



Mikroorganismy a potraviny – ano či ne **alias**

Mikrobiologická bezpečnost potravin



Kateřina Demnerová

Dietní výživa 3.10.2017



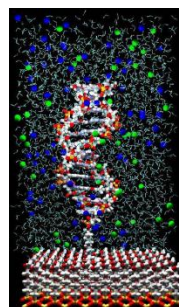
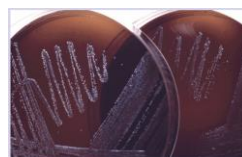
Zkušební laboratoř

Akreditace od 1.4. 2006 (ČIA)



Detekce potravních patogenů

- založených na standarních normativních metodách
- založených na molekulárně genetických metodách

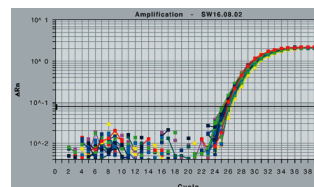
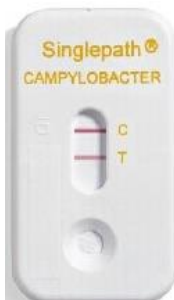


DNA čipy

- *Salmonella* sp.
 - *Listeria monocytogenes*
 - *Campylobacter* sp.
 - *Cronobacter sakazakii*
- PCR** – Polymerasová řetězová reakce

➤ založených na imunochemických metodách

- *Cronobacter sakazakii*
- *Listeria monocytogenes*



Detekce a kvantifikace GMO v potravinách a potravinových surovinách

- využití vysoce citlivých systémů **PCR** a **Real on Time PCR**
- člen **ENGL** (European Network of GMO laboratories)
- člen sítě **GMO** laboratoří v ČR a SR



Vnímání rizik z příjmu cizorodých látek

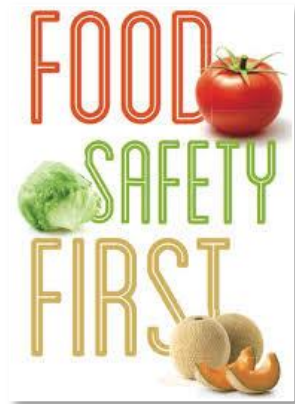
laická veřejnost	odborníci
Rezidua pesticidů	
Kontaminanty životního prostředí	
Potravinová aditiva	
Mikrobiologická kontaminace	
Přírodní toxiny	

Vnímání rizik z příjmu cizorodých látek

laická veřejnost	odborníci
Rezidua pesticidů	Mikrobiologická kontaminace
Kontaminanty životního prostředí	Přírodní toxiny
Potravinová aditiva	Kontaminanty životního prostředí
Mikrobiologická kontaminace	Rezidua pesticidů
Přírodní toxiny	Potravinová aditiva

Co nás čeká? Nové trendy?

- **hlavní úkol: bezpečné potraviny**
- nové netypické patogeny
- rostoucí význam probiotických bakterií
- **mikrobiom**, nejen lidský



Hlavní cíl: bezpečné a ještě bezpečnější potraviny!!!!



- ✓ preventivní principy systému HACCP již zdomácněly v potravinářském průmyslu
- ✓ zlepšila se hygiena výroby potravin na všech úrovních
- ✓ stále však není zcela jasné, jak snížit výskyt onemocnění vyvolanými **salmonelami, kampylobaktery a listeriem**

Zpráva EFSA

- Prosinec 2016 - nejčastější onemocnění je **kampylobakterióza**, hlavní zdroj drůbež
- **Salmonelózy** jsou na ústupu, nicméně pomalém
- Stále rostou onemocnění z potravin a vody vyvolané **viry**
- **Listeriózy** v roce 2015 – celkem 2 161 laboratorně ověřených případů
- **E.coli VTEC** v roce 2015- 5 251 případů



Proč se nedaří účinně snižovat počet případů???

Mikroorganismy na Zemi

Několik čísel na začátek.....

- Bakterie 3,6 mil. let
- Eukaryota 2,1 mil. let
- ***99% mikroorganismů (bakterií) přítomných na planetě neumíme kultivovat***
- V lidském těle je celkově **10^{13}** buněk
- V lidském těle je **10^{14}** mikroorganismů
- 7-10 tis. druhů
- **Lidský MIKROBIOM – „druhý lidský genom“**
Soubor všech genů mikroorganismů v daném prostředí

Význam mikroorganismů

- **Pozitivní**

- tvorba a zachování životního prostředí
- průmyslová činnost

- **Negativní**

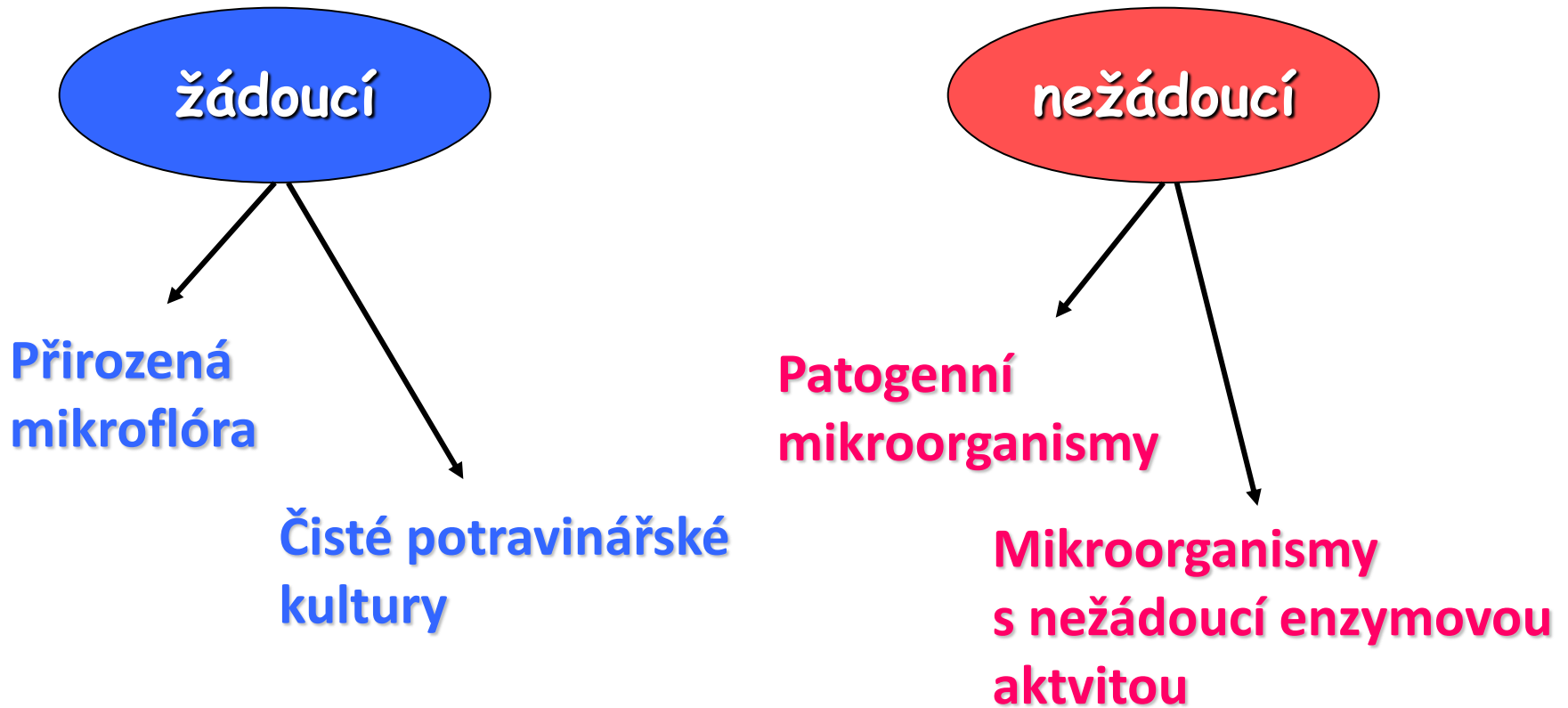
- původce onemocnění
- mikrobiální koroze
- rozklad potravin a potr.surovin

Co jsou vlastně bezpečné, zdravé potraviny?

- Vajíčka?????
- Zelenina?????
- Maso a výrobky z nich????
- Mouka a výrobky z ní????
- Mléko a mléčné výrobky????



Potravinářsky významné mikroorganismy



Žádoucí mikroorganismy

Výroba:

- fermentovaných mléčných výrobků
- fermentovaných masných výrobků
- droždí, vína, piva, octa, lihu, pečiva, kysané zeleniny, atd.
- probiotika x prebiotika
- **Probiotika** jsou živé mikroorganizmy, které aplikovány v přiměřeném množství příznivě ovlivňují zdravotní stav hostitele.

Prebiotika jsou nestravitelné látky, jejichž konzumace má příznivý fyziologický účinek na hostitele selektivní stimulací růstu nebo aktivity některých kmenů střevní mikroflóry.

- antibiotik

Nežádoucí mikroorganismy

MO přítomné v potravinách se mohou podílet na:

- **mikrobiálním kažení potravin**
- **vzniku alimentárních infekcí (patogenní MO)**
- **vzniku alimentárních intoxikací (toxinogenní MO)**

Hodnocení mikrobiologického rizika

- rozlišit typy výrobků:
- - vyžadující zkoušení (podle příslušných norem EN ISO)
- - mikrobiologicky málo rizikové nebo nerizikové

Analýza mikrobiologického rizika závisí na několika faktorech

- možnost mikrobiologické zkázy výrobku
- patogenita mikroorganismů
- tepelné ošetření
- věk uživatele (dospělí, děti, děti do 3 let)

Růstové podmínky pro mikroorganismy

- **F**ood
- **A**cidity
- **T**ime
- **T**emperature
- **O**xygen
- **M**oisture



Zdroj živin

pH

Doba

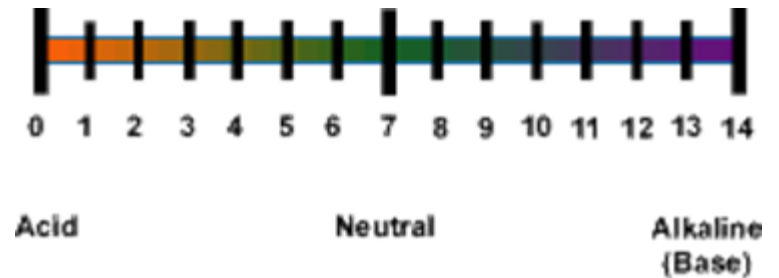
Teplota

Kyslík

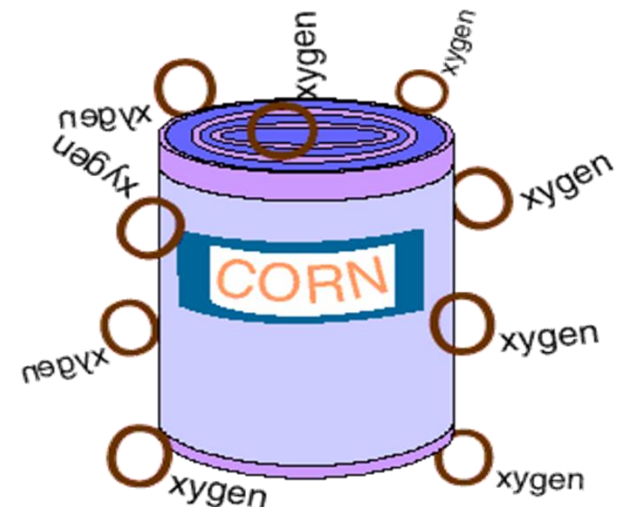
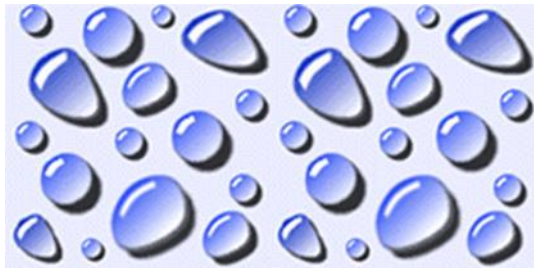
**Vlhkost (vodní
aktivita)**

Složení a vlastnosti výrobků

- **Živiny** : oleje, mastné kyseliny, alkoholy.....
- **pH**: bakterie, kvasinky, plísně
- **Doba**: skladování, užívání
- **Teplota**: výroba, skladování
- **Přítomnost kyslíku**: aerobní x anaerobní podmínky
- **Vodní aktivita**: a_w
halofilní, osmofilní, xerofilní mikroorganismy



Co víme o nárocích mikroorganismů na růst???



Faktory ovlivňující růst mikroorganismů v potravinách

Vnitřní : živiny, pH, redox potenciál, vodní aktivita, antimikrobiální aktivity

Vnější: vlhkost, teplota, atmosféra

Implicitní: specifická růstová rychlost, synergismus, antagonismus, komensalismus

Technologické: krájení, mytí, balení, záření, pasteurizace

Vnitřní faktory

Působením mikroorganismů se mění vlastnosti potravin (např. textura, konzistence, vůně, chuť, vzhled). K jakým změnám dojde je závislé na chemických a fyzikálních vlastnostech potraviny (intrinsic factors):

- **složení potraviny (dostupnost živin)**
- **koncentrace vodíkových iontů (pH)**
- **aktivita vody (a_w)**
- **oxido-redukční potenciál (E_h)**
- **textura potraviny**
- **přítomnost antimikrobiálních látek v potravinách**

Vnější faktory

Způsob uchování a skladování potravin má významný vliv na mikroflóru potravin. Jakost a trvanlivost potravin je určována vnějšími faktory (extrinsic factors).

- **teplota prostředí**
- **relativní vlhkost vzduchu (% RV)**
- **složení atmosféry**
- **čas**

Nařízení komise (ES) č. 2073/2005

o mikrobiologických požadavcích na potraviny

Potraviny nesmějí obsahovat mikroorganismy nebo jejich toxiny či metabolity v množstvích, která představují nepřijatelné riziko pro lidské zdraví.

Nařízení komise (ES) č. **1441/2007**, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny

- **Kap. 1 - Kritéria bezpečnosti potravin**

- *Salmonella sp.*
- *Listeria monocytogenes*
- *Enterobacter sakazakii*
- *Bacillus cereus*
- enterotoxiny *Staphylococcus aureus*
- biogenní amíny

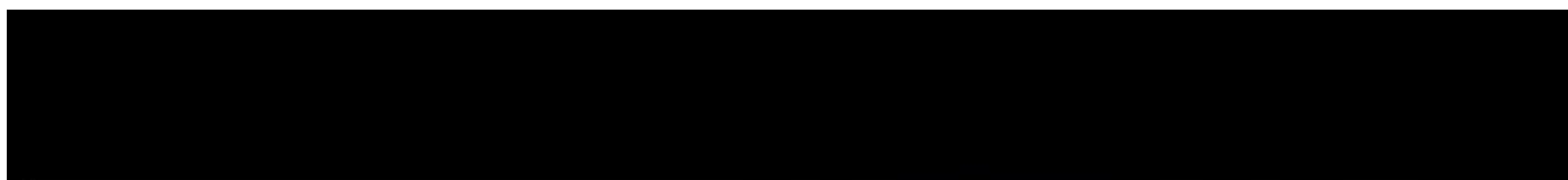
Kap. 2 - Kritéria hygieny výrobního procesu

- maso a výrobky z něj
- mléko a mléčné výrobky
- vaječné výrobky
- produkty rybolovu
- zelenina a ovoce a výrobky

Kap.3 Pravidla pro odběr vzorků a přípravu zkušebních vzorků

Nařízení komise (ES) č. 209/2013 (k nařízení č. 2073/2005)

- Klíčky



„1.29 Klíčky ⁽²³⁾ “	Shiga toxin produkující <i>Escherichia coli</i> (STEC) O157, O26, O111, O103, O145 a O104:H4	5	0	nepřítomnost ve 25 g	CEN/ISO TS 13136 ⁽²²⁾	produkty na trh během údržnosti
--------------------------------	--	---	---	----------------------	----------------------------------	---------------------------------

22 S přihlédnutím k nejnovější úpravě provedené referenční laboratoří EU pro *E. coli* včetně *E.coli* produkujících VTEC, pro zjišťování STEC O104:H4

23 Kromě klíčků, které byly ošetřeny za účelem odstranění *Salmonella* spp. STEC

Louis Pasteur

(1822-1895)



„Pánové, jsou to mikrobi, kteří mají poslední slovo“

Kriteria bezpečnosti potravin

Mléčné výrobky

Salmonella spp.

- Negat./25 g:
- sýry ze syrového mléka (< pasterace)
 - sušené mléko a syrovátka
 - mražené výrobky (s výjimkami)

Stafylokokové enterotoxiny

- Nedetek./25 g
- sýry
 - sušené mléko
 - sušená syrovátka

E. sakazakii

- Negat./10g
- kojenecká výživa (**n=30**)

HACCP v potravinářské mikrobiologie

HACCP

- HAZARD
- ANALYSIS
- CRITICAL
- CONTROL
- POINTS
- Kritické kontrolní body



HACCP historie

- Původně vyvinut během US vesmírného programu NASA.
- Požadavek absolutní bezpečnosti potravin
- V roce 1973 US Food and Drug Administration (FDA) navrhla pro kontrolu nekyselých konzerv
- Postupně zaváděn do nejrůznějších potravinářských výrob

HACCP

- ***Hazard*** znamená zdroj nebezpečí, nepřijatelná kontaminace, růst a přežití mikrobů ovlivňujících údržnost, stupeň nebezpečnosti
- Botulin – nejvyšší hazard
- Enterotoxiny *St.aureus* menší hazard

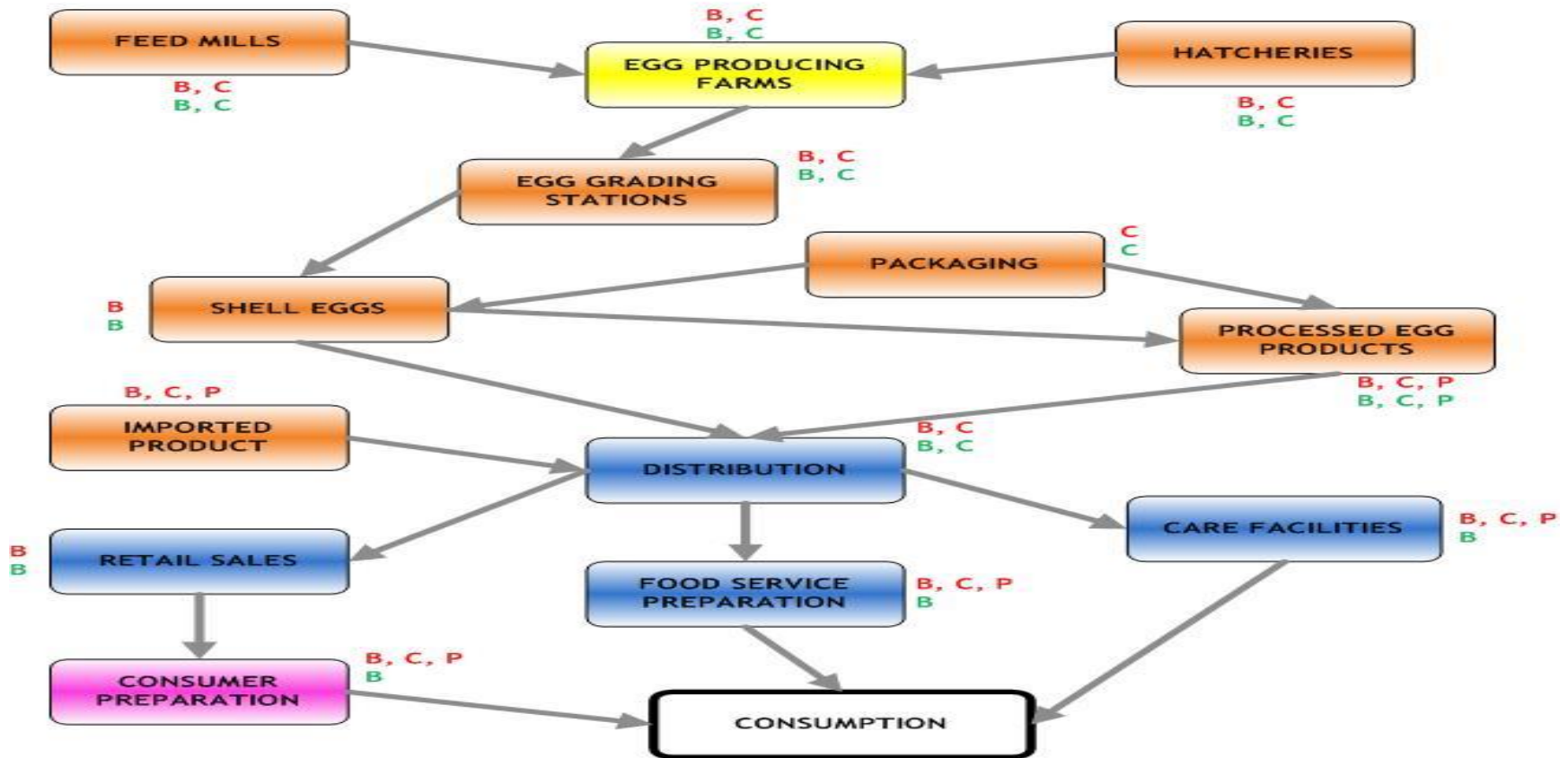
HACCP

- ***Risk*** – odhad stupně pravděpodobnosti výskytu nebezpečí (hazardu).
- Botulin – velice nízký risk
- *Salmonella* – středně vysoký risk
- Navržení systému pro HACCP: vytvoření týmu, úplný popis výrobního procesu, analýza vstupních surovin

HACCP

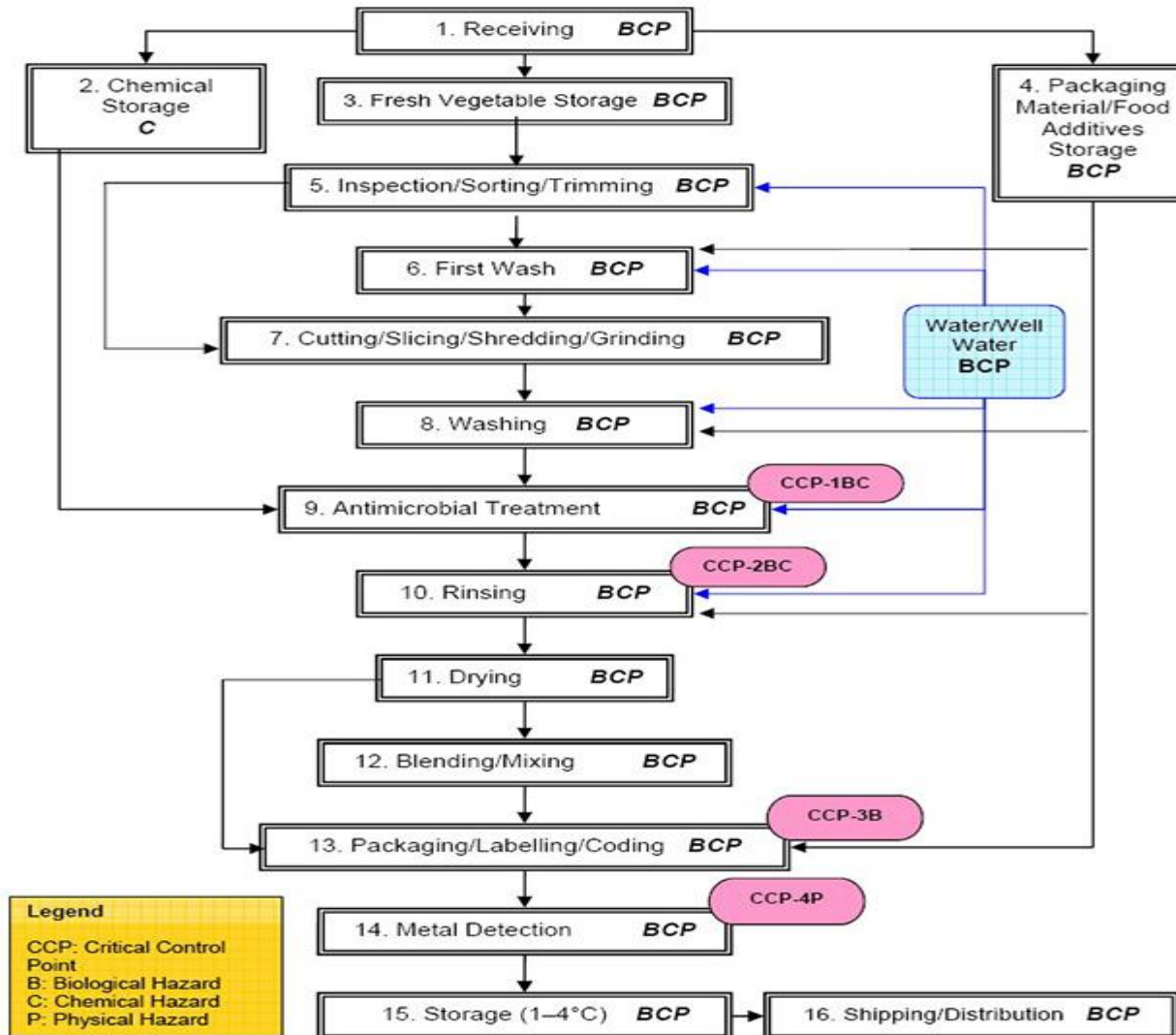
- 1. Analýza nebezpečí
- 2. Nalezení kritických kontrolních bodů
- 3. Vytvoření kritérií pro kontrolní body
- 4. Monitorování kritických kontrol. bodů
- 5. Protokoly pro odchylky kontrol. Bodů
- 6. Vedení záznamů
- 7. Ověření - verifikace

Application of HACCP EGGS



Application of HACCP

Form 3: Process Flow Diagram



HACCP

- Nalezení (identifikace) kritických kontrolních bodů
- Krit. kontrol bod je definován jako naleziště, postup nebo procedura, která ovlivňuje mikrobiologické nebezpečí, které musí být preventivně odstraněno, vyloučeno nebo sníženo na přijatelnou úroveň. Různá tepelná ošetření a pod.

HACCP

- Vytvoření kritérií pro kontrolní body
- Po identifikaci CCP – nutno najít kriteria, která dají proces pod kontrolu
- Fyzikální parametry , T , a_w , velikost balení
- Chemické parametry, pH, koncentrace NaCl, Cl^- v chladící vodě konzerv, množství konzervantů
- Sensorika – textura, vzhled, vůně/zápach

HACCP

- Monitorování kritických kontrol.bodů
- Nejkritičtější část procesu - nutno pracovat v reálném čase a sledovat správné parametry.
- Významná role mikrobiologického testování



WRIGLEY



Vaše výrobky

Skittles (cukerny):

Do **90%** sacharidy

1% Kyselina (citronova:jablecna = 1:1) – v centru 1.4, na cely bonbon cca 1%

5% tuk (v centru 5%, na cely bonbon cca 3.7%)

cca **4%** vlhkost (vlhkost centra je 5,1%, se slupkou pak tech cca 4%)

Zbytek: barva, aroma, emulgator...

Vodni aktivita: 0.32

pH mezi 4-5

Solano varianta Cream(bezcukerny):

84% polyoly

7% Maslo

6% Smetana

Cca **1%** vlhkost

Zbytek: barva, aroma,sul, sladidla, emulgator...

Vodni aktivita: 0.3

pH mezi 6-7

Louis Pasteur

(1822-1895)



„Pánové, jsou to mikrobi, kteří mají poslední slovo“

Co si řekneme příště?

- **mikroorganismy v potravinách**
kazící mikroflora, patogenní organismy
- **současná legislativa**
- **metody stanovení
mikroorganismů v potravinách**

Hodnocení mikrobiologického rizika

- rozlišit typy výrobků:
- - vyžadující zkoušení (podle příslušných norem EN ISO)
- - mikrobiologicky málo rizikové nebo nerizikové

Umyj si ruce PO ...



použití toalety



hraní si se zvířaty

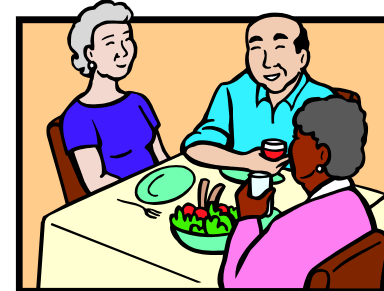


kýchání smrkání, kašlání



šetření otevřené rány

a PŘED ...



manipulací s jídlem

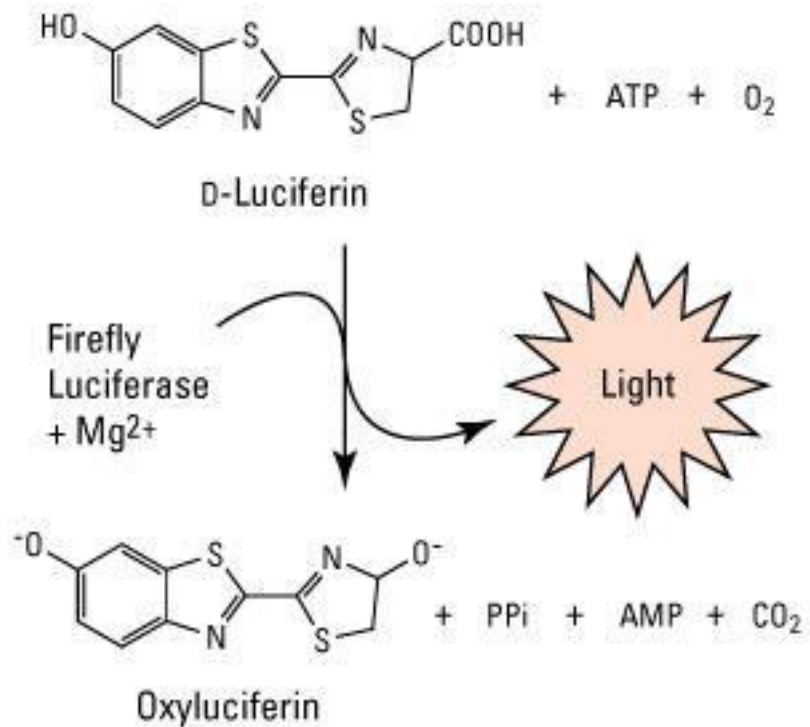
Látky s antimikrobiální aktivitou

- silná oxidační nebo redukční činidla (peroxid vodíku, thiolové sloučeniny)
- polární organická rozpouštědla (např. etylacetát)
- oxidační barviva
- aluminium chlorhydrát > 25% (vytváří nízké pH a aw)
- - hnací plyny (dimethylether, isobutan)

Výrobní technologie

- Kontrola vstupních surovin a obalů
- Dodržení GMP (ISO 227 16)
- Hygiena a sanitace výroby – kontrola
- Teplotní režim v závislosti na charakteru výrobku

Kontrola hygieny a sanitace ATP testem stěry



Pasterace x Pasterizace

Tepelná úprava, která zničí téměř všechny případné nežádoucí mikroorganismy

Tepelné ošetření mléka, nebo-li pasterace je působení tepla po určitou dobu. Rozlišujeme 3 druhy tepelného ošetření :

- **Dlouhá pasterizace** - ošetření nízkou teplotou 63°C po dobu 30 minut
- **Šetrná pasterizace** - šetrné ošetření teplotou 72°C po dobu 15 – 30 sekund
- **Vysoká pasterizace (UHT)** - ošetření vysokou teplotou 135°C po dobu 1 - 2 sekundy

Vnitřní faktory

Působením mikroorganismů se mění vlastnosti potravin (např. textura, konzistence, vůně, chuť, vzhled). K jakým změnám dojde je závislé na chemických a fyzikálních vlastnostech potraviny (intrinsic factors):

- **složení potraviny (dostupnost živin)**
- **koncentrace vodíkových iontů (pH)**
- **aktivita vody (a_w)**
- **oxido-redukční potenciál (E_h)**
- **textura potraviny**
- **přítomnost antimikrobiálních látek v potravinách**

Vnější faktory

Způsob uchování a skladování potravin má významný vliv na mikroflóru potravin. Jakost a trvanlivost potravin je určována vnějšími faktory (extrinsic factors).

- **teplota prostředí**
- **relativní vlhkost vzduchu (% RV)**
- **složení atmosféry**
- **čas**

Dělení mikroorganismů z hlediska požadavků na výživu

Podle nároků na výživu dělíme mikroorganismy:

- 1. Autotrofní** – zdrojem jsou anorganické látky
(C – CO_2 , N – vzdušný dusík, NH_3^+ , NO_3^-)
- 2. Heterotrofní** – zdrojem jsou organické látky
 - a) **prototrofní** (jednoduché org. látky (ethanol, sacharidy a pod.)
 - b) **auxotrofní** (složité org. látky- např. vitamíny, base apod.)

Dělení mikroorganismů z hlediska nároků na pH

Bakterie

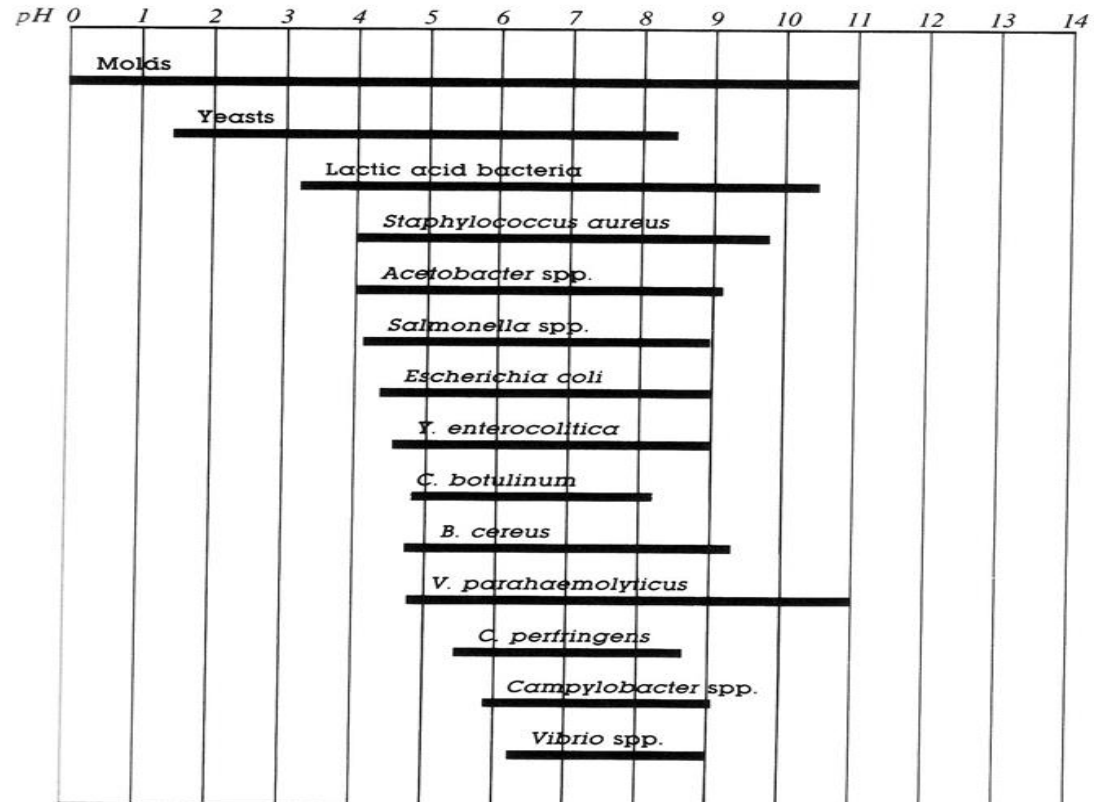
slabě kyselé až slabě alkalické pH

Kvasinky

preferují kyselé prostředí

Plísně

tolerují velmi široké rozmezí



kyselé pH (<4,0) zabraňuje klíčení spór

Dělení mikroorganismů z hlediska nároků na vodní aktivitu a_w

Aktivita vody

- je definována jako poměr parciálního tlaku vodní páry nad potravinou (p) k parciálnímu tlaku vodní páry nad čistou vodou (p_0) při dané teplotě:

$$a_w = \frac{p}{p_0}$$

- množství vody dostupné pro mikroorganismy pro chemické reakce buněk
- **optimální hodnota pro většinu mikroorganismů $a_w > 0,98$**

Aktivita vody - a_w

Bakterie

halofilní x halotolerantní

Kvasinky a plísně

xerofilní x xerotolerantní

osmofilní x osmotolerantní

■ Interval minimálních hodnot a_w	■ Skupina mikroorganismů	■ Příklady	
		■ minimální hodnota a_w	■ mikroorganismus (druh alebo rod)
0,97–0,95	gramnegativně paličkovité baktérie	0,97	<i>Pseudomonas</i> spp.,
		0,96	<i>C. botulinum</i> typ E, <i>Acinetobacter</i> ,
		0,95	<i>Lactococcus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Shigella</i> ,
0,94–0,91	většina bakterií	0,94	<i>Salmonella</i> a jiné, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pediococcus</i>
0,94–0,87	kvasinky	0,94	<i>Candida utilis</i>
		0,88	většina kvasinek způsobující kazění požívatín
		0,87	<i>Debaryomyces</i>
0,90–0,86	grampozitivně koky	0,90	<i>Micrococcus</i>
		0,86	<i>Staphylococcus aureus</i>
0,93–0,80	plesně	0,93	<i>Rhizopus nigricans</i>
		0,83	<i>Penicillium expansum</i>
		0,81	<i>Penicillium patulum</i>
		0,80	většina plísní kazících potraviny
0,80–0,75 (0,61)	halofilní baktérie	0,75	<i>Halobacterium halobium</i>
0,65–0,61	osmotolerantní/filné kvasinky	0,62	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
0,78–0,61	xerotolerantní/filné plesně	0,78	<i>Aspergillus flavus</i>
		0,77	<i>Aspergillus ochraceus</i>
		0,75	<i>Walemia sebi</i>
		0,70	<i>Aspergillus</i> zo sk. <i>glaucus</i>
		0,71	<i>Eurotium chevalieri</i>
		0,69	<i>Chrysosporium fastidium</i>
		0,62	<i>Eurotium echinulatum</i>
		0,61	<i>Monascus bisporus</i>

Aktivita vody - a_w

Potraviny

- lehce kazitelné (více než 0,95)
- středně kazitelné (0,95-0,92)
- málo kazitelné (pod 0,91)

Důležitá je kombinace a_w s ostatními faktory ovlivňujícími přežívání MO v potravinách

Redox potenciál - E_h

Oxidačně redukční potenciál prostředí

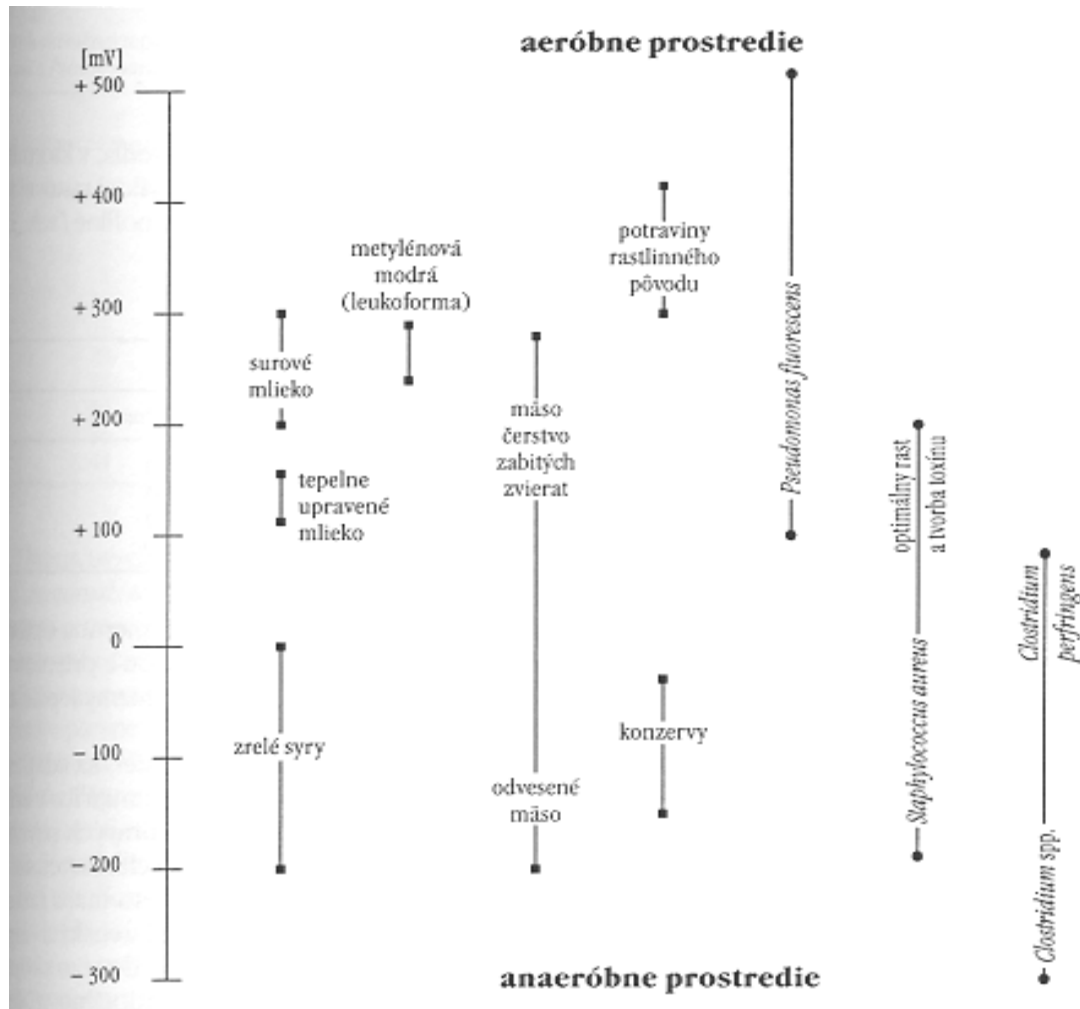
- je rozdíl potenciálu mezi platinovou (kovovou) elektrodou umístěnou do daného prostředí a standardní vodíkovou elektrodou.



Snížení redox potenciálu:

- přidání redukujících látek
- růst aerobních mikroorganismů
- vakuové balení, atd.

Redox potenciál - E_h



Dělení mikroorganismů z hlediska nároků na kyslík

Podle nároků na kyslík dělíme mikroorganismy:

- 1) **Aerobní** – vyžadují vzdušný kyslík – aerobní metabolismus - *Acetobacter*
- 2) **Anaerobní** – vzdušný kyslík inhibuje – anaerobní metabolismus *Clostridium*
- 3) **Mikroaerofiní**- vyžadují malé množství kyslíku – anaerobní metabolismu *Lactobacillus*
- 4) **Fakultativně anaerobní** – mají aerobní i anaerobní metabolismus, za aerobních podmínek rostou rychleji *Saccharomyces, Escherichia coli*

Dělení mikroorganismů z hlediska nároků na teplotu

Je jedním z hlavních faktorů vnějšího prostředí, který ovlivňuje rychlost rozmnožování (přežívání) bakterií

Rozeznáváme 3 základní body teploty

minimální teplotu

optimální teplotu

maximální teplotu

Dělení mikroorganismů z hlediska nároků na teplotu

- **Psychrofilní bakterie (12-15 °C)**
- **Psychrotrofní bakterie (25-30 °C)**
- **Mezofilní bakterie (30-40 °C)**
- **Termofilní bakterie (50-70 °C)**

Vliv vysokých teplot

Smrtící účinek vysokých teplot (letální teplota)

- je nejnižší teplota, při které dochází za určitý čas k usmrcení (**70 °C/10 minut**)
- denaturace bílkovin, inaktivace enzymů, narušení DNA a cytoplazmatické membrány
- je závislá na:
 - druhu mikroorganismu**
 - jeho fyziologickém stavu**
 - koncentraci buněk v prostředí**
 - charakteru prostředí**

Termorezistence

Stupeň odolnosti mikroorganismů je závislý na:

- fyziologickém stavu bakterií
- jejich genetické výbavě
- množství bakterií
- obsahu vody v substrátu
- množství ochranných látek (lipidy, proteiny, sacharidy)

Sterilizace x Sterilace

- **jednorázové použití teploty nad 100 °C**
- sterilizace je definována jako **kombinace teploty a času**
- sterilizaci potravin přežívají některé spóry (rody *Bacillus* a *Clostridium*)

STERILIZOVANÉ POTRAVINY MOHOU OBSAHOVAT SPÓRY!

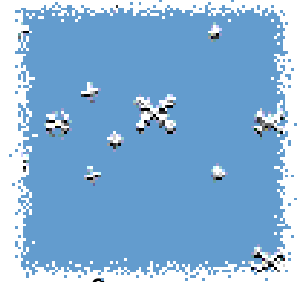
Pasterace

Správně provedená pasterace zaručí:

- devitalizaci patogenních mikroorganismů (***Mycobacterium tuberculosis***)
- devitalizaci podstatné části saprofytické mikroflóry (vegetativních buněk)
- zachování původních fyzikálních, chemických, výživových a senzorických vlastností

**PASTEROVANÉ POTRAVINY OBSAHUJÍ
MIKROORGANISMY!**

Vliv nízkých teplot



Nižší než optimální teploty přežívá většina mikroorganismů dlouhou dobu. Přenesou-li se však z optimálních teplot do teploty kolem 0 °C dochází k **chládovému šoku**.

Při **pomalém zmrazování buněk** na teploty pod 0 °C ze z vnitro i mimobuněčné vody tvoří velké krystaly ledu, které buňku nevratně poškozuje.

Při **rychlém zmrazování buněk** na teploty -30 °C – -180 °C se tvoří mikrokrystalky ledu, které buňky poškozuje jen minimálně.

Po rozmrazení se potraviny rychleji kazí (poškození živočišných i rostlinných pletiv krystaly vody)

Vliv doby a prostředí na růst mikroorganismů

**Bakterie mají krátkou
generační dobu při špatném
skladování dochází k jejich
pomnožení v potravinách.**

