skladováním sýrů při teplotě 25 °C došlo u všech výrobků k nárůstu počtů mikroorganismů. V případě celkových počtů aerobních mezofilních mikroorganismů došlo k mírnému zvýšení jak na povrchu sýrů, tak uvnitř u všech sledovaných vzorků, což lze přisuzovat optimální teplotě. Teplota skladování 25 °C je teplotou příznivou pro růst kulturní mikroflóry, ale i mikroflóry kontaminující [75, 77].

Počty koliformních bakterií u vzorků na povrchu a uvnitř, ve kterých byl zjištěn výskyt koliformních bakterií při stanovení v bloku rozborů č. 1 a 2 testů 13, 14, 15, 16, 19, 20, 23 a 24 (Romadur povrch, zevnitř, Pepin povrch, zevnitř, Hermadur povrch, zevnitř a Tvarůžky kousky s kmínem povrch, zevnitř) masivně vzrostly o 2 a více řádů, což lze přisuzovat právě skladování při pokojové teplotě 25 °C. Tyto podmínky skladování sýrů, mimo chladicí zařízení, umožňují rychlejší růst těchto mikroorganismů než kulturní mikroflóry [71, 75]. Výrobci na obalech těchto potravin deklarují teplotu skladování do 8 °C, která umožňuje zrání výrobku, ale zároveň je jednou z bariér proti nežádoucímu pomnožení nežádoucí mikroflóry [79]. Tyto vzorky byly vyhodnoceny dle ČSN 56 9609 ve znaku koliformní bakterie z důvodu překročení povolené hodnoty $M 10^5$ jako nevyhovující nejvyšší povolené hodnotě. Vzorky 17, 18, 21 a 22 (Romadůžek povrch, zevnitř a Tvarůžky kolečka povrch, zevnitř) zůstaly prosté koliformních bakterií, vyhověly požadavkům ČSN 56 9609, což ukazuje na vysoký stupeň hygieny při výrobě těchto výrobků.

U vzorků 13 a 14 (Romadur povrch a uvnitř) narostly opět mimo typické kolonie i kolonie laktózanegativní, proto bylo provedeno vyočkování těchto kolonií na XLD agar, pro vyloučení přítomnosti bakterií rodu *Salmonella*. Kultivací nebyla potvrzena přítomnost salmonel.

Počty kvasinek a plísní u vzorků 15, 21 až 24 (Pepin povrch, Tvarůžky kolečka povrch, zevnitř a Tvarůžky kousky s kmínem povrch, zevnitř) se skladováním při 25 °C o 1 řád zvýšily z 10^7 na 10^8 . U sýru vyrobeného sladkým srážením (vzorek 13 - Romadur povrch) došlo ke snížení počtů kvasinek. U vzorků 14, 16, 19 (Romadur zevnitř, Pepin zevnitř, Hermadur povrch) zůstaly hodnoty stejné. U ostatních vzorků 17, 18 a 20 (Romadůžek povrch, zevnitř a Hermadur zevnitř) došlo tímto skladováním ke snížení počtu kvasinek, a to u Romadůžku z 10^7 na 10^3 , Hermaduru z 10^7 na 10^6 . U vzorku Romadůžek došlo nao-

pak k masivního snížení počtu kvasinek z 10^7 na 10^3 , skladovaného po dobu 14 dnů při teplotě 25 °C, zároveň vzrostly počty CPM, ale vzorek byl prostý koliformních bakterií.

Při výrobě Romadůžku je používána mazová kultura rodu *Brevibacterium* [21] s optimem růstu mezi 20 – 30 °C [23]. Ze zjištěného lze vyvodit, že právě skladováním při vysoké teplotě 25 °C po dobu 14 dnů, došlo k pomnožení proteolytické kultury na úkor kvasinek, kdy byl pozorován silný povrchový maz až se štiplavým zápachem, ukazující na nevhodnou teplotu skladování.

Koagulázopozitivní stafylokoky opět nebyly zjištěny u vzorků skladovaných při 25 °C. Jak již bylo popsáno výše, počty *Staphylococcus aureus* jsou ve většině sýrů nejvyšší 2 – 3 dny po výrobě. Jejich počty mohou být výrazně sníženy odpovídající teplotou skladování [80]. Mazová kultura *B. linens* je schopna produkce bakteriocinů a látek inhibujících růst bakterií způsobujících otravy z potravin jako je *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* a *Staphylococcus aureus* [23].

5.2 VYHODNOCENÍ KMENŮ IZOLOVANÝCH ZE VZORKŮ

Dle nárůstů na Listeria Oxford Agar (Tab. 7) u stanovovaných vzorků byly vybrány k dalšímu testování kolonie vzorků D, E a F (Hermadur, Tvarůžky kolečka a Tvarůžky kousky s kmínem). Narostlé kolonie byly přeočkovány na půdy LOA a GTK, kultivovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Z takto získaných čistých kultur byly provedeny následující konfirmační testy: Gramovo barvení, test KOH, kataláza, OF test, OXI test, cukry (xylóza a ramnóza). Po zpracování získaných výsledků byla provedena PCR (viz. kapitola 5.2.2).

5.2.1 Konfirmační testy

Výsledky provedených konfirmačních testů jsou uvedeny v Tab. 10 a 11.

Tab. 10. Výsledky konfirmačních testů sledovaných izolátů z medií LOA a GTK.

Vzorek	Gram	KOH	Kataláza	OXI test
D	G+ koky	Negativní	Negativní	Negativní
E	G+ tyčinky	Negativní	Pozitivní	Negativní
Fv	G+ koky	Negativní	Negativní	Negativní
Fm	G+ koky až tyčinky	Negativní	Negativní	Negativní

Kde: D – Hermadur, E – Tvarůžky kolečka, Fv – Tvarůžky kousky s kmínem velké kolonie, Fm – Tvarůžky kousky s kmínem malé kolonie.

Tab. 11. Výsledky testů cukrů sledovaných vzorků.

Vzorek	Xylóza	Ramnóza	OF- test
D	Negativní	Negativní	Oxidace -
			Fermentace -
E	Negativní	Negativní	Oxidace +
			Fermentace +
Fv	Negativní	Negativní	Oxidace +
			Fermentace -
Fm	Negativní	Negativní	Oxidace +
			Fermentace +

Kde: D – Hermadur, E – Tvarůžky kolečka, Fv – Tvarůžky kousky s kmínem velké kolonie, Fm – Tvarůžky kousky s kmínem malé kolonie.

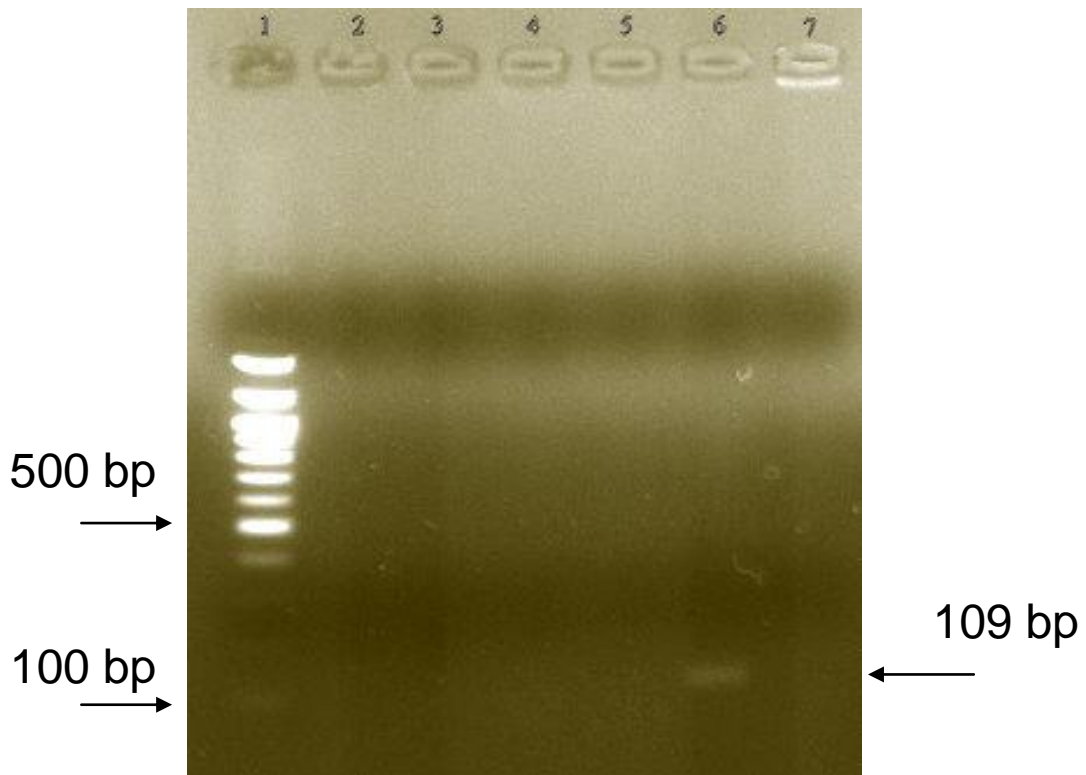
Listeria monocytogenes je nesporulující tyčinka až kokobacil s výrazným pohybem. Je kataláza pozitivní [60, 61, 83, 84], oxidáza negativní, acetoin pozitivní, hydrolyzuje eskulin, ale ureu, kasein a želatinu nehydrolyzuje, fermentace glukózy je pozitivní, je β – hemolytická [60, 84]. Tvoří kyseliny z L – ramnózy, ale kyseliny z D – xylózy netvoří, CAMP test je pozitivní [61, 85].

Z vybraných kmenů k dalšímu zkoumání bylo dle Gramova barvení zjištěno, že izoláty E a Fm jsou grampozitivní tyčinky, obdobně jako *L. monocytogenes*. KOH test byl použit pro potvrzení správnosti Gramova barvení. Pouze izolát E byl kataláza pozitivní. Dále *L. monocytogenes* zkvašuje cukry glukózu (pozitivní OF test) a ramnózu, xylóza je naopak negativní [61, 84], tomuto schématu neodpovídal žádný vzorek. Všechny vzorky byly ramnóza negativní. Nejblíže testům odpovídajícím vlastnostem *L. monocytogenes* byly vzorky E – Tvarůžky kolečka a Fm – Tvarůžky kousky s kmínem.

5.2.2 PCR

Konečným rozbořem pro potvrzení či vyvrácení, zda se jedná o patogenní *Listeria monocytogenes*, bylo provedení PCR za použití specifických primerů dle Tab. 2. s DNA izolova-

nou z kmenů D, E a Fm. Primery ohraničují úsek, který se nachází ve sledovaném genu *actA*. Dále byly při PCR použity kontrolní kmeny *L. monocytogenes* a *L. innocua*. Velikost specifického PCR produktu má odpovídat 109 bp, jak je patrné z pozitivní kontroly – jamka 6. Všechny testované izoláty byly negativní na přítomnost genu *actA* (Obr. 6), tudíž bylo prokázáno, že se nejedná o *L. monocytogenes*.



Obr. 6. Výsledky PCR.

Kde: 1 – 100 bp DNA marker, 2 - vzorek D, 3 – vzorek E, 4 - vzorek Fm, 5 - *L. innocua*, 6 - *L. monocytogenes*, 7 - negativní kontrola (*Escherichia coli*).

5.3 VZORKY ODEBRANÉ KONTROLNÍMI ORGÁNY

5.3.1 Výsledky *Listeria monocytogenes* SZPI za rok 2007 - 2010

Výsledky mikrobiologických rozborů *Listeria monocytogenes* sýrů zrajících pod mazem provedených SZPI jsou uvedeny v Tab. 12 .

Tab.12. Stanovení *Listeria monocytogenes* – metoda průkazu a počtu u vzorků sýrů zrajících pod mazem, SZPI [86].

Země původu sýrů/rok	Počet vzorků	Vyhovuje	Nevyhovuje	X
2007				
Česká republika	27	27	0	-
EU	8	8	0	-
celkem	35	35	0	-
2008				
Česká republika	46	46	0	-
EU	12	12	0	-
celkem	58	58	0	-
2009				
Česká republika	20	20	0	-
EU	5	5	0	-
celkem	25	25	0	-
2010				
Česká republika	47	23	0	24
EU	9	9	0	0
celkem	56	32	0	24

Kde: X- vzorek byl odebrán 1x, s vyhovujícím výsledkem.

Výsledky byly vyhodnoceny dle požadavků přílohy 1, kapitoly I, články 1.2. a 1.3. nařízení (ES) č. 2073/2005, ve znění pozdějších předpisů:

- článek 1.3. stanovení počtu *Listeria monocytogenes* 100 KTJ/g ,
- článek 1.2. přítomnost *Listeria monocytogenes* negativní v 25 g.

5.3.2 Výsledky *Listeria monocytogenes* SVS za rok 2007 - 2010

Výsledky mikrobiologických rozborů vzorků zrajících sýrů pod mazem provedených kontrolním orgánem Státní veterinární správy jsou uvedeny v Tab. 13.

Tab.13. Stanovení *Listeria monocytogenes* – metoda průkazu vzorků sýrů zrajících pod mazem, SVS [87].

Rok	Počet vzorků	Vyhovuje	Nevyhovuje
2007	1225	1161	64
2008	516	508	8
2009	420	411	9
2010	496	488	8

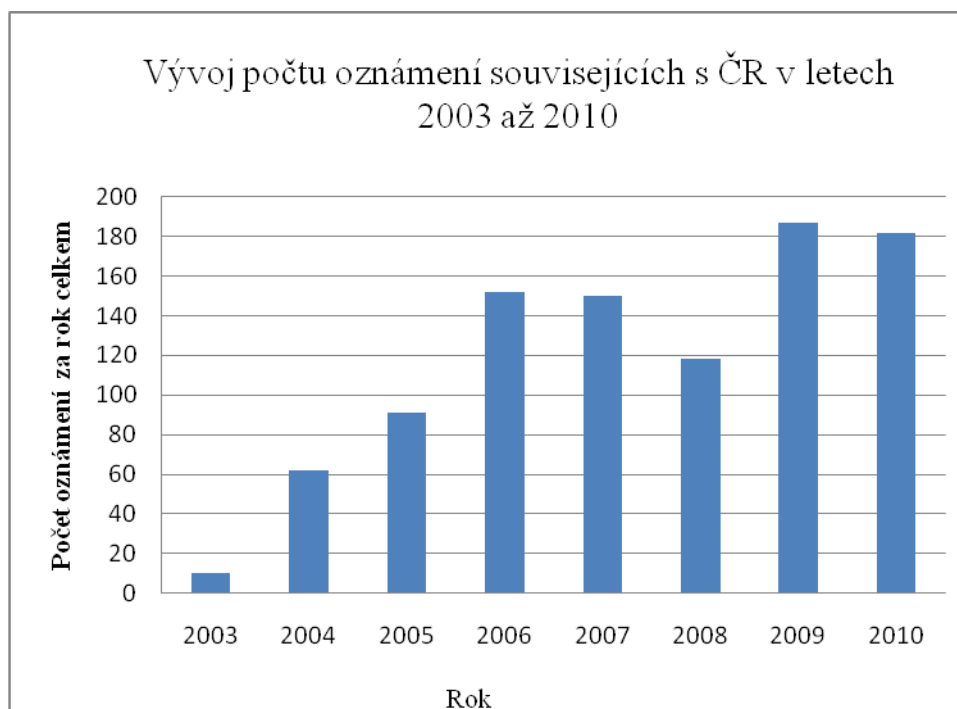
5.4 VÝSLEDKY HLÁŠENÍ RASFF V ROCE 2005 – 2009

V roce 2003 byl zahájen zkušební provoz systému RASFF zveřejněním dokumentu „Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva v České republice“ ve Věstníku Ministerstva zemědělství. Plnohodnotným členem sítě evropského systému RASFF se naše země stala dnem vstupu do Evropské unie. Ministerstvo zemědělství každoročně vydává Zprávu o činnosti systému rychlého varování pro potraviny a krmiva v České republice [88]. Obsahem této zprávy je mimo jiné výčet oznámení přijatých systémem RASFF v ČR, oznámení odeslaných systémem RASFF v ČR týkající se kontroly trhu a dovozu. Výčet těchto informací za rok 2005 – 2009 týkajících se *Listeria monocytogenes* je uveden v Tab. 14 až 19.

Tab. 14. Vývoj počtu oznámení souvisejících s ČR od roku 2003 [45, 89].

Rok	Oznámení přijatá	Oznámení odeslaná, kontrola trhu	Oznámení odeslaná, kontrola dovozu	Oznámení celkem
2003	10	-	-	10
2004	18	17	27	62
2005	51	38	7	91
2006	75	73	4	152
2007	76	72	2	150
2008	62	52	4	118
2009	118	60	9	187
2010	91	84	7	182

Graf 1. Vývoj počtu oznámení RASFF v ČR od roku 2003



Oznámení jsou rozdělována podle kritérií:

- kategorie nevyhovujících výrobků,
- typ nebezpečí.

Kategorie nevyhovujících výrobků: ovoce a zelenina, tuky a oleje, obiloviny a výrobky z nich, mléko a mléčné výrobky, koření a omáčky, maso a výrobky z masa, suché skořápkové plody, ryby a rybí výrobky, cukrovinky, krmiva a ostatní.

Rozdělení dle typu nebezpečí: těžké kovy, cizí těleso, rezidua pesticidů, mykotoxiny, rezidua veterinárních léčiv, mikrobiologické kontaminanty (MK), chemické kontaminanty, aditivum krmiv a ostatní [88].

Počty jednotlivých oznámení a jejich rozdělení dle mikrobiologických kontaminantů je uvedeno v *Tab. 15 až 19*.

Tab. 15. Počty mikrobiologických kontaminantů v oznámeních RASFF v ČR v roce 2005 [88].

Počty oznámení	Celkem	Mikrobiologické kontaminanty		
		Počet vzorků	<i>Listeria monocytogenes</i>	Ostatní
Oznámení přijatá	51	7	1x Klobása „fuet“	4x <i>Salmonella</i> 2x <i>Escherichia coli</i>
Oznámení odeslaná, kontrola trhu	38	1	-	1x koliformní bakterie
Oznámení odeslaná, kontrola dovozu	7	0	-	-

Tab. 16. Počty mikrobiologických kontaminantů v oznámeních RASFF v ČR v roce 2006 [90].

Počty oznámení	Celkem	Mikrobiologické kontaminanty		
		Počet vzorků	<i>Listeria monocytogenes</i>	Ostatní
Oznámení přijatá	75	8	1x Brynza	5x <i>Salmonella</i> 1x plíseň
Oznámení odeslaná, kontrola trhu	73	5	2x zrající sýr	2x <i>Salmonella</i> 1x plíseň
Oznámení odeslaná, kontrola dovozu	4	0	-	-

Tab. 17. Počty mikrobiologických kontaminantů v oznámeních RASFF v ČR v roce 2007 [91].

Počty oznámení	Celkem	Mikrobiologické kontaminanty		
		Počet vzorků	<i>Listeria monocytogenes</i>	Ostatní
Oznámení přijatá	76	9	2x sýr s modrou plísní 1x uzený losos	1x <i>Bacillus licheniformis</i> 3x <i>Salmonella</i> , 1x plíseň 1x <i>Escherichia coli</i> a <i>Pseudomonas</i>
Oznámení odeslaná, kontrola trhu	72	6	4x uzený losos 1x potraviná (bez názvu)	6x plíseň
Oznámení odeslaná, kontrola dovozu	2	0	-	-

Tab. 18. Počty mikrobiologických kontaminantů v oznámeních RASFF v ČR v roce 2008 [92].

Počty oznámení	Celkem	Mikrobiologické kontaminanty		
		Počet vzorků	<i>Listeria monocytogenes</i>	Ostatní
Oznámení přijatá	62	9	2x Ovčí sýr ricotta	5x <i>Salmonella</i> , 1x plíseň 1x <i>Escherichia coli</i> (EHEC)
Oznámení odeslaná, kontrola trhu	52	6	1x Vakuovaná debrecínská pečeně	1x <i>Salmonella</i> , 4x plíseň
Oznámení odeslaná, kontrola dovozu	4	0	-	-

Tab. 19. Počty mikrobiologických kontaminantů v oznámeních RASFF v ČR v roce 2009 [45].

Počty oznámení	Celkem	Mikrobiologické kontaminanty		
		Počet vzorků	<i>Listeria monocytogenes</i>	Ostatní
Oznámení přijatá	118	4	1x sýr Epoisse, 1x filety z makrely	1x <i>Salmonella</i> , 1x plíseň
Oznámení odeslaná, kontrola trhu	60	7	1x Filety z makrely s kořením	4x <i>Salmonella</i> , 2x plíseň
Oznámení odeslaná, kontrola dovozu	9	1	-	1x plíseň

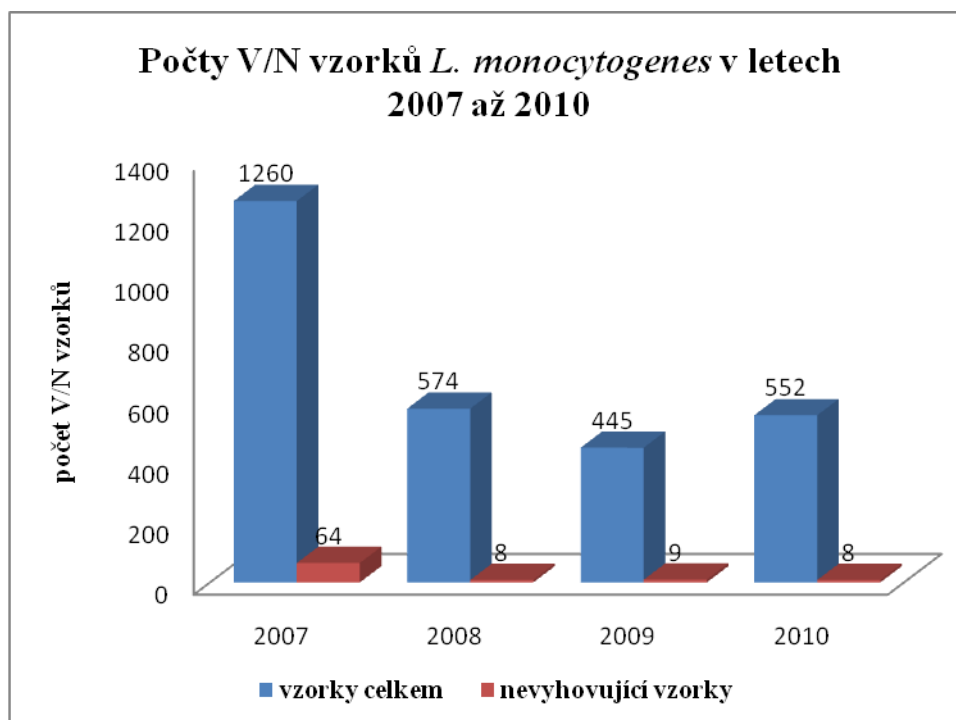
V roce 2010 bylo přijato celkem 182 oznámení týkajících se ČR, z toho bylo 91 oznámení přijatých, 84 oznámení odeslaných (kontrola trhu) a 7 oznámení přijatých (kontrola dovozu) [89]. Zpráva za rok 2010, ve které jsou uvedeny konkrétní potraviny a důvod zaslání do systému RASFF, kterou vydává každý rok Ministerstvo zemědělství, nebyla dosud za tento rok vydána.

5.5 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ DOZOROVÝCH ORGÁNŮ A RASFF

5.5.1 Dozorové orgány

Kontrolní orgány, které provádějí odběr vzorků sýrů *Listeria monocytogenes* (SVS a SZPI) odebraly v roce (Graf 2):

- 2007 celkem 1260 vzorků, z nichž bylo 64 nevyhovujících, což je 5,08 %,
- 2008 celkem 574 vzorků, z nichž bylo 8 nevyhovujících, což je 1,39 %,
- 2009 celkem 445 vzorků, z nichž bylo 9 nevyhovujících, což je 2,02 %,
- 2010 celkem 552 vzorků, z nichž bylo 8 nevyhovujících, což je 1,45 %.

Graf 2. Počty V/N vzorků *L. monocytogenes* v letech 2007 až 2010

Sýry zrající pod mazem patří mezi významné rizikové potraviny z pohledu listeriózy u lidí [93]. Poslední významná epidemie listeriózy byla v ČR zaznamenána na přelomu roku 2006 a 2007. Tato epidemie byla, po zjištění dozorových orgánů, vyvolána třemi potravinami: zrajícím sýrem, hermelínovým a pochoutkovým salátem, které hlavní hygienik ČR označil za nebezpečné [94]. V roce 2006 bylo hlášeno 80 onemocnění listeriózou, z nichž zemřelo celkem 13 osob starších 70 let, z toho dva novorozenci. Na začátku roku 2007 bylo hlášeno dalších 7 případů, kdy zemřel další novorozenec. Mortalita této epidemie činila 16,3 %, což bylo s pohledu poslední velké epidemie v roce 2003, kdy mortalita činila 30 %, bezmála poloviční hodnota [95]. Z těchto čísel je zřejmé, že *L. monocytogenes* je patogenem s vysokou úmrtností, což vede k odpovídajícímu respektu. Na základě těchto zjištění byla provedena řada kontrol dozorovými orgány u výrobců, odběry vzorků, s cílem zjistit příčinu vzniku epidemie a zastavení jejího šíření. Došlo ke stažení nebezpečných výrobků, prověření technologie výrob, dodržování hygienických požadavků při výrobě a provedení nápravných opatření, kdy byly zapojeny všechny dozorové orgány včetně orgánů ochrany veřejného zdraví [95]. Tyto výsledky jsou patrné z vysokého počtu odebraných vzorků kontrolními orgány provedenými v celé ČR v roce 2007. Počty nevyhovujících vzorků pro stanovení *L. monocytogenes* se rovnaly 5,08 % z celkového počtu odebraných 1260 vzorků za rok 2007. Z počtů nevyhovujících vzorků v letech 2008 tj. 8 vzorků (1,39 %) z 574

vzorků, v roce 2009 bylo zjištěno 9 nevyhovujících vzorků (2,02 %) z 445 odebraných vzorků a roce 2010 bylo 8 vzorků nevyhovujících (1,45 %) z celkového počtu 552 odebraných vzorků, lze usuzovat, že výskyt *L. monocytogenes* ve zrajících sýrech byl oproti roku 2007 snížen z 5,08 % na průměrně pod 2 %, což představuje pozitivní zjištění. Dvou procentní hranici by pak odpovídalo, že ze sta vzorků by 2 byly nevyhovující na stanovení *L. monocytogenes* u sýrů zrajících pod mazem. Z uvedeného je zřejmé, že ochranné mechanismy státu a navazující činnost kompetentních dozorových orgánů jsou efektivní a odpovídající reakce na vzniklou situaci na našem trhu, je adekvátní, což je zřejmé z nižších počtů nevyhovujících vzorků *L. monocytogenes* sýrů zrajících pod mazem.

Výsledky provedených rozborů této práci a získaných výsledků korespondují se zjištěními dozorových orgánů a studii [96, 97, 98].

5.5.2 RASFF

Do systému RASFF jsou hlášeny nebezpečné potraviny, které jsou distribuovány přes hranice zemí v rámci EU. V případě výskytu nebezpečné potraviny, která se vyskytuje pouze na území dané země a nedochází k vývozu za hranice, dozorové orgány společně s národním kontaktním místem (SZPI) rozhodnou zda bude potravina zaslána do systému RASFF.

Od roku 2005 do 2009 bylo přijato celkem 698 hlášení nebezpečných potravin, přičemž tyto počty mají stoupající tendenci, jak ukazuje *Graf 1*. V roce 2005 bylo přijato 91 oznámení celkem, v roce 2009 jich bylo již 187, což je více než dvojnásobek. V roce 2010 byly tyto hodnoty podobné, kdy bylo přijato 182 hlášení do systému RASFF.

Provozovatelé potravinářských podniků mají povinnost, dle článku 19 nařízení 178/2002, v případě zjištění, že potravina, kterou dovezl, vyrobil, zpracoval nebo uvedl na trh, není potravinou bezpečnou, zajistit bezodkladné stažení takovéto potraviny z trhu a uvědomit o tom příslušné dozorové orgány. K tomuto náleží formuláře, které tvoří *Přílohu PI*.

V případě oznámení do systému RASFF (*Příloha PII*), následuje celá řada ochranných opatření prováděných kompetentními dozorovými orgány, týkajících se zabránění výskytu takové potraviny na trhu, dosledování jednotlivých částí šarží, veškeré dokumentace týkající se dosledovatelnosti potraviny a jejich stažení z trhu.

V roce 2005 bylo přijato do systému RASFF celkem 91 oznámení, z toho bylo 8 oznámení týkající se mikrobiologických kontaminantů, což představuje 8,79 % z celkového počtu přijatých oznámení. Z tohoto počtu MK se jednalo o 1 případ *L. monocytogenes* (12,50 % z počtu MK).

V roce 2006 bylo přijato celkem 152 oznámení a z toho 8,55 % tvořily MK (13 oznámení) a 3 případy *L. monocytogenes* (23,10 %).

Rok 2007 přinesl 150 oznámení s počtem 15 MK (10,00 %) a nejvyšším 8 případů počtem *L. monocytogenes*, což představuje vysoké číslo 53,33 %.

V roce 2008 bylo přijato celkem 118 oznámení, z toho 15 MK (12,71 %) a 3 případy *L. monocytogenes*, představujících 20,00 %.

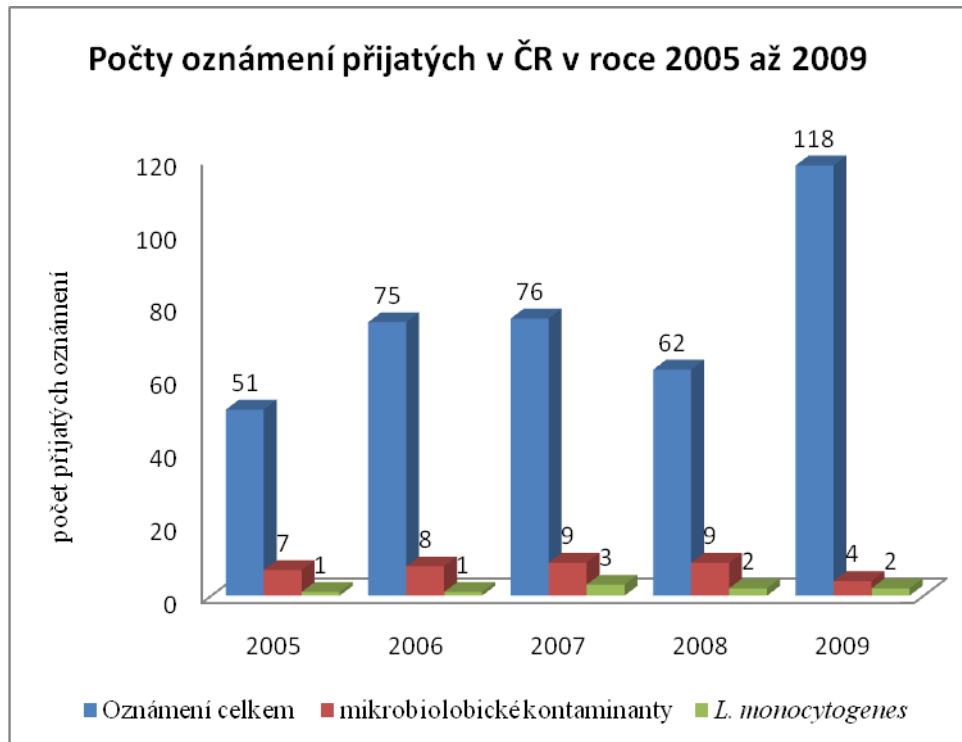
V roce 2009 bylo přijato celkem 187 oznámení, z toho 12 MK (6,42 %) a 3 případy *L. monocytogenes* (25,00 %).

Z uvedeného vyplývá, že z celkového počtu přijatých oznámení za uvedené období (2005 – 2009) 698, bylo 63 oznámení mikrobiologických kontaminantů (9,03 %) a 18 případů *L. monocytogenes*, což představuje 28,57 %. Toto velmi vysoké číslo ukazuje, že *L. monocytogenes* je významným patogenem. Ostatních 45 hlášených mikrobiálních kontaminantů připadlo mikroorganismům *Salmonella* spp., plísně a *Escherichia coli*.

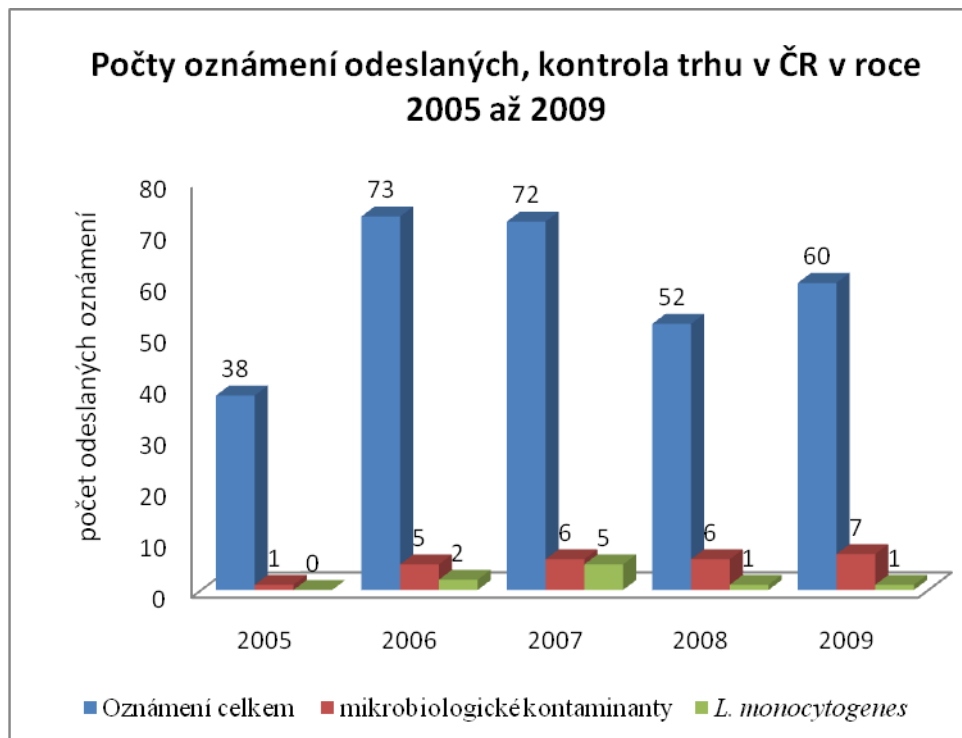
Celkem bylo tedy podáno v tomto období 18 případů *L. monocytogenes*, ze kterých se 8 případů týkalo sýrů (44,44 %). Tímto bylo potvrzeno, že sýry patří mezi významné potraviny s možností kontaminace *L. monocytogenes*. Pozitivním zjištěním je, že procentuální zastoupení výskytu *L. monocytogenes* od roku 2007 (53,33 %) má klesající tendenci, kdy v roce 2008 představovalo 20,00 % a v roce 2009 25,00 % z přijatých mikrobiologických kontaminantů. Ostatních 10 případů *L. monocytogenes* se týkalo potravin: filety z makrely, debrecínské pečeně, uzených lososů a klobásy.

Počty oznámení přijatých a odeslaných, kontrola trhu do systému RASFF jsou znázorněny v grafech 3 a 4.

Graf 3. Počty oznámení přijatých v ČR v r. 2005 – 2009.



Graf 4. Počty oznámení odeslaných, kontrola trhu v ČR v r. 2005 – 2009.



Z uvedeného srovnání lze vyvodit, že významným ochranným prvkem je právě systém HACCP, dle kterého lze velmi dobře předcházet možným nebezpečím. Provozovatelé potravinářského podniku by tedy měli provedení odpovídající a důkladné analýzy nebezpečí, ze které vychází celý systém HACCP, věnovat náležitou pozornost. Důkladným provedením této analýzy lze předvídat možná rizika a nastavit tak ochranné mechanismy, pro produkci bezpečných potravin vyplývající převážně v prevenci tj. zajištění veškerých nezavadných vstupních surovin a včetně jejich rozborů, náležité čistotě prostředí, výrobního zařízení, nebezpečí křížové kontaminace, čistoty pracovníků jejich hygienických návyků a také mikrobiální čistoty obalového materiálu. Důležitým krokem je provádění odpovídajících rozborů hotových výrobků a dodržení chladírenského řetězce [60, 79, 93].

Významný podíl na bezpečnosti potravin má však i celá distribuční síť a maloobchodní prodej ovlivňující jakost a bezpečnost potravin zejména jejich podmínkami skladování (vlhkost, teplota, světlo, škůdci apod.). V maloobchodní síti lze vidět zrající sýry skladované často na pultech s odůvodněním rychlejšího dozrávání tohoto druhu sýrů. Avšak naopak, tyto potraviny nevhodným skladováním mění složení, obsah nežádoucích mikroorganismů může vzrůst na nevyhovující, zdravotně závadné hodnoty. Stejně mohou vzniknout vady v chuti a vůni těchto výrobků, kdy dochází k přemnožení proteolytické kultury, nežádoucích mikroorganismů a produkci organických sloučenin, měnících vůni v zápach. Dalším významným parametrem při skladování při vysoké teplotě mimo chladicí zařízení je produkce biogenních aminů histamin, kadaverin, tyramin, putrescin. Obsah biogenních aminů významně vzrůstá s teplotou skladování mimo chladicí zařízení a zároveň dochází k sensorickým změnám výrobků zrajících sýrů [99]. Mezi významné sensorické látky patří vznikající při metabolických reakcích mikroorganismů hlavně povrchové mikroflóry aldehydy, estery, ketony, alkoholy a další. Jejich množství ovlivňuje aroma a chuť sýrů [69].

Stejně tak konečný spotřebitel významně ovlivňuje jakost a bezpečnost zakoupených potravin. Časté návyky nevhodného skladování a neznalost možných následků, kdy jsou zrající sýry skladovány na polici mimo chladicí zařízení, mohou vést ke konzumaci zdravotně závadných potravin. Teplota skladování těchto potravin je významnou bariérou proti jakostním změnám a konzumaci bezpečných potravin.

ZÁVĚR

Vstupem do EU se Česká republika zavázala dodržovat nadnárodní předpisy stanovené tímto společenstvím. Parametry týkající se potravin jsou zde nastaveny v celé řadě nařízení pro produkci, distribuci a prodej bezpečných potravin.

Dle Českého statistického úřadu se spotřeba sýrů stále zvyšuje a dle předpokladu odborníků konzumace sýrů poroste i nadále. Konzumace sýrů je z výživového hlediska žádoucí pro vysoký obsah vápníku a dalších tělu prospěšných látek. Na druhou stranu sýry zrající pod mazem patří mezi potraviny, které svým složením, pH, a_w vytvářejí vhodné podmínky pro nežádoucí mikroorganismy, které mohou nejen způsobit jejich kažení, ale může zde docházet k produkci zdraví nebezpečných toxinů, jež mohou vyvolat různá onemocnění.

Cílem práce bylo provést mikrobiologický rozbor vybraných sýrů zrajících pod mazem od českých výrobců ve znacích – celkový počet mikroorganismů, koliformní bakterie, plísně, kvasinky, *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes*. Získané výsledky vyhodnotit dle ČSN 56 9609 a Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, ve znění pozdějších předpisů. Dále zpracovat údaje o výskytu *Listeria monocytogenes* ve zrajících sýrech dle monitoringu kontrolních orgánů (Státní zemědělská a potravinářská inspekce a Státní veterinární správa) a Rapid Alert System for Food and Feed.

Provedenými rozbory byly sledované vzorky vyhodnoceny následovně: Vzorky sýrů skladované při 8°C Pepin, Romadůžek a Tvarůžky kolečka vyhověly požadavkům uvedeným v ČSN 56 9609 ve všech sledovaných znacích. Vzorky Romadur, Hermadur, Tvarůžky s kmínem, vyhověly ČSN 56 9609 ve znaku „koliformní bakterie“ pouze s přihlédnutím k počtu provedených rozborů. Tyto vzorky v ostatních stanovených znacích této normě vyhověly.

V případě testů těchto vzorků skladovaných při pokojové teplotě 25 °C bylo zjištěno, že počty koliformních bakterií překročily povolené přípustné hodnoty stanovené ČSN 56 9609 u vzorků Romadur, Pepin, Hermadur a Tvarůžky kousky s kmínem. Vzorky Romadůžek a Tvarůžky kolečka limitům stanoveným touto normou vyhověly. Tímto byl prokázán vliv vysoké teploty skladování na jakost a zdravotní nezávadnost potravin, kdy přerušením chladicího řetězce dochází k pomnožení nežádoucích mikroorganismů a tím znehodnocení potravin.

Nařízení 2073/2005 stanovuje pouze limity pro *L. monocytogenes* a koagulázopozitivní stafylokoky. Všechny sledované vzorky skladované při teplotě 8 °C a 25 °C těmto limitům vyhověly.

Dalším úkolem práce bylo srovnání výsledků rozborů vzorků sýrů zrajících pod mazem *L. monocytogenes* provedených dozorovými orgány (SZPI a SVS) a zaslaných oznámení do systému RASFF.

Kontrolní orgány odebraly v roce 2007 celkem 1260 vzorků, z nichž bylo 64 nevyhovujících. V roce 2008 bylo odebráno 574 vzorků, z nichž bylo 8 nevyhovujících. Počet nevyhovujících vzorků v roce 2009 činil 9 z celkového počtu 445 odebraných vzorků. V roce 2010 bylo odebráno 552 vzorků a 8 bylo vyhodnoceno jako nevyhovující. Z uvedeného lze usuzovat, že výskyt *L. monocytogenes* ve zrajících sýrech byl oproti roku 2007 snížen z 5,08 % na průměrně pod 2 %, což představuje pozitivní zjištění.

Za období roku 2005 – 2009 bylo přijato celkem 698 oznámení, z nichž 63 tvořily mikrobiologické kontaminanty, z nichž bylo 18 případů *L. monocytogenes*. Z tohoto počtu 18 případů se 8 případů týkalo sýrů. Tímto bylo potvrzeno, že sýry patří mezi významné potraviny s možností kontaminace *L. monocytogenes*. Pozitivním zjištěním je, že zastoupení výskytu *L. monocytogenes* od roku 2007 má klesající tendenci.

Na závěr je nutné konstatovat, že prevence zajišťující předcházení vzniku a produkce nebezpečných potravin je základní povinností provozovatelů potravinářských podniků celé distribuční sítě. K tomuto cíli je nutné zavést a vypracovat důkladné systémy HACCP zahrnující celý proces výroby od nákupu surovin, vlastní výrobu potravin, jejich dopravy a odpovídající podmínky skladování v distribuční síti. Velký význam musí být kladen na dodržení odpovídajících teplot skladování tohoto typu potravin, které jsou náchylné z hlediska mikrobiologického, změn chemického složení a vzniku kontaminantů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KAZUKI, M. *Francouzské sýry*. 1. vyd. Banská Bystrica: Slo-vart, 2007. 288 s. ISBN 978-80-7209-994-8.
- [2] CALLEC, C. *Encyklopedie sýrů*. 1. vyd. Čestlice: Rebo Productions, 2002. 256 s. ISBN 80-7234-225-8.
- [3] IBURG, A. *Lexikon sýrů*, 1. vyd. Čestlice: Rebo Productions, 2004. 301 s. ISBN 80-7234-379-3.
- [4] *Ferdinand Julius Cohn Biography* [online]. [cit. 2011-02-21]. Dostupný z WWW: <<http://www.faqs.org/health/bios/74/Ferdinand-Julius-Cohn.html>>.
- [5] RIDGWAY, J. *Sýry, průvodce světem sýrů*. 1. vyd. Praha: Fortuna Print, 2004. 224 s. ISBN 80-7321-108-4.
- [6] ŠVEHELKA, L. *Kouzelný tvarůžek aneb kuchařka neobvyklé vůně*. 2. vyd. Praha: Paseka, 2005. 129 s. ISBN 80-7185-776-9.
- [7] Zveřejnění žádosti podle čl. 6 odst. 2 nařízení Rady (ES) č. 510/2006 o ochraně zeměpisných označení a označení původu zemědělských produktů a potravin. *Úřední věstník EU*, C 182, s. 20 – 22.
- [8] *Zápis zeměpisného označení olomoucké tvarůžky* [online]. 2010 [cit. 2010-07-08]. Dostupný z WWW: <http://www.upv.cz/cs/upv/aktuality/arch2010/Zapis_zemepisneho_oznaceni_Olomoucke_tvaruzky.html>.
- [9] FARNWORTH, E.R. *Handbook of Fermented Functional Foods*. 1. vyd. Boca Raton: CRC Press, 2008. 581 s. ISBN 978-1-4200-5326-5.
- [10] *Global cheese consumption to reach 21 million metric tons by 2015, according to new report by global industry analysts, Inc.* [online]. 2010 [cit. 2010-11-6]. Dostupný z WWW: <http://www.prweb.com/releases/cheese_cheddar/organic_artisan/prweb3489924.htm>.
- [11] Modified from the world market for cheese 1995-2004, *Bulletin of the International Dairy Federation*. 2005, vol. 18, s. 402.
- [12] *Agroweb: Produkce i spotřeba sýrů porostou* [online]. 2006 [cit. 2010-19-3]. Dostupný z WWW: <http://www.agroweb.cz/Produkce-i-spotreba-syru-porostou__s45x25376.html>.

- [13] *Ústav zemědělských a potravinářských informací: Vývoj výroby a prodeje sýrů v ČR* [online]. 2006, roč. 37, č. 2, s. 26 - 30 [cit. 2011-03-19]. Dostupný z WWW: <<http://www.foodnet.cz/polozka/?jmeno=V%C3%BDvoj+v%C3%BDroby+a+prodeje+s%C3%BDr%C5%AF+v+%C4%8CR&id=10198>>.
- [14] Modified from the world market for cheese 1995-2004, *Bulletin of the International Dairy Federation*. 2005, vol. 15, s. 402.
- [15] *Ústav zemědělské ekonomiky a informací, Informační centrum bezpečnosti potravin: Sýry ve výživě* [online]. [cit. 2011-03-11]. Dostupný z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92087>>.
- [16] *Český statistický úřad: Spotřeba potravin, nápojů a cigaret na 1 obyvatele v ČR v letech 2000 – 2008* [online]. [cit. 2010-06-11]. Dostupný z WWW: <[http://www.czso.cz/csu/2009edicniplan.nsf/t/7A00383173/\\$File/30040901.pdf](http://www.czso.cz/csu/2009edicniplan.nsf/t/7A00383173/$File/30040901.pdf)>.
- [17] International commission on microbiological specifications for foods. *Microorganisms in foods. Microbial ecology of food commodities*. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. 763 s. ISBN 0-306-48675-X.
- [18] LUKÁŠOVÁ J. a kol. *Hygiena a technologie mléčných výrobků*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2001. 180 s. ISBN 80-7305-415-9.
- [19] Vyhláška MZe č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. *Sbírka zákonů*. 2003, Částka 032, s. 2488 – 2516.
- [20] TOMÁNKOVÁ, E. RADA, V. KILLER, J. *Potravinářská mikrobiologie*. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2006. 168 s. ISBN 80-213-1583-0.
- [21] Povltavské mlékárny, a.s., Sedlčany, Ing. Václav Tesař, technolog výroby, informace podané dne 21. 7. 2010.
- [22] KNĚZ, V. *Výroba sýrů*. 2. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1960. 380 s.
- [23] GÖRNER, F. VALÍK, Ľ. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin : princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. 1.vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.

- [24] *Utah State University: Brevibacterium linens* [online]. [cit. 2011-04-09]. Dostupný z WWW: <<http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm>>.
- [25] HRUBÝ, S., TUREK, B., *Mikrobiologická problematika ve výživě*, 1. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996. 145 s. ISBN 80-7013-232-9.
- [26] DE BUYSER, M.L., DUFOUR, B., MAIRE, M., LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food – borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 67, s. 1 – 17.
- [27] ZOTTOLA, E.A., SMITH, L.B. Pathogens in cheese. *Journal of Food Microbiology*. 1991, vol. 8, s. 171 – 182.
- [28] PÁNEK, J. POKORNÝ, J. DOSTÁLOVÁ, J. KOHOUT, P. *Základy výživy*, 1. vyd. Praha: Svoboda Servis, 2002. 207 s. ISBN 80-86320-23-6.
- [29] *Listeria monocytogenes* [online]. [cit. 2011-03-09]. Dostupné z WWW: <<http://www.flickr.com/photos/ajc1/534413333/in/photostream/>>.
- [30] *Wikipedia: Staphylococcus aureus VISA 2.jpg* [online]. [cit. 2011-04-09]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Staphylococcus_aureus_VISA_2.jpg>.
- [31] *Science Daily: New, more effective nisin antibiotics combat superbugs and food diseases*, [online]. 2009 [cit. 2011-02-06]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedaily.com/releases/2009/03/090330200710>>.
- [32] Vyhláška MZe č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. *Sbírka zákonů*. 2008, Částka 003, s. 258 – 327.
- [33] MARTH, E.H., STEELE, J. L. *Applied Dairy Microbiology*, 2nd ed, New York : Dekker, 2001. 736 s. ISBN 082470536X.
- [34] TANČINOVÁ, D., MAKOVÁ, J., FELŠÖCIOVÁ, S., KAČÁNIOVÁ, M., KMEŤ, V. *Mikrobiológia potravín*. 1. vyd. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. 144 s. ISBN 80-8069-568-7.
- [35] JAY, J.M. *Modern Food Microbiology*. Chapman and Hall, 5th ed. New York: Chapman & Hall, 1996. 661 s. ISBN 0412076918.
- [36] HULL, R., TOYNE, S., HAVNES, I., LEHMANN, F. Thermophilic bacteria: a re-emerging problem in cheesemaking. *Australian Journal of Dairy Technology*. 1992, vol. 47, no. 2, s. 91 – 94.

- [37] Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících předpisů. *Sbírka zákonů*. 1997, Částka 038, s. 2178 – 2188.
- [38] Nařízení Evropského parlamentu (EP) a Rady (ES) č. 852/2004 ze dne 29. dubna 2004 o hygieně potravin. *Úřední věstník EU*, L 139, s. 1 – 54.
- [39] BLACKBURN, C. de W. *Food spoilage microorganisms*, Boca Raton: Woodhead Publishing, 2006. 712 s. ISBN 0849391563.
- [40] *Ministerstvo zemědělství: Hygienický balíček* [online]. [cit. 2011-02-20]. Dostupný z WWW: <<http://eagri.cz/public/web/mze/potravin/hygienicky-balicek>>.
- [41] Nařízení Evropského parlamentu (EP) a Rady (ES) č. 178/2002 ze dne 28. ledna 2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin. *Úřední věstník EU*, 2002, L 031, s 1 – 24.
- [42] Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, *Úřední věstník EU*, 2005, L 338, s. 1 – 26.
- [43] ČSN 56 9609. *Pravidla správné hygienické a výrobní praxe – Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace*. Praha: Český normalizační institut, 2008. 40 s.
- [44] *Státní zemědělská a potravinářská inspekce: Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva* [online]. 2004 [cit. 2011-02-214]. Dostupný z WWW: <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1002819&docType=ART&nid=11414>>.
- [45] *Ministerstvo zemědělství: Závěrečná zpráva o činnosti RASFF za rok 2009* [online]. Praha, 2010 [cit. 2011-02-20]. Dostupný z WWW: <http://eagri.cz/public/web/file/65973/Zaverecna_zprava_o_cinnosti_RASFF_za_rok_2009.pdf>.
- [46] *Ministerstvo zemědělství: Rapid Alert System for Food and Feed* [online]. [cit. 2011-02-20]. Dostupný z WWW: <<http://eagri.cz/public/web/mze/potravin/bezpecnost-potravin/rasff/>>.
- [47] *Státní zemědělská a potravinářská inspekce: Schéma fungování RASFF v ČR* [online]. 2004 [cit. 2011-02-14]. Dostupný z WWW: <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1002819&docType=ART&nid=11414>>.
- [48] *Top-Bio, s.r.o.: DNA polymerázy pro PCR a pufry* [online]. 2010 [cit. 2011-03-15].

- Dostupné z WWW: <<http://www.top-bio.cz/pdf/top-bio-katalog.pdf>>.
- [49] CUPÁKOVÁ, Š., DUŠKOVÁ, M., KARPÍŠKOVÁ, R. *Mikrobiologie potravin – praktická cvičení. 1., Obecná mikrobiologie*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2008. 55 s. ISBN 978-80-7305-043-6.
- [50] *Genom Listeria monocytogenes a Listeria innocua* [online]. [cit. 2011-03-19]. Dostupné z WWW: <http://tichovsky.ic.cz/html/mikro/listerie_gen.php>.
- [51] RENZONI, A., KLARSFELD, A., DRAMSI, S., COSSART, P. Evidence that *prfA*, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infection and Immunity*. 1997, vol. 65, no. 4, s. 1515 – 1518.
- [52] SHETRON – RAMA, L. M., MARQUIS, H., ARCHIE BOUWER, H. G., FREITAG, N. E. Intracellular induction of *Listeria monocytogenes actA* expression. *American Society for Microbiology*. 2002, vol. 70, no. 3, s. 1087 – 1096.
- [53] ORAVCOVÁ, K., KACLÍKOVÁ, E., KRASCSENICSOVÁ, K., PANGALLO, D., BREŽNÁ, B., SIEKEL, P., KUČHTA, T. Detection and quantification of *Listeria monocytogenes* by 5'-nuclease polymerase chain reaction targeting the *actA* gene. *Letters in Applied Microbiology*. 2006, vol. 42, s. 15 – 18.
- [54] RUMML, T., RUMLOVÁ M., PAČES, V. *Genové inženýrství*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.
- [55] KOCÁREK, E. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2004. 211 s. ISBN 80-7183-326-6.
- [56] ČSN EN ISO 4833. Potravinářské výrobky. Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Praha: Český normalizační institut, 2003. 16 s.
- [57] ČSN ISO 4832. Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu koliformních bakterií. Praha: Český normalizační institut, 2010. 12 s.
- [58] ČSN ISO 7954. Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu kvasinek a plísní. Praha: Český normalizační institut, 2003. 8 s.
- [59] ČSN EN ISO 6888 – 1. Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další dru-

- hy) – Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera. Praha: Český normalizační institut, 1999. 16 s.
- [60] BLAŽKOVÁ, M., KARAMONOVÁ, L., FUKAL, L., RAUCH, P. *Listeria monocytogenes* – nebezpečný patogen a jejich detekce v potravinách. *Chemické listy*. 2005, roč. 99, s. 467 – 473.
- [61] ČSN EN ISO 11290 – 1. Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* – Část 1: Metoda průkazu. Praha: Český normalizační institut, 1999. 28 s.
- [62] BURDYCHOVÁ, R., SLÁDKOVÁ, P. *Mikrobiologická analýza potravin*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. 208 s. ISBN 978-80-7375-116-6.
- [63] HALEBIAN, S., HARRIS, B., FINEGOLD, S.M., ROLFEI R.D. Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 1981, vol. 13, no. 3, s. 444 – 448.
- [64] ENNAHAR, S., ASSOBBHEI, O., HASSELMANN, C. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear – surface soft cheese by *Lactobacillus plantanum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *Journal of Food Protection*. 1998, vol. 61, no. 2, s. 186 – 191.
- [65] RYSER, E.T., MARTH, E.H. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Camembert cheese. *Journal of Food Protection*. 1987, vol. 50, s. 372 – 378.
- [66] MICHARD, J., JANDY, N., GEY, J.L. Enumeration and localization and of *Listeria monocytogenes* in soft surface – ripened cheese made from raw milk. *M.A.N. Microbiology, Aliments, Nutrition*. 1989, vol. 7, no. 2, s. 131 – 137.
- [67] LIU, S., PURI, V.M., DEMIRCI, A. Spatial distribution of population of *Listeria monocytogenes* during manufacturing and ripening of Camembert cheese. *Journal of Food Safety*. 2007, vol. 27, s. 43 – 55.
- [68] ČSN EN ISO 7218, Mikrobiologie potravin a krmiv – Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení. Praha: Český normalizační institut, 2008. 68 s.
- [69] DEETAE, P., BONNARME, P., SPINNLER, H.E., HELINCK, S. Production of volatile compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened

- French cheeses. *Applied Microbial and Cell Physiology*. 2007, vol. 76, s. 1161 – 1171.
- [70] VALDES-STAUBER, N., SCHERER, S., SEILER, H. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 1997, vol. 34, s. 115 – 129.
- [71] MOUNIER, J., GELSOMINO, R., GOERGES, S., VANCANNEYT, M., VANDEMEULEBROECKE, K., HOSTE, B., SCHERER, S., SWINGS, J., FITZGERALD, G.F., COGAN, T.M. Surface microflora of four smear – ripened cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, vol. 71, no. 11, s. 6489 – 6500.
- [72] MAHER, M., MURPHY, P.M. Microbiological changes during ripening in two Irish smear-ripened, farmhouse cheeses produced from raw milk. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 2000, vol. 39, s. 107 – 121.
- [73] VLKOVÁ, E., RADA, V., KILLER, J., Potravinařská mikrobiologie. 2. vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita Praha, 2009. 168 s. ISBN 978-80-213-1988-2.
- [74] JULÁK, J. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Praha: Karolinum, 2006. 404 s. ISBN 80-246-1270-4.
- [75] BOCKELMANN, W., WILLEMS, K.P., NEVE, H., HELLER, K.H. Cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal*. 2005, vol. 15, s. 719 – 732.
- [76] BOCKELMANN, W., KRUSCH, U., ENGEL, G., KLIJN, N., SMIT, G., HELLER, K.J. The microflora of Tilsit cheese. Part 1. Variability of the smear flora. *Nahrung*. 1997, vol. 41, s. 208 – 212.
- [77] BOCKELMANN, W., WILLEMS, P., RADEMAKER, J., NOORDMAN, W., HELLER, K.J. Kulturen für die Oberflächenreifung geschmierter Weichkäse. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*. 2003, vol. 55, s. 277 – 299.
- [78] BOCKELMANN, W., WILLEMS, P., JAEGER, B., HOPPE-SEYLER, T.S., ENGEL, G., HELLER, K.J. Reifung von Harzer Käse. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*. 2002, vol. 54, s. 317 – 335.
- [79] LITTLE, C.L., RHOADES, J.R., SAGOO, S.K., HARRIS, J., GREENWOOD, M., MITHANI, V., GRANT, K., MCLAUCHLIN, J. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiology*. 2008, vol. 25, s. 304 – 312.

- [80] JORGENSEN, H.J., MORK, T., RORVIK, L.M. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *Journal of Dairy Science*. 2005. vol. 88. s. 3810 – 3817.
- [81] JORGENSEN, H.J., MATHISEN, T., LOVSETH, A., OMOE, K., QVALE, K.S., LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiological Letters*. 2005, vol. 252, no. 2., s. 267 – 272.
- [82] *Veterinary Microbiology: L. monocytogenes on Oxford agar* [online]. 2000 [cit. 2011-04-16]. Dostupný z WWW:
<<http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english/showisolation.asp?articleid=6>>.
- [83] KRAMÁŘ, R. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2007, 73 s. ISBN 978-80-7394-021-8.
- [84] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. vyd. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [85] VAŘEJKA, F., MRÁZ, O., SMOLA, J. *Speciální veterinární mikrobiologie*. Praha, 1989. 264 s. ISBN 80-209-0042-X.
- [86] Státní zemědělská a potravinářská inspekce, interní databáze [cit. 2011-03-28].
- [87] Státní veterinární správa, interní databáze [cit. 2011-03-28].
- [88] Ministerstvo zemědělství. *Zpráva o činnosti systému rychlého varování pro potraviny a krmiva v České republice za rok 2005*. Praha, 2006. 19 s. ISBN 80-7084-539-2.
- [89] *Státní zemědělská a potravinářská inspekce: Zpráva o činnosti SZPI za rok 2010* [online]. 2011 [cit. 2011-04-09]. Dostupné z WWW:
<<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1029558&docType=ART&nid=11386>>.
- [90] Ministerstvo zemědělství. *Zpráva o činnosti systému včasné výměny informací pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2006*. Praha, 2007. 34 s. ISBN 978-80-7084-622-3.
- [91] Ministerstvo zemědělství. *Zpráva o činnosti systému včasné výměny informací pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2007*. Praha, 2008. 33 s. ISBN 978-80-7084-721-3.

- [92] *Ministerstvo zemědělství: Zpráva o činnosti systému včasné výměny informací pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2008* [online]. 2009 [cit. 2011-03-19]. Dostupné z WWW: <<http://eagri.cz/public/web/mze/potraviny/bezpecnost-potravin/rasff/zprava-o-cinnosti-systemu-rychleho.html>>.
- [93] RUDOLF, M., SCHERER, S. Highincidence of *Listeria monocytogenes* in european red smear chesse. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 63, s. 91 – 98.
- [94] *Ministerstvo zdravotnictví: Důležité informace k listerióze* [online]. 2006 [cit. 2011-04-09]. Dostupné z WWW: <http://www.mzcr.cz/dokumenty/dulezite-informace-k-listerioze_871_872_1.html>
- [95] *Ministerstvo zdravotnictví: Tisková konference "Onemocnění listeriózou, komplexní informace o výskytu a opatřeních na zabránění dalšího šíření"* [online]. 2007 [cit. 2011-04-09]. Dostupné z WWW: <http://www.mzcr.cz/dokumenty/tiskova-konference-onemocneni-listeriozou-komplexni-informace-o-vyskytu-a-opatrenich-na-zabraneni-dalsiho-sireni_852_871_1.html>.
- [96] PINTO, M., BURRI, S., MENA. C., ALMEIDA, G., CARNEIRO, L., TEIXEIRA, P., GIBBS, P.A. Comparison of Oxford Agar, PALCAM and *Listeria monocytogenes* Blood Agar for the recovery of *L. monocytogenes* from foods and environmental samples. *Food Control*. 2001, vol. 12, s. 511 – 514.
- [97] KACLÍKOVÁ, E., PANGALLO, D., DRAHOVSKÁ, H., ORAVCOVÁ, K., KUČHTA, T. Detection of *Listeria monocytogenes* in food, equivalent to EN ISO 11290-1 or ISO 10560, by a three-days polymerase chain reaction-based method. *Food Control*. 2003, vol. 14, s. 175 – 179.
- [98] ORAVCOVÁ, K., KUČHTA, T., KACLÍKOVÁ, E. A novel real – time PCR – based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Letters Applied Microbiology*. 2007, vol. 45, no. 5, s. 568 – 573.
- [99] STAMDAROVÁ, E., VORLOVÁ, L., KORDIOVSKÁ, P., JANŠTOVÁ, B., DRAČKOVÁ, M., BORKOVCOVÁ, I. Biogenic amine production in Olomouc curd cheese (Olomoucké tvarůžky) at various storage conditions. *Acta Veterinaria Brno*. 2010, roč. 79, s. 147 – 156.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AOC	Appelation d'Origine Contrôlée
B-P agar	Baird – Parker agar
CCP	Critical control points
CIRCA	Communication Information Resource Centre Administrator
CPM	Celkový počet mikroorganismů
ČR	Česká republika
EFSA	European Food Safety Authority
EU	Evropská unie
EK	Evropská komise
EP	Evropský parlament
GKCH	Agar s glukózou, kvasničným extraktem a chloramfenikolem
GTK	Agar s glukózou, tryptonem a kvasničným extraktem
HACCP	The Hazard Analysis Critical Control Points
KTJ	Kolonie tvořící jednotku
LOA	Listeria Oxford agar
MK	Mikrobiologický kontaminant
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
SVS	Státní veterinární správa
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
USDA	United States Department of Agriculture
VRBL	Violet Red Bile Lactose agar
XLD	Agar s xylózou, lyzinem, deoxycholátem

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 <i>Brevibacterium linens</i> .	20
Obr. 2 <i>Listeria monocytogenes</i> .	20
Obr. 3 <i>Staphylococcus aureus</i> .	21
Obr. 4. Schéma systému rychlého varování RASFF v ČR.	34
Obr. 5. Růst <i>Listeria monocytogenes</i> na Listeria Oxford Agar.	59
Obr. 6. Výsledky PCR.	64

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Mikrobiologické limity měkkých sýrů zrajících dle ČSN 56 9609.	32
Tab. 2. Použité primery pro PCR.	45
Tab. 3. Tabulka vzorků sýrů zrajících pod mazem pro 1. a 2. experiment, skladováno při 8°C.	46
Tab. 4. Tabulka vzorků sýrů zrajících pod mazem pro 3. experiment, skladováno při 25°C.	47
Tab. 5. Výsledky rozborů vzorků sledovaných experimentu č. 1 v hodnotách KTJ/g.	55
Tab. 6. Výsledky rozborů vzorků sledovaných znaků bloku č. 2 v hodnotách KTJ/g.	56
Tab. 7. Počty typických/atypických kolonií na půdě <i>Listeria</i> Oxford Agar ve stanovovaných vzorcích v KTJ/g.	59
Tab. 8. Výsledky rozborů vzorků v hodnotách KTJ/g, teplota skladování 25 °C, po dobu 14 dnů.	60
Tab. 9. Výsledky rozborů vzorků v hodnotách KTJ/g, teplota skladování 25 °C, po dobu 7 dnů.	60
Tab. 10. Výsledky konfirmačních testů sledovaných izolátů z media LOA a GTK.	62
Tab. 11. Výsledky testů cukrů sledovaných vzorků.	63
Tab.12. Stanovení <i>Listeria monocytogenes</i> – metoda průkazu vzorků sýrů zrajících pod mazem, SZPI.	65
Tab.13. Stanovení <i>Listeria monocytogenes</i> – metoda průkazu vzorků sýrů zrajících pod mazem, SVS.	66
Tab. 14. Vývoj počtu oznámení souvisejících s ČR od roku 2003.	66
Tab. 15. Počty MK v oznámeních RASFF v ČR v roce 2005.	68
Tab. 16. Počty MK v oznámeních RASFF v ČR v roce 2006.	68
Tab. 17. Počty MK v oznámeních RASFF v ČR v roce 2007.	69
Tab. 18. Počty MK v oznámeních RASFF v ČR v roce 2008.	69
Tab. 19. Počty MK v oznámeních RASFF v ČR v roce 2009.	70

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1. Vývoj počtu oznámení RASFF v ČR od roku 2003.	67
Graf 2. Počty V/N vzorků <i>L. monocytogenes</i> v letech 2007 až 2010.	71
Graf 3. Počty oznámení přijatých v ČR v r. 2005 – 2009.	74
Graf 4. Počty oznámení odeslaných, kontrola trhu v ČR v r. 2005 – 2009.	74

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha PI: Formuláře SZPI hlášení události podle Nařízení (ES) 178/2002 čl. 19

Příloha PII: Formuláře RASFF (EU)

PŘÍLOHA P I: FORMULÁŘE SZPI HLÁŠENÍ UDÁLOSTI PODLE NAŘÍZENÍ (ES) 178/2002 ČL. 19

Formulář SZPI pro hlášení události podle nařízení (ES) 178/2002 čl. 19

Oznámení o události

Jméno ohlašovatele:	
Pozice:	
Firma:	
Adresa:	
Tel.č.:	
Kontakt po pracovní době:	
Fax :	
E-mail:	
Datum/čas hlášení:	

Část 1. Identifikace potravin

Typ potravin:		
Obchodní značka:		
Povaha nebezpečí:	Chemické	
	Mikrobiologické	
	Fyzikální (cizí těleso)	
Výrobce:		
Země původu:		
Maloobchodník/distributor:		
Označení šarže/dodávky:		
Identifikační znaky/razítka/ schválená čísla provozoven:		
Množství ohlášené potravin:		
Detaily o balení (velikost balení, typ atd.):		

Datum výroby:	
Označení trvanlivosti (DP/DMT):	
Známa distribuce:	
Dovozce:	
Detaily z obchodních dokumentů (pokud byla potravina dovezena):	

Část 2. Dosavadní průběh události

Datum, kdy bylo nebezpečí identifikováno:	
Jak bylo nebezpečí identifikováno:	
Známa onemocnění související s konzumací potraviny:	
Detaily šetření:	
Kontakt s jinými agenturami/organizacemi:	
(Detaily o jednotlivcích, kontaktní čísla atd.):	

Část 3. Jiné informace

Jakékoli další detaily o události:	
------------------------------------	--

Kontaktní adresa SZPI

Státní zemědělská a potravinářská inspekce Ústřední inspektorát Květná 15 603 00 Brno	
Platí pro pracovní dny: Email: epodatelna@szpi.gov.cz Fax: 420-543 540 202 Tel: 543 540 111	Platí pro dny pracovního klidu: Email: rasff@szpi.gov.cz

Pozn.: Všude, kde je to možné, poskytněte obrázek anebo kopii etikety. V případě, že požadovanou informaci nemáte, ponechte příslušné pole nevyplněné.

PŘÍLOHA P II: FORMULÁŘE RASFF (EU)

RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED
REGULATION (EC) N°: 178/2002 – Art. 50 *
MARKET NOTIFICATION

GENERAL INFORMATION:

1	Notification type:	
2	Notifying country:	
3	Contact point reference n°:	
4	Basis for the notification:	
5	Related RASFF notification n°:	
6	Date of notification:	
7	Counties flagged for action:	

HAZARDS:

8	Hazard category:		
		other:	
9	Hazards found:		
10	Results of the tests:		analytical units
11	Counter analysis:		analytical units
12	Sampling	dates:	
13		n° of samples:	
14		method:	
15		place:	
		other/name:	
16	Laboratory:		
17	Analysis	sample treatment/ analytical matrix:	
18		method of analysis:	
19	Persons affected:		
20	Type of illness/symptoms:		

PRODUCT:

21	Product category:		
		other:	
22	Product relation to the product notified in linked notification:		
		other/more info:	
23	Product name (on label):		
24	Product description	brand / trade name:	
25		product aspect (e.g. packaging):	
26		barcode n°:	
27		other labelling info:	
28		unit weight/vol.:	units

RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED
REGULATION (EC) N°: 178/2002 – Art. 50 *
BORDER REJECTION

GENERAL INFORMATION:

1	Notification type:	
2	Notifying country:	
3	Contact point reference n°:	
4	Date of notification:	

HAZARDS:

5	Hazard category:		other: <input type="text"/>
6	Hazards found:		
7	Results of the tests:	analytical units	
8	Counter analysis:	analytical units	
9	Sampling	dates:	
10		n° of samples:	
11		method:	
12		place:	point of entry other: <input type="text"/>
13	Laboratory:		
14	Analysis	sample treatment/ analytical matrix:	
15		method of analysis:	

PRODUCT:

16	Product category:		other: <input type="text"/>
17	Product name (on label):		
18	Product description	brand / trade name:	
19		product aspect (e.g. packaging):	
20		other labelling info:	
21		unit/vol. weight:	<input type="text"/> units

RISK / MEASURES

22	concern:	human health
23	Legislation in breach:	
24	scope:	European
25		max. permitted level: