

Zouharová Alena – Dušková Marta – Čutová Michaela – Králová Michaela – Kameník Josef

ABSTRACT

Alimentary diseases caused by toxigenic sporogenous bacteria with a higher potential for survival in adverse temperature conditions represent a serious problem in the protection of public health. In this work, we dealt with the issue of the occurrence of sporogenic and toxigenic *Bacillus cereus* bacteria in freshly cooked foods. As part of the study, 6 different dishes were cooked, in which the pH value, water activity (*a_w*) and NaCl content were determined as parameters influencing spore germination and bacterial growth. The methodology according to ISO 7932:2004 was used for the quantitative and qualitative determination of *B. cereus* bacteria in food. Suspect *B. cereus* colonies were identified using MALDI-TOF MS mass spectrometry and characterization of the isolates was performed by the polymerase chain reaction (PCR) method. With the exception of steamed rice, *B. cereus* was detected in all dishes, but only after multiplication. Virulence factors responsible for the diarrhoeagenic form of the disease, were detected in *B. cereus* isolates obtained. The study also tested the presence of *B. cereus* in cooked food during storage at different temperature conditions (60 °C; 50 °C; 40 °C) and for different lengths of time (0.0 h; 1.0 h; 2.0 h; 2.5 h; 4.0 h). In this case, it was possible to detect *B. cereus* in two dishes by direct cultivation, but always only at 40 °C; after 3 hours of storage in mashed potatoes and after 4 hours in steamed rice. It is clear from the results that the possibility of spore germination and subsequent growth of *B. cereus* in hot food is a real danger, especially if the hot food is not kept at the recommended temperature above 60 °C.

ÚVOD

Bacillus cereus se stal v potravinářském průmyslu hygienickým i technologickým problémem s narůstající důležitostí (Bağcıoğlu et al., 2019). Tato sporogenní bakterie je široce rozšířena v životním prostředí. Prostřednictvím plodin se vegetativní buňky a zejména spory snadno dostávají do potravinového řetězce (Jeßberger et al., 2015).

Teplé pokrmy se uvádějí do oběhu tak, aby se dostaly ke spotřebiteli co nejdříve, a to za teploty nejméně 60 °C (Vyhláška č. 137/2004 Sb), což odpovídá také požadavkům FDA na uchovávání teplých potravin při teplotách 140 °F nebo vyšších (FDA, 2017). V posledních letech se ve velkých městech v Evropě rozšířila distribuce pokrmů kurýrními službami (Simoni and Winkenbach, 2023). Zatímco v provozovnách stravovacích služeb lze při servírování pokrmů docílit minimální teplotu 60 °C, při distribuci na větší vzdálenosti spojené s delším časovým úsekem je to prakticky nemožné. Může proto existovat riziko růstu nežádoucích bakterií, včetně *B. cereus*.

Cílem této studie bylo zjistit, zda v čerstvě uvařených pokrmech detekujeme přítomnost bakterií *B. cereus* a tyto izoláty dále charakterizovat. Součástí této studie bylo také zjistit, zda různá doba a teplota skladování ovlivní detekci *B. cereus* v teplém pokrmu a potvrdit nebo vyloučit možné riziko při transportu pokrmů kurýrními službami.

METODIKA

Bramborová kaše, houbová omáčka, rajská omáčka a rýže vařená byly připraveny dle receptů Runštuk et al. (2015). **Špagety carbonara** podle Bardi (2008) a **ratatouille** podle Roux (2015).

- V období 02-03/2023 připraveny uvedené pokrmy pro mikrobiologické vyšetření na přítomnost *B. cereus* - podle ČSN ISO 7932 (560092)
- V období 06/2023 až 04/2024 postupně připraveny všechny pokrmy, které byly po uvaření rozděleny na jednotlivé porce (150 g) a zabaleny bez výměny atmosféry na baliče T-190 (MetalPack, dodavatel Maso-profit, s.r.o., Praha) + temperování v termostatech na teploty 40; 50 a 60 °C
- Vzorky odebírány bezprostředně po zabalení a dále po 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0 a 4,0 h
- Získané izoláty podrobeny analýze MALDI-TOF MS (UltrafleXtreme instrument, Bruker Daltonik, Germany; FlexControl 3.4 software; BioTyper software version 3.0; Bruker Daltonik; BioTyper database entries version 10.0)
- Všechny potvrzené izoláty *B. cereus* byly vyšetřeny na přítomnost genů *nheABC*, *hblCDA*, *cytK* a *ces* kódujících produkci nehemolytického enterotoxinu (Nhe), hemolysinu BL (Hbl), cytotoxinu K (CytK) a produkci cereulidu (Ces) – pomocí multiplex PCR (polymerázová řetězová reakce)

VÝSLEDKY

- S výjimkou vařené rýže byla přítomnost *B. cereus* prokázána ve všech pokrmech, ale pouze po pomnožení.
- Přímou kultivací na agaru se *B. cereus* nepodařilo izolovat ani v jednom případě.
- Celkem bylo z pokrmů získáno a potvrzeno 10 izolátů *B. cereus*
- U 80 % izolátů získaných z pokrmů v naší studii byla zjištěna přítomnost alespoň jednoho z genů virulence *nheABC*, *hblCDA*, *cytK*, tedy faktorů virulence zodpovědných za diarhogenní formu onemocnění.
- Při skladování hotových pokrmů v různých teplotách (40; 50 a 60 °C) → *B. cereus* detekován u dvou pokrmů, a to u vařené rýže a bramborové kaše (pouze ve 40 °C)
- V bramborové kaši byl *B. cereus* detekován už po 2 hodinách v počtu 1,6 log KTJ/g a po 4 hodinách již 4,3 log KTJ/g
- Ve vařené rýži byl *B. cereus* detekován po 4 hodinách v počtu 2 log KTJ/g

ZÁVĚR

Výsledky této studie potvrzují, že sporogenní a toxigenní bakterie *B. cereus* je v gastronomickém průmyslu reálný problém, který může ohrozit zdraví konzumentů. Ve všech uvařených pokrmech v této studii byly alespoň jednou izolovány bakterie *B. cereus*. Polymerázová řetězová reakce prokázala u 80 % získaných izolátů přítomnost alespoň jednoho z genů virulence zodpovědných za diarhogenní formu onemocnění. V bramborové kaši byl po 4 hodinách skladování ve 40 °C zjištěn počet *B. cereus* 4,3 log KTJ/g, v rýži 2 log KTJ/g. Závěrem lze tedy konstatovat, že dodržení teploty 60 °C při uvádění teplých pokrmů do oběhu je pro zachování zdravotní nezávadnosti pokrmu zásadní a distribuce pokrmů kurýrními službami je potenciálním nebezpečím.