

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav technologie potravin



**Testování antimikrobiální aktivity obalových materiálů
s rostlinnými extrakty proti *E. coli* a koliformním
bakteriím**

Diplomová práce

Vedoucí práce:
Ing. Libor Kalhotka, Ph.D.

Vypracoval:
Bc. Jan Šabršula

Brno 2016

Originální zadání:

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci.....

.....
vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazují se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří především vedoucímu diplomové práce panu Ing. Liborovi Kalhotkovi, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas, ochotu, cenné rady a konzultace. Dále zpracování mé diplomové práce bylo podpořeno projektem TA03010799 - Využití nanomateriálů a přírodních extraktů jako funkčních látek ve vývoji aktivních obalových materiálů s bariérovým, antimikrobiálním, protektivním a kyslík pohlcujícím efektem. Velké díky, patří i mé rodině a přátelům za podporu při celém studia na univerzitě.

Obsah

1. ÚVOD	10
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1 Obalové materiály používané v potravinářství	11
2.1.1 Kovy	11
2.1.2 Sklo.....	12
2.1.3 Papír.....	12
2.1.4 Balicí a povlakové materiály z požitelných látek	13
2.1.5 Polymerní obalové materiály.....	14
2.2 Antimikrobiální účinky rostlin.....	15
2.2.1 Nejčastěji vyskytující se látky s antimikrobiálními účinky.....	16
2.2.2 Antimikrobiální účinky vybraných druhů rostlin	17
2.2.3 Metody stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám	19
2.3 Rostlinné silice	21
2.3.1 Složení silic	22
2.3.2 Výskyt silic	23
2.3.3 Získávání silic.....	23
2.3.4 Testování antimikrobiálního účinku silic	24
2.4 Charakteristika koliformních bakterií	25
2.4.1 Rod <i>Escherichia</i>	25
2.4.2 Rod <i>Citrobacter</i>	27
2.4.3 Rod <i>Enterobacter</i>	28
2.4.4 Rod <i>Klebsiella</i>	29
2.4.5 Rod <i>Serratia</i>	31
2.5 MIKROBIOLOGICKÁ KRITÉRIA	32
2.5.1 Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny.....	33

2.5.2 Požadavky na potravinářské provozovny	33
2.6 Boj proti mikroorganismům v potravinářských podnicích	35
2.6.1 Systém HACCP – Hazard analysis and critical kontrol point	35
3. CÍL PRÁCE	41
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
4.1 Materiál a metodika.....	42
4.1.1 Charakteristika materiálu.....	42
4.1.2 Příprava mikrobiálního inokula	44
4.1.3 Postup experimentu	44
4.1.4 Mikrobiologická analýza	45
4.1.5 Označení vzorků	45
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	46
5.1 Experiment 1 – balení sýru eidamského typu o 30 % tvs.	46
5.2 Experiment 2 – balení salámu Junior	55
5.3 Experiment 3 – balení celeru.....	59
6. ZÁVĚR	64
7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	65
8. SEZNAM OBRÁZKŮ	74
9. SEZNAM TABULEK	75

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá hodnocením a testováním antimikrobiální aktivity obalových materiálů potravin, které obsahují rostlinné extrakty a pomáhají v boji proti *Escherichia coli* a ostatním koliformním bakteriím. Práce je rozdělena na několik částí.

První polovina práce obsahuje literární rešerši týkající se dané problematiky obalových materiálů obsahujících rostlinné extrakty.

Dále je práce také zaměřena na literární rešerši týkající se koliformních bakterií a to především rodu *Escherichia coli*, popisuje tyto mikroorganismy a také jejich produkty a účinky, které mohou negativně ovlivnit lidské zdraví.

Další část práce jsem se zaměřil na opatření v boji proti nežádoucím mikroorganismům. Druhá polovina práce se zabývá již samotným testováním obalových materiálů, které obsahují rostlinné extrakty na příslušných modelových organismech popřípadě přímo na potravinách.

Data, která byla se získána zkoumáním, byla zpracována, porovnána s údaji v dostupné literatuře a jsou uvedena v závěru práce.

Klíčová slova: *Escherichia coli*, koliformní bakterie, obalové materiály, rostlinné extrakty

ABSTRACT

This dissertation deals with evaluation and testing of food packaging materials antimicrobial activity that contain plant extracts and help in the fight against *Escherichia coli* and other coliform bacteria. This dissertation is divided into several parts.

The first half of the work contains a literature review publishing about packaging materials containing plant extracts.

It is also focused on literature review on the coliform bacteria, especially *Escherichia coli* genus, describes these microorganisms and their metabolic products, the effects of metabolic products which may negatively affect human health. Another part deals with measures to prevent undesirable microorganisms.

The second half of the work has been engaged in actual testing of packaging materials containing plant extracts on relevant model organisms or directly on food.

Data, acquired by testing are processed, compared with the figures in the available literatures and are listed at the end of work.

Keywords: *Escherichia coli*, coliforms, packaging materials, plant extracts

Seznam použitých zkratek:

- Tvs. = obsah tuku v sušině
- TSB = tryptózo – sójový bujon
- McF.= Mc Farlandova stupnice
- CPM = celkový počet mikroorganismů
- PCA agar = živný agar pro stanovení celkového počtu mikroorganismů
- VRBL agar = živný agar pro stanovení koliformních bakterií
- PCA with skimmed milk = živný agar pro stanovení mikroorganismů mléčného kvašení
- MIC = minimální inhibiční koncentrace
- MBC = minimální baktericidní koncentrace
- PEG = polyethylenglykol
- DMSO = Dimethylsulfoxid
- DNA = Deoxyribonukleová kyselina
- RNA = Ribonukleová kyselina
- apod. = podobně
- subsp. = poddruh
- a_w = aktivita vody
- ES = evropské společenství
- HACCP – Hazard analysis and critical control point
- UV = ultrafialové světlo
- rpm. = otáčky za minutu
- SMODCH = směrodatná odchylka

1. ÚVOD

Potravinové obaly používané v potravinářském průmyslu jsou obvykle vyrobeny z kovu, skla, papíru, balicích a povlakových materiálů z požitelných látek nebo z polymerních obalových materiálů. Tyto obaly mají za úkol potraviny chránit před kontaminací. Musí splňovat hygienické požadavky a nesmí potravinu kontaminovat nebo jakkoli porušit její zdravotní nezávadnost, která by následně mohla ovlivnit lidské zdraví. Musí být zohledněno, z jakých materiálů byl obal pro potraviny vyroben a jaká potravina je daným obalem balena a po jakou dobu je potravina v kontaktu s obalem. Z hlediska balení potravin se nedoporučují některé kombinace obalů s potravinami, ať už z fyzikálních vlastností nebo chemických vlastností obalů a potravin, také z ekonomických důvodů by neměl být dražší obal na potravinu nežli zabalená potravina.

Obalové materiály, do kterých jsou přidány rostlinné extrakty mají za úkol zvýšit bezpečnost balených potravin a zamezit tím mikrobiálnímu kažení potravin. Bylo zjištěno, že látky přírodního původu zejména silice mají protizánětlivé a antioxidační účinky. Některé látky přírodního původu prokázaly i inhibiční účinky na růst bakterií, virů, hub, tak i parazitů. Preference přírodních látek je neustále na vzestupu pro jejich minimální toxicitu, vedlejší účinky, dobrou dostupnost a lepší odbouratelnost ve srovnání s antibiotiky. Nevyužívají se jen extrakty z rostlin, ale i jednotlivé složky, které tyto extrakty obsahují. Účinné látky byly získány z rostlin moderními metodami a jejich antibakteriální aktivita je testována stejně jako u antibiotik.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Obalové materiály používané v potravinářství

Nejčastějšími a nejvýznamnějšími obalovými materiály, které jsou v přímém kontaktu s potravinami, jsou kovy, sklo, keramika, polymerní materiály, dřevo a balící a povlakové materiály z požitelných látek (Velíšek, 1999).

Jedním z nejzávažnějších hygienických problémů při balení potravin je kontaminace potravin složkami obalu v důsledku jejich vzájemné interakce. Téměř pokaždé, když je potravina v kontaktu s obalovým materiálem, dochází ke vzájemnému sdílení hmoty a to i v případě použití stabilních materiálů jako je sklo. Pro zachování zdravotní nezávadnosti potravin, musí být pro balení potravin použity materiály obecně kvalitnější, než je tomu při výrobě ostatních výrobků (Vickie et Christian, 2008).

2.1.1 Kovy

Kovy patří mezi významné obalové materiály pro výrobu mnoha spotřebitelských a přepravních obalů o různé velikosti (Velíšek, 1999).

Pro výrobu obalových materiálů se z kovu hodí především ocel. Používá se zejména s různou povrchovou úpravou, na níž se stále více podílejí polymerní látky. Cín, jako samotný obalový materiál se již nepoužívá, protože je celosvětově považován za deficitní kov. Cín se používá pro povrchovou úpravu ocelových, konzervových plechovek, v poslední době se uplatňuje také zinek a chrom (Vickie et Christian, 2008).

U kovů oceňujeme z obalového hlediska především jejich značnou tvrdost, neprodyšnost a v určitých případech i dobrou tepelnou vodivost. Nevýhodou kovových obalů je jejich náchylnost ke korozi, kterou způsobují některé náplně uvnitř konzervy, popřípadě i vlivem atmosférických podmínek (Štepek et al., 1981).

Konzervové plechovky jsou jedním z nejdůležitějších plechových obalů, jsou vyráběny hlavně z ocelových plechů, které jsou zpravidla zároveň nebo elektrolyticky pocínované. Pro kyselé náplně za přítomnosti kyslíku a pro náplně způsobující černání plechovek tvorbou sulfidů se povrch plechovek musí dále lakovat. Konzervárenské plechovky jsou proto lakovány zevnitř, někdy se z ochranných důvodů lakují i zvenčí. Laky, kterými se lakují plechovky z vnitřní strany, nesmí uvolňovat toxické složky do potravin, nepředávat chuť potravině a musí být stabilní při sterilizační teplotě.

Pro nižší sterilizační teploty (ovoce, zelenina) se používají laky olejoprskyřičné. Pro vyšší sterilizační teploty (maso) se používají laky na bázi fenolických prskyřic. Podmínkou pro správnou funkci lakové vrstvy je dobrá adheze k podkladu a odolnost proti náplni (Štepek et al., 1981).

2.1.2 Sklo

Sklo se osvědčilo jako obalový materiál a velmi dobře obstojí i ve srovnání s nejnovějšími potravinářskými materiály. K přednostem skla patří velká chemická odolnost, dobrá omyvatelnost a možnost sterilace skleněných obalů. Průhlednost skla, vratnost obalů a dostupnost suroviny pro skleněné obaly jsou jeho výhodou. Značnou nevýhodou skla je jeho křehkost a značná hmotnost, menší tepelná vodivost a menší odolnost k teplotním změnám. K nevýhodám patří i energetická náročnost na výrobu skla (Paine et Heather, 1992).

Sklo je velmi citlivé na ohřívání a ochlazování. Tepelná odolnost skleněných obalů je dána rozdílem teplot, které musí skleněný obal vydržet. U lahví určených pro sterilaci musí obal snést tepelný náraz 40 °C, ostatní nápojové obaly 35 °C. (Štepek et al. 1981; Paine et Heather, 1992).

Volba barvy skla se řídí požadavky na odfiltrování nežádoucího podílu záření, aby obal získal pro zákazníka opticky lepší vzhled. Pro bezbarvé sklo je dovolen mírný namodralý, nazelenalý popřípadě narůžovělý odstín. Obaly ze skla jsou především určeny pro tekuté, kašovitě, práškové, kusové výrobky v nálevu, nebo výrobky sušené. Jedná se tedy především o obaly spotřebitelské. Osvědčily se ale i větší skleněné obaly, například balóny pro ovocné šťávy a koncentráty. Skleněné obaly určené pro potravinářský průmysl se dělí na obalové sklo nápojové (mléko, víno, pivo, ovocné šťávy, limonády, sirupy, lihoviny) a obalové sklo konzervové (Štepek et al., 1981; Paine et Heather, 1992).

2.1.3 Papír

Papírenské výrobky jsou vhodným materiálem pro různé spotřebitelské nebo přepravní obaly. Surovina je poměrně dobře dostupná (dřevo, široký sortiment papírenských výrobků včetně jejich zušlechťování impregnací a kombinací s plasty). Surovinou pro výrobu papíru je dřevo a to převážně dřevo smrkové a jedlové. V daleko menší míře také dřevo listnatých stromů. Velkým přínosem pro obalovou techniku jsou papírové výrobky upravené impregnací (povlákáním). Impregnační prostředek zajišťuje

odolnost proti vodě, zabrání pronikání vodních par a dalších plynů, zvýší odolnost k chemickým vlivům, umožní tepelné spájení obalového materiálu, někdylepší i vzhled (Štepek et al. 1981; Gellerstedt, 2009).

Papír impregnovaný silikony zajišťuje hydrofobnost, lyofobnost a také velkou nepřilnavost k nejrůznějším materiálům. Tyto jeho vlastnosti umožňují velké uplatnění silikonových papírů u širokého sortimentu výrobků, kde dříve působila přilnavost k papíru značné potíže. Jedná se především o výrobky jako cukrovinky, datle, fíky, mražené potraviny, maso), nebo také ve formě proložek např. u dortů, jiných pekařských výrobků, krájených sýrů atd. (Štepek et al., 1981).

Pergamenové papíry jsou nepromastitelné papíry s vhodnými vlastnostmi. Jsou vyrobené z kvalitní buničiny. Pergamenový papír je nepropustný pro tuky a nerozmáčí se ani ve vroucí vodě. Slouží především k balení tučných a vlhkých potravin např. maso, tvaroh, sýr a tuky (Štepek et al., 1981).

2.1.4 Balicí a povlakové materiály z požitelných látek

Kromě běžných obalových materiálů se v potravinářství používají i požitelné obalové materiály. Chemicky jsou velmi různorodé, základem jsou tři hlavní skupiny živin (cukry, bílkoviny a lipoidní látky). Je možné sem zařadit i látky syntetické. Požitelné obalové materiály jsou vyrobeny především ve formě měkkých obalů nebo povlaků. Za jednoduchý jedlý obal je možné považovat i vrstvu ledu, kterou se potahují některé zmražené potraviny, aby nedošlo k jejich vysušení a neoxidovaly (Embuscado, 2009).

Balicí povlaky vyrobené z jednoduchých cukrů (disacharidů), poskytují obvykle omezenou ochranu, neboť jsou značně hygroskopické a jejich použitelnost je omezena i jejich sladkou chutí. Příkladem použití tohoto obalového materiálu je glazování proslazeného ovoce. Obalovým jedlým materiálem vyrobený ze sacharidů je také amylosa ve formě folií, nebo povlaků. Obaly na bázi amylosy jsou doporučeny pro balení omáček, zmraženého masa, drůbeže, ryb ale můžeme se s ním setkat i ve formě párkových střev. (Štepek et al., 1981; Embuscado, 2009).

Obaly vyrobené z celulosy jsou nestravitelné a mají nevhodnou kompaktní formu. Za požitelné jsou považovány ve vodě rozpustné deriváty celulosy (methylcelulosa, karboxymethylcelulosa), z nichž lze připravit transparentní povlaky, folie (Štepek et al., 1981).

Další velkou skupinou jedlých obalů, je skupina vycházející z proteinů. Tady mají význam především želatina a umělá střívka. Nejvíce oceňuje výrobu z želatinových filmů farmaceutický průmysl. Vyrábí z filmů želatiny nejčastěji kapsle pro léky. K účelům povlékání salámů se používá želatina v kombinaci s pektinem, algináty, cukry, kaseinem a škroby. Osvědčeným jedlým obalem se staly umělá klišovková střeva, která účelně nahrazují v určitém směru především z hygienického hlediska střeva vepřová (Embuscado, 2009).

Balící a povlakové materiály lipidového charakteru jsou většinou látky hydrofobní, primárně odolné proti vodě s poměrně malou propustností pro vodní páru. Jako požitelné povlaky lze použít i vosky, protože jsou chemicky značně stálé, často i fyziologicky zcela nezávadné. Vosky jsou estery vyšších mastných kyselin obsahující vyšší primární alkoholy. Vosky obsahují kyseliny a to především cerotovou a metanovou kyselinu. Alkoholickou složkou je nejčastěji cetylalkohol, myricilalkohol (Embuscado, 2009; Štepek et al., 1981).

2.1.5 Polymerní obalové materiály

Na bázi polymerů se pro balení potravin používá celá škála obalů vyrobených z polymerů. Jejich rozsah použití se v současné době velmi rozšiřuje. Základní typy polymerních obalů jsou:

- polyolefiny – polyetylen, polypropylen,
- vinylové polymery – polyvinylchlorid, polystyren, polyvinylacetát, polyvinylalkohol,
- dusíkaté polymery – polyamidy, polyuretany,
- polyestery – polyethyltereftát, polykarbonát, termosové polyestery,
- termosety – fenolformaldehydové pryskyřice, aminoformaldehydové pryskyřice, epoxidové pryskyřice (Velíšek, 1999).

Polyetylen je celosvětově nejvíce produkovaným plastem. Tato látka má největší využití v oblasti balicího materiálu jako obaly při výrobě průmyslových obalů, folií, lahví na mléko, lahví pro čisticí prostředky, povlaky a přepravní obaly pro široké spektrum výrobků (Beswick et Dunn, 2002; Hanlon, 1971).

Polypropylen je významný, komerčně využívaný plast. Největší využití polypropylenu je zejména při výrobě folií, pro výrobu obalů, misek a nádobí určeném pro mikrovlnné ohřevy (Beswick et Dunn, 2002; Hanlon, 1971).

Polyvinylchlorid je velmi flexibilní a odolný materiál. Jeho využití je zejména při výrobě lahví a tub pro toaletní potřeby, kosmetiku. Jako obalový materiál pro potraviny se používá jen pro mléčné výrobky a jedlé oleje. Foliový polyvinylchlorid se používá převážně pro balení másla, masa, drůbeže, ryb, čerstvého ovoce a zeleniny. Jeho výhodou je především odolnost proti olejům a tukům, voskům, organickým rozpouštědlům. Nevýhodou je také jeho nepříjemný zápach, který se projeví při oxidaci stabilizátorů po výrobě, z tohoto důvodu by se folie vyrobené z tohoto materiálu neměly ihned používat pro balení potravin (Beswick et Dunn, 2002, Hanlon, 1971).

2.2 Antimikrobiální účinky rostlin

Odvěkou představou je nalezení léčivé síly rostlin. Lidé žijící po celém světě používají již po dlouhá staletí a tisíciletí obklady, užívají odvary z tisíců domorodých rostlin. Následek léčby neměl vždy za příčinu odstranění symptomů. Díky neznalosti vlastností rostlin mnohdy docházelo k otravám lidí (Ciocan et Băra, 2007).

Ve 20. století nástup antibiotik vedl k poklesu užívání rostlinných léčiv, upadl také zájem po vědeckém zkoumání jejich funkčních vlastností. Nepříznivé účinky užívání antibiotik a dalších syntetických látek na lidský a zvířecí organismus a na kvalitu a bezpečnost produktů mají za efekt znovuoobjevení zájmu o látky rostlinného původu v oblasti fytofarmacie, fytofarmacie, fytofarmacie a fototerapie za poslední dekádu let. Od roku 2006 je používání antibiotik a jiných syntetických látek jako přídavek do krmiva pro dobytek v Evropské unii zakázán. Hlavním důvodem je totiž riziko pro lidské zdraví s ohledem na obsah reziduí v potravinách a také z důvodu rezistence mikroorganismů na antibiotika. Rezistence může přecházet i na patogeny, které jsou nebezpečné pro člověka. Provádí se proto výzkum pro využití rostlin, rostlinných extraktů nebo sloučenin rostlinného původu jako potencionálních přírodních alternativ pro zvýšení produkce hovězího dobytka. (Makkar et al., 2009).

Odhaduje se, že v dnešní době je 50 % léčiv západních zemí vyrobeno z rostlinných materiálů. Primárním přínosem užívání léčiv rostlinného původu je jejich potenciální bezpečnost, oproti jejich syntetickým alternativám (Ciocan et Băra, 2007).

Bioaktivita je připisována především přítomnosti sekundárních metabolitů v rostlinách, které mohou mít přínosný ale i nepříznivý účinek (Makkar et al., 2009). Sekundární metabolity projevují svou účinnost napodobováním endogenních metabolitů, ligandů, hormonů, molekul přenášejících signály nebo neurotransmiterů. Díky tomu, že se takto chovají, mají pozitivní léčebný vliv na člověka (Ciocan et Băra, 2007). Rostliny mají neomezenou schopnost syntetizovat aromatické substance, jako jsou fenoly nebo jejich kyslíkaté deriváty. Ve velké části případů tyto sloučeniny rostlina produkuje jako obranný mechanismus vůči útoku mikroorganismů, hmyzu a býložravců. Určité látky, jako například terpenoidy, dávají rostlinám aroma, jiné (chinony, taniny) jsou odpovědné za zbarvení rostlin (Cowan, 1999).

2.2.1 Nejčastěji vyskytující se látky s antimikrobiálními účinky

Fenoly a polyfenoly mají antimikrobiální aktivitu jako například kyselina kávová, která účinkuje proti virům, bakteriím a plísním. Další látky v této skupině jsou katechol a pyrogallol. Toxicita těchto látek vůči mikroorganismům je dána inhibicí enzymatického aparátu patogena díky přítomným – OH skupinám. Fenolové skupiny obsahují tříuhlíkatý postranní bezkyslíkatý řetězec, díky němu jsou v nižším oxidačním stupni nazývány silicemi a mají antimikrobiální účinky. Jako příklad je eugenol, který inhibuje bakterie, plísně a kvasinky. Chinony a hydrochinony mají účinek proti mikroorganismům v tom, že inaktivují bílkoviny a podporují ztrátu jejich funkčnosti (Cowan, 1999; Ciocan et Băra, 2007). Příkladem je antrachinon, který je obsažen v rostlině *Cassia italica*, působí bakteriostatickým účinkem vůči druhům *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium pseudodiphtherium*, *Pseudomonas aeruginosa*, baktericidně proti *Pseudomonas pseudomalliae*.

Flavony jsou látky obsahující aromatický kruh, jejich tvorba v rostlině je odezvou na mikrobiální infekci. Tyto látky jsou přirozeně funkční proti širokému spektru mikroorganismů. Katechiny, tříuhlíkaté flavonoidy, se vyskytují v zeleném čaji, kde vykazují také antimikrobiální vlastnosti. Katechiny inhibují růst *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella* a mnoha dalších. Taniny, polymerní fenolové látky, mají adstringenní účinky (svíravé) (Ciocan et Băra, 2007; Cowan, 1999).

Kumariny, které vznikají spojením benzenu a α -pyranonu, mají schopnost stimulovat makrofágy a tak mohou mít nepřímý vliv na negativní efekt infekce (Cowan, 1999). Hydroxyskořicovou kyselinu řadíme mezi kumariny, má schopnost inhibovat

grampozitivní bakterie. Inhibiční aktivita antokyanů a proanthokyanů byla prokázána za přítomnosti glukosy, díky čemu tyto látky inhibují respiraci a množení bakterií rodů *Escherichia*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Lactobacillus* a *Salmonella* (Fernandez, 1996; Kyzlink, 1980).

Terpeny a silice nesou pouze jejich aroma. Terpeny mají antimikrobiální aktivitu, antifungální, antivirální a antiprotozoózní účinky. Mechanismus jejich účinku není přesně známý, ale předpokládá se narušení lipofilní membrány (Ciocan et Bára, 2007; Cowan, 1999). Vědci v oboru potravinářství zjistili, že terpenoidy které jsou přítomné v silicích rostlin, mohou být užitečné v kontrole výskytu *Listeria monocytogenes* (Aureli, 1992).

Alkaloidy jsou látky vykazující účinnost proti mikroorganismům. Jejich formy v čistém stavu, jsou používány po celém světě díky svým baktericidním, analgetickým a antispasmodickým vlastnostem (Ciocan et Bára, 2007; Cowan, 1999).

Peptidy jsou známými inhibitory mikroorganismů již po dlouhou dobu. Mechanismus jejich účinku spočívá v utváření iontových kanálků v bakteriální membráně nebo v kompetitivní inhibici (přilnutí bakteriálního obalu na povrch hostitele) (Cowan, 1999). Thiony jsou peptidy, které se nachází v ječmeni a pšenici. Jsou toxické vůči kvasinkám, gramnegativním a grampozitivním bakteriím (Ciocan et Bára, 2007).

2.2.2 Antimikrobiální účinky vybraných druhů rostlin

Významný antimikrobiální účinek surového etanolového extraktu byl prokázán u rostliny *Bergenia crassifolia* proti pěti nejčastěji se vyskytujícím patogenním mikroorganismům tj. *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* (Kokoška et al., 2002). Rostliny *Bergenia crassifolia* obsahují fenolové sloučeniny (hydrochinon, quercetin, dihydroquercetin, rutin, kyselina gallová, eskuletin), které vykazují antimikrobiální účinky (Shilova et al., 2006). Velký účinek proti *Bacillus subtilis*, *Escherichii coli*, *Staphylococcu aureu* byl prokázán při zkoumání účinku kořene rostliny *Bergenia ligulata*. V boji proti *Sacharomyces* byla tato část rostliny neúčinná. Při chemickém rozboru kořene byly zjištěny tyto látky: β -sitosterol, β -sitosterol-D-glukosid, bergenin a paashaanolakton (Sajad et al., 2010). Látka arbutin má silné antimikrobiální účinky, které jsou

ve vysokém množství přítomny v bergéniích, ale vysoké množství arbutinu může působit na lidský organismus nefro – nebo hepatotoxicky (Novak, 2010).

Antimikrobiální účinek byl prokázán v rostlinách rodu *Tradescantia*. Především přítomnost flavonů hlavně C-glykosidů apigeninů a luteolinu (Martínez et Martínéz, 1993). Byl potvrzen antimikrobiální účinek této látky proti širokému spektru bakterií: pseudomonády, stafylokoky, streptokoky, xanthomonády a další. Lektin je další účinnou látkou, která je obsažena v kořeni rostlin *Setcreasea purpurea* (Naidu 2000; Cowan, 1999; Ciocan et Băra, 2007; Ncube et al., 2008). Vyznačuje se antifugálním účinkem proti plísním rodu *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Penicillium italicum*, *Helminthosporium maydis* (Yao et al., 2010). Skupiny flavonoidů tj. anthokyanidiny, zebrin a monodekaffeylzebrin jsou látky, které obsahuje rostlina *Tradescantia zebrina* (Tatsuzawa et al., 2010). Již výše bylo uvedeno, že antimikrobiální efekt těchto látek byl prokázán.

U rostliny *Draceana cinabarit*, která vylučuje pryskyřici, byl prokázán taktéž antimikrobiální účinek. Extrakt této rostliny inhiboval růst mikroorganismů jako je *Bacillus cereus* var *mycoides*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidemidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Sacharomyces cerevisce* (Kumar et al., 2006).

V dichlormethanovém extraktu rostliny *Draceana steudneri* byl objeven antifugální účinek. Extrakt z této rostliny působí proti houbám, jako jsou *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus niger*. Účinky antimikrobiálního původu rostliny *Draceana cambodiana* mají za důsledek flavany izolované z kmene této rostliny, dále pak z metanolového extraktu kořene izolované 22 - spirostanové steroidy, z nichž některé mají i inhibiční účinky proti bakteriím *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a plísní *Fusarium oxysporum* (Van Mihn et al., 2009; Liu et al., 2008). Rostlina *Dracena angustifolia* díky jejím steroidním saponinům izolovaných z čerstvých kmenů vykazuje účinek proti kvasivce *Cryptococcus neoformans* (XU, 2010).

Mezi rostliny rostoucí v naší oblasti můžeme zařadit rostliny hluchavkovité a miříkovité. U těchto rostlin bylo zjištěno velké množství obsahových látek chemického původu. Nejvýznamnějšími látkami jsou terpenické sloučeniny (především

monoterpeny, diterpeny a seskviterpeny) obsažené v silicích. Množství a chemické složení silice se přitom může lišit v rámci jednoho druhu. Dalšími zjištěnými chemickými látkami jsou éterické oleje a saponiny. Významné je také zastoupení fenolických sloučenin, naopak téměř chybí alkaloidy (Mareček F., 1997).

2.2.3 Metody stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám

Jsou dva způsoby metod zjišťování citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám.

- kvalitativní průkaz citlivosti na antimikrobiální látky.
- kvantitativní stanovení citlivosti na antimikrobiální látky (Votava, 2005).

Hlavním účelem testování za použitím těchto metod je zjištění, zda vůbec a případně do jaké míry je mikroorganismus citlivý (Bednář, 1996). Kvalitativním vyšetřením zjistíme na kterou látku je mikroorganismus citlivý (Podstatová, 2001). Kvantitativní vyšetření určuje citlivost vyjádřenou přímo minimální inhibiční koncentrací (MIC), nebo nepřímo průměrem inhibiční zóny kolem disku (Bednář, 1996).

2.2.3.1 Kvalitativní metody

Úplně nejběžnější metodou v této skupině je diskový difúzní test. Princip tohoto testu spočívá v tom, že mikroorganismus, který je kolem disku s antimikrobiální látkou, na niž je potencionálně citlivý, nevyroste. Kolem disku se vytvoří inhibiční zóna růstu mikroorganismu. Proto, aby byl výsledek spolehlivý, je třeba při testu dodržovat předepsaný postup. Většina mikroorganismů má jako předepsanou půdu k testování citlivosti Muellerův – Hintonové agar- 2, který zaručuje standartní difúzní schopnost agaru. Výška půdy v Petriho misce musí být jasně daná, přesně 4 mm, což se pro misku o průměru 9 mm docílí nalitím 25 ml média (Votava, 2005).

Průměr inhibiční zóny závisí na hustotě inokula vyšetřovaného kmene. Musí odpovídat stupni 0,5 až 1 McFarlandovy zákalové stupnice. Inokulum je na misku naočkováno tzv. masivně – to znamená přelitím a pak odsátím přebytku, nebo rozetřením pomocí vatového tamponu v několika směrech. Dojde k naočkování a na povrch agaru se pokladou disky – na běžnou misku o průměru 9 mm nejvíce šest disků. Průměr inhibiční zóny závisí kriticky na množství antimikrobiální látky.

Účinnost disků je potřeba průběžně kontrolovat. Misky, které jsou naočkované a mají položené disky, inkubujeme dnem vzhůru po předepsanou dobu, pro konkrétní mikroorganismus a při konkrétní teplotě (Votava, 2005). Účinné látky následně difundují do okolí disku (Podstatová, 2001). Po dokončení procesu inkubace se výsledek testu odečte a změří se průměry inhibičních zón (Votava, 2005). Intenzita efektu je odpovídající velikosti zóny, čím je látka účinnější, tím je potom zóna inhibice širší (Podstatová, 2001).

Existují i další difúzní metody, mezi které patří metoda komínková, u níž je hlavním principem položení skleněného komínku, který se zaplní zkoumaným extraktem na inokulovanou plotnu. Případný pozitivní vliv se projeví inhibiční zónou kolem komínku. Kapková metoda je další metodou, jejíž principem je nanesení kapky extraktu na inokulovaný povrch, kde se sleduje vytvoření inhibiční zóny. U jamkové metody je principem vytvoření jamky v agarovém mediu a jamka se následně zalije extraktem. Metoda žlábková se dělá tak, že do nalitého ztuhlého agaru se vyřeže podélně žlábek, který se naplní extraktem, který zkoumáme. Dají se použít i přímo části rostlin, nebo jejich orgánů, kdy se tyto části pokládají na inokulovaný povrch plotny (Mašková, 2008).

2.2.3.2 Kvantitativní metody

Kvantitativní metody spočívají ve stanovení koncentrace účinné látky, na kterou je testovaný mikroorganismus citlivý. Zjišťuje se tedy minimální koncentrace látky, která je schopna potlačit růst mikroorganismu. Stanovuje se také koncentrace látky, která dovede mikroorganismus usmrtit a ta je označena jako minimální baktericidní koncentrace (MBC) (Podstatová, 2001). Je nezbytné, aby byla stanovena minimální inhibiční koncentrace při vyšetření citlivosti kmenů u mikroorganismů pomalu rostoucích a u některých mikroorganismů vypěstovaných z klinicky závažných případů (Votava, 2005).

Diluční test v bujonu

Tímto testem se zjišťuje minimální inhibiční koncentrace dané látky, která se vyjádří přímou mírou citlivosti mikroorganismu. Test se provádí v polystyrenových mikrotitračních destičkách, které mají dvanáct sloupců a osm řad jamek. Pro jednu látku s antimikrobiálním účinkem se používá osm koncentrací dosažených dvojnásobným ředěním základního roztoku látky. Jamky se plní 100 μ l bujonu o příslušné koncentraci.

Koncentrace jsou vybrány tak, aby kolem čtvrté jamky byla hraniční koncentrace pro citlivost. Očkování se provádí silnými a zbroušenými jehlami o obsahu 1 – 2 μl suspenze a o koncentraci 10^8 bakterií v 1 ml podle základového standardu. Po ukončení doby inkubace se odečte růst proti kontrole. Minimální koncentrace je v první nezkalené jamce (Bednář, 1996).

Velmi podobnou metodou je metoda mikrodiluční, která se používá pro stanovení minimální koncentrace látek vůči mikroorganismům. Při této metodě se také používají sérologické mikrodestičky. Za minimální koncentraci u této metody je považována nejnižší koncentrace účinné látky, která je schopna potlačit růst mikroorganismu. Minimální koncentrace se udává v $\mu\text{g/ml}$, resp. v mg/l . Podobným způsobem se dá stanovit i MBC (Votava, 2005).

Diluční test v agaru

Petriho misky vyléváme agarovou půdou o standardním objemu. Jehlovým razidlem naočkujeme na jednu plotnu 30 až 40 kmenů najednou. Po ukončení doby inkubace se odečítá růst ve formě uzavřené kolonie. Plotna, u které již není pozorován růst, obsahuje minimální koncentraci dané látky. Agarová diluční metoda je metodou referenční. Tato metoda je přesnější a lépe se u ní stanovuje zástava růstu (Bednář, 1996).

E-test

Řadí se mezi jednodušší, ale nákladnější metody stanovení minimální koncentrace v látkách. Jedná se o proužek, který je nasycený antimikrobiální látkou ve stoupající koncentraci, jejíž hodnoty jsou vyznačeny na dlouhém kalibračním proužku. Proužek se klade na očkovanou misku, stejně jako na diskový difúzní test. Difúzí se vytvoří kontinuální gradient podél proužku a kolmo směrem od něj. Výsledná zóna inhibice má vejčitý tvar a tam kde její okraj protíná, okraj proužku se odečte na vytištěné škále hodnota minimální koncentrace. Tato metoda je však málo dostupná pro její vysokou cenu (Bednář, 1996; Votava, 2005).

2.3 Rostlinné silice

Silice (éterické oleje, esenciální oleje, aromatické oleje) jsou těkavé, intenzivně vonící směsi přírodních rostlinných látek olejové konzistence. Jsou lipofilní a ve vodě těžko rozpustné. Bývají zpravidla bezbarvé, zvláště v čerstvém stavu, při delším

uchovávání snadno oxidují, pryskyřičnatí a tmavnou. Silice hřebíčku je přírodně žlutohnědé barvy. Zeleně a modře jsou zbarveny silice obsahující azulen. Při normálním teplotním optimu jsou zpravidla tekuté (některé jako je silice anýzová, nebo růžová částečně tuhnou). Hustota u silic je menší než 1. Výjimku tvoří silice s vysokým obsahem aromatických látek a látek obsahujících síru (silice skořicová, hřebíčková, hořčičná). Silice se vyznačují optickou aktivitou a vysokým indexem lomu, který je daný přítomností nenasycených látek s dvojnými a trojnými vazbami (Hubík, 1989).

2.3.1 Složení silic

Silice jsou složeny z velkého počtu chemických sloučenin. Doposud bylo identifikováno přes 500 různých látek, přičemž jedna silice jich může obsahovat až 50. Jsou zde zastoupeny látky z různých biogenetických skupin, především látky s nižší molekulovou hmotností a bez glykosidní vazby na cukry monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny a fenylpropany. Jsou zde zastoupeny téměř všechny typy organických sloučenin uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, ketony, kyseliny, estery étery a jiné (Hubík, 1989).

- uhlovodíky – jsou zastoupeny téměř ve všech silicích (limonen, pinen, sabinen, ocimen, kadinen, zingiberen),
- alkoholy – v silicích jsou obsaženy jako acyklické, monocyklické a bicyklické monoterpeny a seskviterpeny (geraniol, citronelal, mentol, borneol),
- aldehydy – v silicích obsaženy jako acyklické, nebo cyklické složky (citrál, geraniol, benzaldehyd, skořicový aldehyd, vanilin),
- ketony – v silicích obsažené jako monocyklické, nebo bicyklické sloučeniny (karvon, menthon, piperiton, diosfenol, kafr, bujon, iron),
- fenoly – eugenol, tymol, karvakrol,
- fenolické étery – anethol, safrol, myristicin, apiol,
- oxidy – vyskytují se v eukalyptové silici (eukalyptol, askaridol),
- estery – octany, terpineolu, borneolu, geraniolu, isothiokyanatany, salicil methylnatý (Hubík, 1989).

Při stárnutí se u silic mění vlastnosti, začínají tmavnout a pryskyřičnatět. Dále dochází k autooxidaci, polymeraci a hydrolýze esterů. Tyto chemické změny podporuje především vyšší vlhkost, teplo, vzdušný kyslík a světlo. Nejrychleji se mění silice, které

mají vysoký obsah terpenických uhlovodíků (citrusové silice, silice konifer). U silic s vysokým obsahem esterů (bergamotová, levandulová) v procesu uchovávání přibývá obsah kyselin vlivem částečného zmýdelnění esterů. Silice obsahující aldehydy a fenoly se také často mění, pouze silice obsahující alkoholy zůstávají stejné (Hubík, 1989).

2.3.2 Výskyt silic

Výskyt silic je pro některé čeledi rostlin typický *Pinaceae*, *Zingiberaceae*, *Lauraceae*, *Rutaceae*, *Myrtaceae*, *Lamiaceae*. Pro určité čeledi jsou však rozdíly ve tvorbě a ukládání silic. Silice se vytváří v protoplazmě, případně rozpadem buněčných blan, nebo hydrolýzou glykosidů. Mohou prostupovat pletiva, nebo se koncentrovat v určitých orgánech (plodech mrkvovitých, kůra a listy skořicovníku, žlaznaté trichomy listů máty, oplodí nebo květy citroníků).

Význam silic pro rostliny není zcela ještě objasněn, zatím je o nich známo že slouží jako lákadla pro opylující hmyz, usměrňovače transkripce. V rostlině plní i funkci fytoicidů (látek s protipatogeními účinky). Obsah silic v rostlině kolísá v průběhu vývinu, ale také během 24 hodin, čím se dokazuje jejich aktivní zapojení do látkové výměny (Kalemba, 2003; Nedorostová, 2009).

2.3.3 Získávání silic

Silice se získávají z rostlinných surovin několika technologickými postupy:

- jako nejstarší způsob se používá extrakce tuků. V omezenějším rozsahu se používá dodnes pro zpracování květů, ve kterých je obsah silic velice nízký (jasmín),
- parfémový průmysl používá kontinuální extrakce lehce těkavými rozpouštědly (petroléter a benzen). V této extrakci dochází i k extrakci tuků, ne pouze jen silic,
- ve farmaceutickém průmyslu se silice získávají většinou destilací. Pro destilaci z vody se musí použít suchý materiál, ve kterém vroucí voda nezpůsobí žádné nežádoucí změny,
- silice, které nejdou bez rozkladu destilovat, se získávají lisováním. Citrusové silice lze získat také nabodáváním plodů jehlami (Kalemba, 2003; Nedorostová, 2009).

2.3.4 Testování antimikrobiálního účinku silic

Pro toto testování se nejčastěji používají metody, které jsou speciálně vyvinuté pro testování antibiotik. Roztok zkoušené látky je přímo v kontaktu s mikroorganismem v tekuté, agarové nebo živné půdě. Pokusy lze rozdělit:

- agarové difúzní metody (použití papírových disků, jamek),
- diluční metody (v agarových, tekutých živných půdách).

Provedení těchto metod komplikují některé specifické vlastnosti silic jako je především jejich nedostatečná rozpustnost ve vodě a těkavost. Silice mají hydrofobní charakter a vysokou viskozitu. Je potřeba tedy do živných půd přidat rozpouštědlo (PEG, Tween, DMSO, etanol), která vyřeší problém rozpustnosti. Rozpouštědlo může nepříznivě ovlivnit růstové vlastnosti mikroorganismů (Kalemba, 2003; Nedorostová, 2009).

Jako další možnosti pro testování účinků silic se využívá plynná fáze. Silice se umístí mimo živnou půdu. Do přímého kontaktu s mikroorganismem se dostávají pouze její páry. Tento způsob testování experimentálně prokázal výraznější účinek silic (především u hub) (Bergkvist, 2007).

2.3.4.1 Vliv silic na mikroorganismy

Nejčastěji testovanými mikroorganismy jsou *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* (Rakotonirainy, 2005).

Mechanismu účinku silic na mikroorganismy je zcela komplexní. Terpenoidy působí na membránové enzymy a blokují respirační cyklus. Další součásti silic mohou působit na ostatní biochemické buněčné děje – inhibice syntézy DNA, RNA, proteinů a polysacharidů (Kalemba, 2003).

Stanovení optimální koncentrace silic pro dezinfekci je obtížné. Měří se citlivost mikroorganismů, při použití různých metod a silic z odlišných druhů rostlin. Jsou rozdíly v citlivosti u silic získaných z jednoho druhu rostlin, ale jiným způsobem nebo za jiných podmínek. Řada faktorů ovlivňuje chemické složení a tím i účinek silice (Kalemba, 2003).

Faktory ovlivňující účinky silic:

- klimatické a růstové podmínky v lokalitě, kde byla rostlina pořízena (teplota, složení půdy, apod.),
- použitá část rostliny a její vývojový stav v době sklizně,
- způsob destilace a uchovávání silice.

2.4 Charakteristika koliformních bakterií

Koliformní bakterie jsou gramnegativní tyčinky, netvořící spóry, které jsou schopny růstu na kultivačním médiu obsahujícím žlučové soli, nebo jiné povrchově aktivní látky, které mají podobné vlastnosti. Tyto bakterie mají schopnost fermentovat laktózu při teplotě 35 °C nebo 37 °C se současnou produkcí kyselin, plynů, aldehydů během 24 – 48 hodin. Jsou to aerobní, nebo fakultativně anaerobní bakterie. Mezi koliformní organismy patří *Escherichia ssp.*, *Citrobacter ssp.*, *Enterobacter ssp.*, *Klebsiella ssp.*, *Serratia ssp.* (Říhová et Ambrožová, 2007).

Koliformní bakterie a fekální koliformní bakterie (termorezistentní), se tradičně používají jako indikátory fekálního znečištění. Zjistilo se, že mezi těmito skupinami se vykytuje velká řada druhů (hlavně mezi koliformními bakteriemi), které ovšem nemusí mít fekální původ a vlastnosti. Proto se jejich momentální fekální indikační hodnota zpochybňuje a současný trend směřuje k přímému stanovení *Escherichia coli*, která je podle směrnic Světové zdravotnické organizace považována, jako hlavní indikační zdroj fekálního znečištění (Baudišová, 1998).

2.4.1 Rod *Escherichia*

Rod *Escherichia* jsou gramnegativní, nesporotvorné tyčinky (Obr. č. 1), peritrichní nebo úplně bez bičíků, s respiračním a fermentačním metabolismem. Nejvýznamnější zástupce toho rodu je *Escherichia coli*. Jedná se o mikroorganismus, který se nachází ve spodní části trávicího traktu člověka a všech teplokrevných zvířat. Tato bakterie se vyskytuje i ve výkalech. Největší hrozba tohoto mikroorganismu spočívá především v hygienickém hledisku, proto se jí v potravinářství věnuje mimořádná pozornost (Šilhánková, 2002).

Escherichia coli fermentuje laktózu a vytváří z ní kyselinu mléčnou, octovou a plyny (CO₂ a H₂). Některé kmeny mohou zkvašovat laktózu pomaleji nebo ji nezkašují vůbec. V potravinářském a vodárenském průmyslu je tato bakterie

využívaná jako indikátorový mikroorganismus sanitace, zachování hygienických a technických požadavků při získávání, zpracování, skladování a distribuci. Především vysoký obsah těchto bakterií v potravinách způsobuje samotné kažení potravin (Görner et Valík, 2004).

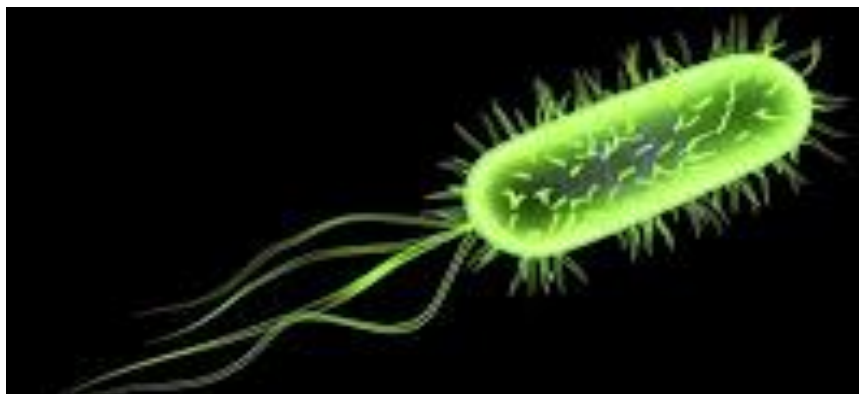
Některé kmeny rodu *Escherichia coli* získaly speciální mobilní geny působením bakteriofágů nebo plasmidů, které jim daly nové faktory virulence a díky tomu se stávají patogeními. Patogenní kmeny *Escherichia coli* rostou v rozmezí teplot 7 – 46 °C a při pH 4,4 – 9,0 a aw nad 0,96. Rychle se množí při koncentraci NaCl 2,5 %, nejsou však odolné vůči vysokým teplotám. Infekční dávka těchto bakterií je menší než 10² buněk/gram (Komprda, 2007).

Invazivní kmeny *Escherichia coli* způsobují onemocnění zejména u lidí se sníženou imunitou, u kojenců a starých lidí.

Mezi tyto kmeny řadíme:

- enteropatogenní *Escherichia coli* (EPEC),
- enterotoxigenní *Escherichia coli* (ETEC),
- enteroinvazivní *Escherichia coli* (EIEC),
- enterohemoragické *Escherichia coli* (EHEC) (Görner et Valík, 2004).

V dnešní době je nejvýznamnějším patogenním kmenem *Escherichia coli* O157:H7, která patří mezi EHEC. Hlavním rezervoárem tohoto kmene je skot. Nejzávažnější onemocnění způsobené patogenní *Escherichia coli* a jejími metabolity jsou hemoragická kolitida a hemolyticko uremický syndrom, jehož projevy jsou především u dětí do pěti let akutní selhání ledvin doprovázené dalšími projevy, jako je intravazální hemolýza, poruchy při srážení krve, nefropatie, hematurie a proteinurie (Komprda, 2007).



Obr. 1. *Escherichia coli* (www.ishbytes.blogspot.cz).

2.4.2 Rod *Citrobacter*

Jedná se o pohyblivé gramnegativní tyčinky, které na běžných mediích vytvářejí poměrně velké, vypouklé, hladké a mukózní kolonie. Někdy se vyjímečně vyskytují drsné formy. Jak už je podle názvu zřejmé, bakterie rodu *Citrobacter* využívají jako primární zdroj uhlíku citrát. Fermentují cukry, které jsou přeměňovány za tvorby plynu. Tyto bakterie produkují indol, lipázy a DNázy. Většina kmenů bakterií rodu *Citrobacter* produkuje také sirovodík. Optimální teplota pro růst tohoto druhu bakterií je 37 °C (Borenshtein et Schauer 2006; Sedláček 2007).

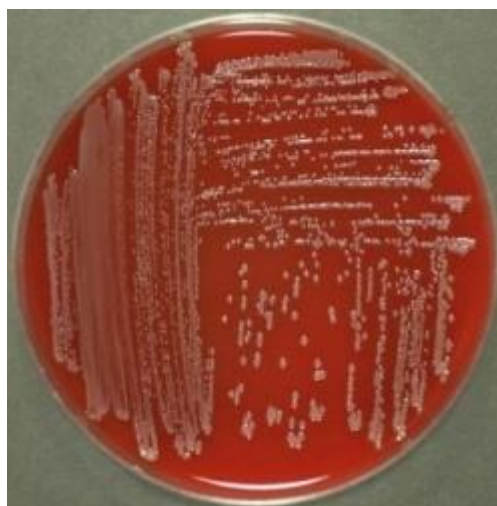
Mezi typické zástupce rodu *Citrobacter* patří:

- *Citrobacter freundii*,
- *Citrobacter koseri*,
- *Citrobacter yougae*.

Všechny tyto bakterie nalezneme ve střevním traktu u lidí a zvířat, dále v klinických vzorcích, ve vodě nebo v půdě (Muray et al., 2005).

Citrobaktery, jsou velmi často izolovány z lidských výkalů, ale i jiných klinických vzorků. Tyto bakterie mohou způsobovat střevní a močové infekce, bakteremie, meningitidy novorozenců, vzácně i mozkové abscesy (Gross et al., 1973; Badger et al., 1998; Meier et al., 1998). Potvrdilo se, že *Citrobacter freundii* (Obr. č. 2) je zodpovědná za epidemie způsobující gastroenteritidy, a to především v letních měsících, a u dětí předškolního věku. (Tschape et al., 1995)

Citrobaktery jsou primárně rezistentní k ampicinu (antibiotikum) a dle druhu bakterie také k cefalosporinům (antibiotikum) 1. a 2. generace. V posledních letech přibýlo kmenů produkujících širokospektré beta – laktamázy. Velmi citlivé jsou především na antibiotika: aminoglykosidy, chloramfenikol, cefalosporiny 3. a 4. generace, tetracykliny (Urbášková, 1996, Votava et al., 2003)



Obr. 2. Kolonie *Citrobacter freundii* na agaru (www.vetbook.org)

2.4.3 Rod *Enterobacter*

Bakterie rodu *Enterobacter* jsou gramnegativní tyčinky, většinou jsou pohyblivé pomocí peritrichálních bičků. Tvoří dvojí kolonie na pevných půdách. Mohou být vrásčité a mukoidní, což je dané tvorbou pouzdra. Tyto typy bakterií mají tendenci přisedat k povrchům a vytvářet biofilm. Druhý typ kolonií popisujeme jako hladký a suchý. Tento typ kolonií tvoří kmeny, které pouzdro nemají a při růstu v tekutém mediu mají tendenci sedimentovat (Demnerová et Pazlarová, 2009).

Z biochemického hlediska jsou tyto organismy poměrně aktivní. Jejich aktivita se podobá biochemické aktivitě bakterií *Klebsiella*. Samotný rozdíl mezi těmito dvěma rody však spočívá především v pohyblivosti enterobakterií. (Votava et al., 2003).

Typický zástupce rodu *Enterobacter* je *E. cloacae* (Obr. č. 3), který je hned po *Escherichia coli* druhým nejčastěji se vyskytující enterobakterií v lidské střevní mikroflóře. Mimo lidská střeva ji najdeme také ve vodě, půdě a na rostlinách. Dalším významným druhem je *E. aerogenes*.

Celkově jsou enterobaktery považovány za nebezpečné a nozokominální patogeny (Farmer III et al., 1980; Murray et al., 2005).

Rod *Enterobacter* způsobuje infekce močového a respiračního traktu, infekce ran u imunitně oslabených, nebo kategorizovaných pacientů. *Enterobacter* se prokázal i jako původce meningitid, nekrotizujících enterokolitid a sepsí u novorozenců. Tato nákaza je spojována s konzumací sušené mléčné kojenecké výživy (Demnerová et Pazlarová, 2009).

Co se týká citlivosti k antibiotikům, tak jsou enterobakterie přirozeně rezistentní k cefalosporinům 1 a 2 generace a až na některé výjimky také k ampicilinu (Urbášková, 1996). V poslední době, přibylo kmenů, které produkují širokospektré beta – laktamázy. Spousta kmenů je také rezistentní k chloramfenikolu a tetracyklinům. Mnohdy bývají citlivé i k cefalosporinům 4. generace, amikacinu, gentamycinu a kyselině nalidixové (Murray et al., 2005).



Obr. 3. *Enterobacter cloacae* na agaru (www.gastroscan.ru)

2.4.4 Rod *Klebsiella*

Bakterie rodu *Klebsiella* jsou gramnegativní tyčinky vyskytující se jako jedna, dvě nebo v krátkých řetězcích. Zpravidla jsou to nepohyblivé bakterie, které vytváří typicky mukózní kolonie, což je dáno přítomností silně hydratovaných pouzder na jejich povrchu. Kolonie jsou bílé a pigmentované. Optimální teplota pro růst těchto bakterií je 37 °C (Sedláček, 2007).

Z hlediska biochemie se řadí mezi aktivní bakterie. Pro svůj růst nevyžadují růstové faktory. Většinou fermentují cukry za produkce plynů. Za hlavní a důležitý znak v diagnostice *Klebsiella* je považována fermentace škrobu s produkcí plynu. Ureáza a acetonin jsou také pozitivní. Při klebsiellové pneumonii nedochází k deaminaci

fenylalaninu, nerozpouští ani želatinu, naopak *Klebsiella oxytoca* udává opačné výsledky (Murray et al., 2005).

Typickými zástupci pro rod *Klebsiella* jsou:

- *Klebsiella oxytoca*,
- *Klebsiella pneumoniae*, která má další tři poddruhy: *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* (nejčastější výskyt), *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae* ssp. *rhinoscleromatis*.

Bakterie *Klebsiella pneumoniae* (Obr. č. 4) byla poprvé izolována v roce 1883 a to patologem Carlem Friedlanderem. Bakterie má dobrou vlastnost adaptovat se na život ve vnějším prostředí. Z vnějšího, hlavně tedy nemocničního prostředí, se velmi snadno dostává do tělních dutin. Je považována za závažného nozokominálního patogena (Murray et al., 2005).

Klebsielly mají schopnost typicky exprimovat dva typy antigenů:

- somatický O – antigen,
- pouzdrný antigen – pouzdro vystupuje jako hlavní faktor virulence (Simoon – Smit et al., 1986).

Jako další významný faktor, který se uplatňuje především v rozvoji plicních infekcí, může být i typ O – antigen. Jsou typy, které mohou vázat plicní surfaktant, který umožňuje jejich úmyslnou fagocytózu. Jako další faktory virulence jsou fimbrie, které se podílejí na adhezi, nebo produkci bakteriocinů – klebocinů (Murray et al., 2005).

Klebsiella je běžným komenzálem ve střevě. Je to původce komunitně rozšířených močových infekcí, pneumonií a také sepsí. Jejich hlavním významem je to, že je také nozokominálním patogenem ohrožující imunitně oslabené pacienty. Mezi časté sepse, které způsobují bakterie rodu *Klebsiella* a jejich metabolity, se řadí sepse chirurgických ran, cystitidy a pyelonefritidy, rozvoj pneumonií, tvorba plicních abscesů, bakteremií (Murray et al., 2005).

Tyto bakterie jsou primárně rezistentní k ampicilinu. Jejich rezistence na tetracykliny a chloramfenikol se liší podle kmenů bakterií. Většina kmenů bakterií je citlivá ke gentamycinu a polymyxinům. Komunitní kmeny jsou dobře citlivé

k cefalosporinům. Nozokominální kmeny mívají čím dál častější detekci rezistence k cefalosporinům 1, 2 a 3 generace. Tato rezistence je daná produkcí plazmidově vázaných beta – laktamáz (tzv. plasmid často kóduje větší počet beta – laktamáz).

(Urbášková, 1996; Votava et al., 2003).



Obr. 4. *Klebsiella pneumoniae* pod elektronovým mikroskopem (www. Bioquell.com).

2.4.5 Rod *Serratia*

Bakterie rodu *Serratia* jsou gramnegativní rovné tyčinky (Obr. č. 5). Jedná se o rod pohyblivých tyčinek s metabolismem aerobním, nebo fakultativně anaerobním. Jsou to bakterie laktáso pozitivní a oxidásanegativní. Využívají cukry fermentativně a to často za produkce plynu. Jsou to bakterie, které se vyznačují vysokým stupněm rezistence, protože tento druh bakterií je schopný přenosu genetické informace. Vyznačují se primární rezistencí proti antibiotikům: penicilinům, cefalosporinům. Optimální teplota růstu je 37 °C. Vyskytují se především v půdě, vodě, rostlinných površích. Jedná se o oportunní patogenní mikroorganismus pro člověka. Bakterie mohou vyvolat záněty plic, záněty močových cest a rané infekce. Jsou citlivé na antibiotika aminoglykosidy, cefalosporiny 3. generace, imipenem, fluorochinolomy. Kolonie kultivovaných bakterií mohou mít červenou barvu (Barrow et al., 2004). Významné druhy bakterií rodu *Serratia*: *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia rubideae*.

Hlavním a významným druhem těchto bakterií je *Serratia marcescens*. Je to obvyklý oportunní patogen u hospitalizovaných pacientů v nemocnicích. Bakterie rodu *Serratia* (obvykle nepigmentují) způsobují onemocnění, jako jsou pneumonie, bakteremie a endokarditidy. Pouze asi 10 % z izolovaných vzorků dokáže produkovat červený pigment prodigiosin. Určité kmeny bakterie *Serratia marcescens* se vyznačují produkcí dalších enzymů, které způsobují rezistenci k ostatním skupinám antibiotik (Brooks et al., 2004).



Obr. 5. Kolonie rodu *Serratia* na agaru (www. digjamaica.com).

2.5 MIKROBIOLOGICKÁ KRITÉRIA

Evropské společenství má hlavní nařízení, které se týká mikrobiologických požadavků pro potraviny.

- Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny

2.5.1 Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny

Nařízení Komise (ES) č. 2073/3005 definuje:

- Všechny mikroorganismy, jako jsou bakterie, viry, kvasinky, plísně, řasy, cizopasní prvoci, mikroskopičtí cizopasní helminti a všechny jejich toxiny, metabolity.
- Všechny mikrobiologická kritéria jako jsou kritéria vymezující přijatelnost produktů, potravin nebo procesů na základě nepřítomnosti, přítomnosti počtů mikroorganismů, případně na základě jejich toxinů nebo metabolitů na jednotku hmotnosti, objemu, plochy, partie.

2.5.2 Požadavky na potravinářské provozovny

Dodržování hygieny v potravinářských podnicích je jedním z hlavních, zásadních požadavků v hygieně a bezpečnosti potravin. Hygiena v potravinářských podnicích se skládá z dodržování zákonem daných a stanovených norem. To se týká jak vzhledu, tak i vybavení provozoven, chování zaměstnanců, nakládání se surovinami, hotovými výrobky, týká se to ale bezprostředně i likvidací odpadků a škůdců (Janotová, 2006).

2.5.2.1 Obecné požadavky na potravinářské provozy dle nařízení č. 852/2004

- potravinářské podniky musí být udržovány v čistotě a v dobrém stavu,
- uspořádání, vnější úprava, konstrukce, poloha a velikost potravinářských provozů musí:
 - umožňovat odpovídající údržbu, čištění a dezinfekci, vylučovat nebo minimalizovat kontaminaci z ovzduší a poskytovat přiměřený pracovní prostor pro hygienické provedení všech postupů,
 - být takové, aby se zabránilo hromadění nečistot, styku s toxickými materiály, odlučování částic do potravin a vytváření kondenzátu nebo nežádoucích plísní na površích,
 - umožňovat uplatnění správné hygienické praxe, včetně ochrany před kontaminací,
 - podle potřeby poskytovat dostatečné kapacity s vhodnými teplotními podmínkami pro manipulaci s potravinami a pro jejich skladování při

vhodné teplotě s možností monitorovat a podle potřeby zaznamenávat jejich teplotu,

- k dispozici musí být dostatečný počet splachovacích záchodů připojených na účinný kanalizační systém. Záchody nesmí vést přímo do prostor, kde se manipuluje s potravinami,
- k dispozici musí být dostatečný počet umyvadel na mytí rukou, s přívodem teplé a studené vody, prostředky na mytí rukou a hygienické osušení.
- K dispozici musí být vhodné a dostatečné prostředky pro přirozené nebo nucené větrání,
- všechna sanitární zařízení musí být vybavena odpovídajícím přirozeným nebo nuceným větráním,
- potravinářské provozy musí mít náležité přirozené nebo umělé osvětlení,
- kanalizační zařízení musí odpovídat požadovanému účelu. Musí být navržena, kontrolována takovým způsobem, aby nevzniklo riziko kontaminace,
- podle potřeby musí být zajištěna vhodná příslušenství pro převlékání pracovníků,
- čisticí a dezinfekční prostředky nesmí být skladovány v oblastech, kde se manipuluje s potravinami.

2.5.2.2 Specifické požadavky na potravinářské provozy dle nařízení č. 852/2004

- uspořádání a vnější úprava prostor pro přípravu, ošetření nebo zpracování potravin musí mezi postupy a v rámci postupů, umožňovat uplatnění správné hygienické praxe, včetně ochrany před kontaminací. Zejména musí být:
 - podlahové povrchy udržovány v řádném stavu a musí být snadno čistitelné a tam, kde je to nezbytné, snadno dezinfikovatelné. To vyžaduje odolných, nenasákavých, omyvatelných a netoxických materiálů. Podle vhodnosti musí podlahy umožňovat vyhovující odvod vody z povrchu,
 - plochy stěn udržovány v řádném stavu a musí být snadno čistitelné, podle potřeby snadno dezinfikovatelné. To vyžaduje odolných, nenasákavých, omyvatelných a netoxických materiálů a hladký povrch až do výšky odpovídající pracovním operacím,

- stropy navrženy a opatřeny takovou konečnou úpravou, aby se zabránilo hromadění nečistot a omezila kondenzace, růst nežádoucích plísní, odlučování částecek,
- okna a jiné otvory konstruovány tak, aby se zabránilo hromadění nečistot. Okna a otvory, které jsou otevíratelné do vnějšího prostředí, musí být podle potřeby vybaveny sítěmi proti hmyzu, které lze při čištění snadno vyjmout,
- dveře snadno čistitelné a podle potřeby snadno dezinfikovatelné,
- povrchy v oblastech, kde se manipuluje s potravinami a zejména povrchy přicházející do styku s potravinami udržovány v řádném stavu,
- podle potřeby musí být k dispozici příslušenství pro čištění, dezinfekci, skladování pracovních nástrojů a pracovního vybavení. Tato příslušenství musí být konstruována z korozivzdorných materiálů a musí být snadno čistitelná, s přívodem teplé a studené vody,
- podle potřeby musí být odpovídajícím způsobem zajištěno mytí potravin. Každá výlevka musí mít odpovídající přívod teplé a studené pitné vody.

2.6 Boj proti mikroorganismům v potravinářských podnicích

2.6.1 Systém HACCP – Hazard analysis and critical control point

Systém HACCP je určitý preventivní postup, který na rozdíl od ostatních tradičních přístupů k zajištění zdravotní nezávadnosti potravin a pokrmů založených na kontrole produktů, spočívá ve vytvoření určitého systému kontroly procesů výroby, manipulací, surovinami, prostředím pro pracovníky a to tak, že se vzniku nebezpečí ohrožujícího lidské zdraví předchází (Voldřich et al., 2006).

Účelem tohoto systému HACCP je především ochrana zdraví konzumenta eliminací (jedná se tedy o snížení na tolerovanou úroveň) všech alimentárních nebezpečí v daném výrobku pomocí správné identifikace kritických ochranných bodů (Komprda, 2004).

Přijímání systému HACCP se zvyšuje a to především jako nejefektivnějšího způsobu ovládnutí alimentárních onemocnění a z toho plynoucích rozšíření aplikačních zásad, zdůraznila potřebu jasných pokynů na školení a veškeré požadavky, které jsou nezbytné pro účinné provádění HACCP (Mayers, 1994).

2.6.1.1 Zásady řízení systému HACCP dle nařízení č. 852/2004

Zásady HACCP spočívají:

- v identifikaci všech rizik, kterým musí být předcházeno, která musí být vyloučena nebo omezena na přijatelnou úroveň,
- v identifikaci kritických kontrolních bodů na stupni nebo stupních, na nichž je kontrola nezbytná pro předcházení riziku, pro jeho vyloučení nebo pro jeho omezení na přijatelnou úroveň,
- ve stanovení kritických limitů v kritických kontrolních bodech, které s ohledem na předcházení riziku, jeho vyloučení nebo na jeho omezení oddělují přijatelné a nepřijatelné hodnoty,
- ve stanovení a zavedení účinných monitorovacích postupů v kritických kontrolních bodech,
- ve stanovení opravných opatření, jestliže z monitorování vyplývá, že kritický kontrolní bod není pod kontrolou,
- ve stanovení pravidelně prováděných postupů k ověřování účinného fungování opatření,
- ve vytvoření dokumentů a záznamů.

2.6.1.2 Boj proti mikroorganismům

Veškeré potraviny, potravinářské suroviny, meziprodukty a polotovary jsou velmi vhodnou živnou půdou pro mikroorganismy. Všechny potraviny určené k lidské konzumaci nesmí být nositeli patogenních, toxigenních mikroorganismů, které by mohly ohrozit zdraví konzumenta (Šilhánková, 2008).

Kontrola mikroorganismů a mikrobiálního růstu je hlavním důležitým faktorem v lékařské, veterinární, dentální, průmyslové a farmaceutické oblasti, také v oblasti životního prostředí a výroby potravin. Pro kontrolu mikroorganismů vyskytujících se na površích, výrobcích nebo ve vzduchu se používají dezinfekční technologie. Jedná se o rozmanité aplikace, které hrají důležitou roli v našem každodenním životě, včetně zajištění pitné vody, výrobě a uchování produktů, sterilizaci zdravotnických prostředků, dekontaminaci ploch. Během posledních 200 let, jsme získali hodně znalostí o mikroorganismech, jejich rolích při kontaminaci a infekcích (McDonnell, 2007).

2.6.1.3 Mechanické a fyzikální prostředky

Za mechanické prostředky v boji proti mikroorganismům se považují odstraňování prachu, nečistot a zbytků organického materiálu ze strojů, ostatního zařízení, stěn a podlah (Damani, 2004). Velmi důležité je odstranění organických zbytků i ze špatně přístupných míst, kde by mohla vzniknout další ložiska a kde by se mikroorganismy pomnožovaly a následně odtud distribuovaly do dalších míst. Mechanické zákroky jsou v kombinaci s fyzikálními a chemickými prostředky. Mezi hlavní fyzikální prostředky v boji proti mikroorganismům patří filtrace, která slouží především k odstranění mikroorganismů ze vzduchu používaného pro klimatizaci. Ultrafialové záření je dalším účinným prostředkem, používaným především pro povrchovou sterilaci a sterilizaci prostorů, které jsou z hlediska mikroorganismů zvláště choulostivé. Zdroje ultrafialového záření musí být umístěny tak, aby v žádném případě neohrožovaly zrak pracovníků (Šilhánková, 2008). Zdrojem umělého ultrafialového záření, které se používá, je podtlaková křemičitá lampa. UV zářiče jsou doporučeny především jen pro laboratoře a aseptické prostory (Kursa et al., 1998). Mezi další fyzikální prostředky v boji proti mikroorganismům patří snížení vodní aktivity v potravinách sušením nebo odpařováním, dále také uchovávání potravin za nízkých teplot, použití detergentních prostředků při omývání horkou vodou. Při odstranění nečistot fyzikálním způsobem dochází především k oddělení, rozptýlení, emulgaci, rozpuštění a následné stabilizaci nečistot v roztoku, aby nedocházelo ke zpětnému znečištění povrchu (Richter, 2005).

2.6.1.4 Chemické prostředky

Chemické prostředky, které se používají v potravinářství v boji proti nežádoucím mikroorganismům, nesmí nijak nepříznivě ovlivňovat chuť potravin, výrobní prostředí, zdraví zaměstnanců, konzumentů a ani poškozovat výrobní zařízení. Jejich účinnost by měla mít co nejširší spektrum a nesmí klesat ani během uchovávání (McDonnell, 2007).

Anorganické látky

Co se týká anorganických sloučenin, vykazují baktericidní účinky silné kyseliny i silné zásady. Poškozují buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu buněk. Chemické prostředky se používají pro různé aplikace s ohledem na jejich schopnost inhibovat nebo inaktivovat mikroorganismy. Kyseliny se používají jako dezinfekční prostředky. Především silné kyseliny jako kyselina chlorovodíková, kyselina sírová,

snadno odštěpují ion H^+ . I přesto že mají silnou antimikrobiální aktivitu, stále mají omezené použití kvůli obavám z bezpečnosti a ohrožení kompatibility materiálu. Velmi podobně jsou na tom i silné zásady jako je hydroxid sodný, který odštěpuje ve vodném prostředí hydroxidový anion OH^- (McDonnell, 2007).

Často se používá hašené vápno ($Ca(OH)_2$) a to např. pro dezinfekci stěn. Zásaditou reakcí působí i uhličitan sodný (Na_2CO_3) nebo fosforečnan sodný (Na_3PO_4), dále také polyfosfáty k odstranění zbytků tuků a bílkovin (Šilhánková, 2008). Oxid siřičitý (SO_2) působí jako slabá kyselina, protože je jeho účinnost pouze v kyselém prostředí, kdy v nedisociované formě vstupuje do buněk mikroorganismů. Pro svou jedovatost se v potravinářství nesmí používat soli těžkých kovů (Pb, Hg). Tyto soli mají silný antimikrobiální účinek (Šilhánková, 2008). Silná oxidační činidla jsou nejrozšířenějšími dezinfekčními prostředky. Chlorové vápno, které se připravuje působením chloru na hašené vápno, slouží k dezinfekci podlah. (Block, 2001).

Organické látky

Klasickými baktericidními organickými prostředky jsou fenol a kresoly. Jsou účinné ve 2,5 – 5% roztoku.

Fenoly jsou účinné proti všem mikroorganismům. Jedná se o dost silný jed, který nesmí v žádném případě přijít do styku s potravinami a kůží (Postgate, 1982). Díky svému pronikavému zápachu jsou v potravinářském průmyslu nevhodné i pro dezinfekci prostor a podlah (Šilhánková, 2008).

Pentachlorfenolát je látka, která má vyšší baktericidní účinek než fenol, je dobře rozpustná a nezapáchá. Dráždí ovšem sliznice – přidává se někdy do mycích vod.

Jako pomocná látka při konzervaci potravin se v potravinářství používají antibiotika na bázi nisinu (E 234). V zahraničí se někdy používají antibiotika na bázi chlortetracyklinu a oxytetracyklinu (Šilhánková, 2008).

Mezi organické látky používané v boji proti mikroorganismům se používají:

- kyseliny s krátkými řetězci (kyselina octová, propionová),
- kyseliny s dlouhými řetězci (kyselina citronová, sorbová),
- deriváty kyselin, včetně fenolických derivátů (deriváty kyseliny benzoové a salicylové),
- jejich estery (McDonnell, 2007).

Jako nejvíce vhodná je kyselina benzoová a její deriváty. Tato kyselina je obvykle aplikovaná ve formě soli jako benzoan sodný, benzoan draselný. Uplatňuje se také kyselina p – hydroxybenzoová a její estery. (Šilhánková, 2008) Dalšími organickými látkami se širokým použitím jsou kyseliny octová, sorbová, citronová, mravenčí a propionová. Kyselina octová je použitelná přímo. Kyselina propionová vzhledem ke své korozivní povaze je nejčastěji využívána ve formě sodné nebo vápenaté soli (McDonnell, 2007).

2.6.1.5 Sanitace v potravinářském podniku

Veškeré požadavky a zásady péče o zdraví, vyplývají ze znalostí fyziologie a anatomie člověka. Hlavním úkolem sanitace je zajištění hygienických podmínek pro výrobu, přepravu, zpracování potravin a poživatin, ale i stanovit zásady zdravotně nezávadné manipulace s nimi (Sedlák et al., 1971).

Efektivní sanitace je především čištění a dezinfekce strojů, zařízení a dalších pomůcek používaných v potravinářských provozech. Sanitace je jedním z nejdůležitějších nástrojů při zabezpečení hygienické a zdravotní nezávadnosti potravin (Komprda, 2004).

Při provedení sanitačního opatření musí být dodržen následující sled operací (Steinhauser et al., 1995).

- odstranění hrubých nečistot z výrobních prostorů,
- zvlhčení povrchu ploch vodou,
- aplikace pracovního roztoku čistícího preparátu a jeho nezbytné působení na asanovaných plochách,
- oplach ploch vodou,
- aplikace pracovního roztoku dezinfekčního preparátu a jeho působení po dobu, která zajistí jeho spolehlivý dezinfekční účinek,
- závěrečný oplach asanovaných ploch.

Dezinfekce

Hlavním cílem dezinfekce je devitalizace choroboplodných mikroorganismů a maximální snížení množství ostatních, technologicky nežádoucích mikroorganismů, které jsou na povrchu ploch výrobních prostorů a zařízení (Steinhauser et al., 1995). Dezinfekčními činidly rozumíme většinou selektivně působící jedy, které jen zřídka

působí okamžitě. Výjimku tvoří kvarterní detergenty z toho pravidla, že účinkují ihned (Postgate, 1982).

Hlavní požadavky na dezinfekční prostředky

Dezinfekční prostředky musí splňovat mnoho požadavků, aby mohly být využity. Je potřebné, aby dezinfekční prostředek měl široké spektrum účinnosti na mikroorganismy. Musí působit i ve velmi nízké koncentraci a krátké době expozice. V žádném případě nesmí dezinfekční prostředek vyvolat změny v kvalitě materiálu. Prostředek musí být také netoxický a musí mít minimální dopad na životní prostředí. Vyžaduje se, aby byl bez nepříjemného zápachu, měl snadné dávkování a stabilitu. Dále se vyžaduje, aby nebyl náročný na skladování v provozu a měl také odpovídající a vhodné balení.

Zákon č. 120/2002 Sb. o podmínkách uvádění biocidních přípravků a účinných látek na trh ve znění pozdějších předpisů

Jako biocidní přípravek označujeme přípravek obsahující jednu nebo více účinných látek určených k ničení, odpuzování, zneškodňování, zabránění účinku nebo dosažení jiného regulačního účinku.

PODMÍNKY UVEDENÍ BIOCIDNÍHO PŘÍPRAVKU NA TRH

Dle zákona č. 120/2002 Sb. o podmínkách uvádění biocidních přípravků a účinných látek na trh ve znění pozdějších předpisů:

- účinnou látku mohou na trh uvést fyzické a právnické osoby oprávněny k podnikání a biocidní přípravek jen na základě povolení ministerstva,
- biocidní přípravky nesmí obsahovat jiné účinné látky než účinné látky uvedené v seznamu účinných látek a v seznamu účinných látek s nízkým rizikem a jiné základní látky než základní v seznamu základních látek,
- fyzické a právnické osoby, oprávněné k podnikání, které dovezou ze zahraničí přípravek určený k použití jako biocidní přípravek, jsou povinny předložit celnímu orgánu spolu s celním prohlášením i rozhodnutí ministerstva o povolení biocidního přípravku.

3. CÍL PRÁCE

Diplomová práce na téma: Testování antimikrobiální aktivity obalových materiálů s rostlinnými extrakty proti *Escherichia coli* a koliformním bakteriím, se zabývá problematikou údržnosti potravin a mikrobiální čistotou potravin zabalených v obalových materiálech obohacených přírodními extrakty.

Cílem diplomové práce bylo zjištění antimikrobiálních účinků obalových materiálů, které jsou obohaceny přírodními extrakty (silicemi) a pomáhají v údržnosti potravin a v boji proti *Escherichia coli* a koliformním bakteriím, jenž se mohou objevit u zabalených potravin.

Cílem práce bylo:

- zpracovat literární rešerši na zadané téma,
- zaměřit se na významné zástupce koliformních bakterií,
- charakterizovat tyto mikroorganismy a produkty jejich metabolismu, které mohou negativně ovlivnit lidské zdraví,
- charakterizovat opatření v boji proti nežádoucím mikroorganismům,
- otestovat vybrané materiály na modelových organismech, které byly následně použity na potravinách,
- zpracovat získaná data.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a metodika

4.1.1 Charakteristika materiálu

Pro testování antimikrobiálního působení fólií s nástřikem směsi rostlinných extraktů v poměru (1:2:1) na konkrétních zabalených potravinách byly vybrány následující potraviny:

- sýr eidamského typu 30 % tvs.
- salám Junior
- celer

Potraviny sýr eidamského typu 30 % tvs. a celer byly zakoupeny ve velkoobchodních potravinových řetězcích. Salám Junior byl zakoupen přímo od výrobce.

Ke zkoušce antimikrobiálních vlastností byl použit gram negativní, nesporotvorný mikroorganismus: *Escherichia coli* CCM 7929.

Pro růst mikroorganismů *Escherichia coli* bylo použito toto živné médium:

VRBL – složení média (g/l)

- Pepton..... 7
- Kvasniční extrakt..... 3
- Laktóza..... 10
- Soli žlučových kyselin.... 1,5
- Chlorid sodný 5
- Neutrální červeň..... 0,003
- Krystalová violet'..... 0,002
- Bakteriologický agar 12

Výrobce: výrobce: Biokar Diagnostic, Francie

Půda byla připravena dle návodu, který výrobce uvádí na obalu, tj., k 38,5 g dehydratované živné půdy se přidá 1000 ml destilované vody. Poté se přivede směs k varu a vaří se do úplného rozpuštění. Neautoklávuje se! Medium musí být použito do 4 hodin od jeho přípravy.

Pro stanovení CPM byly použity živné půdy:

PCA – složení media (g/l):

- Trypton..... 5
- Kvasniční extrakt..... 2,5
- Glukosa..... 1
- Bakteriologický aga... 12

Výrobce: Biokar Diagnostic, Francie

V 1000 ml destilované vody se rozmíchá 20,5 g dehydratované živné půdy. Směs se přivede k varu a nechá se vařit do rozpuštění. Poté je sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

PCA with skimmed milk (půda pro stanovení PCM na povrchu sýrů) – složení media (g/l)

- Enzymatický hydrolyzát kaseinu.... 5
- Kvasniční extrakt..... 2, 5
- Odstředěné sušené mléko..... 1
- Glukóza..... 1
- Agar..... 10,5

Výrobce: Biokar Diagnostic, Francie

V 1000 ml destilované vody se rozpustí 20 g dehydratované živné půdy. Nechá se 15 minut odstát a následně se vloží do studené vodní lázně. Šetrně se promícháváním nechá medium zcela rozpustit. Po rozpuštění média se vloží do autoklávu a sterilizuje se při teplotě 121 °C 15 minut.

Dále byly použity speciálně vyrobené potravinové fólie s nástřikem laku se směsí účinných látek. Celkem byly vyrobeny 4 druhy fólií s nástřikem laku o různých koncentracích účinných látek.

Koncentrace účinné látky ve fólii:

- 1 – kontrola 0 %
- 2 – 3,9 %
- 3 – 6,6
- 4 – 9,0 %

4.1.2 Příprava mikrobiálního inokula

24 hodinová kultura *Escherichia coli* vypěstovaná na Tryptózo – sójovém bujonu - TSB (Biokar Diagnostics, Francie) při 37 °C byla zcentrifugována (20 min. při 3000 rpm), promyta fyziologickým roztokem a opět zcentrifugována. Poté byl připraven roztok o denzitě 1 McF.

4.1.3 Postup experimentu

4.1.3.1 Sýr eidamského typu 30 % tvs.

Plátky sýra o hmotnosti cca 100g byly vloženy do čistých nepoužitých polystyrenových misek a následně inokulovány dávkou 0,2 ml suspenze *Escherichia coli* o denzitě 1 McF. Současně byly odebrány kontrolní stěry z řezné plochy sýra bez inokula. Poté byly misky pomocí tavné pistole zalepeny příslušnými foliemi s nástřikem účinné látky. Misky byly inkubovány při laboratorní (23 °C) a chladničkové (4 - 6 °C) teplotě. Kontrolní rozborů byly provedeny po 48, 168 a 216 hodinách.

4.1.3.2 Salám Junior

Plátky salámu Junior o síle 4 mm byly obdobným způsobem inokulovány dávkou 0,1 ml suspenze *E. coli* o denzitě 1 McF. Současně byly odebrány kontrolní stěry z řezné plochy salámu bez inokula. Zabalené vzorky v polystyrenových miskách byly skladovány v chladničkové teplotě (4 - 6 °C). Kontrolní stěry byly prováděny po 24, 72 a 144 hodinách.

4.1.3.3 Celer

Plátky celeru o síle asi 1 cm byly obdobným způsobem inokulovány dávkou 0,1 ml suspenze *E.coli* o denzitě 1 McF. Současně byly odebrány kontrolní stěry z řezné plochy celeru bez inokula. Zabalené vzorky v polystyrenových miskách byly skladovány v chladničkové teplotě (4 - 6 °C). Kontrolní stěry byly provedeny po 96 hodinách.

4.1.4 Mikrobiologická analýza

Mikrobiologická analýza byla prováděna v době založení experimentu a v čase kontroly metodou stěru z povrchu z plochy 5 x 5 cm. U kontrolních vzorků a vzorků bez inokula odebraných v čase založení experimentu byly stanovovány následující skupiny mikroorganismů. Celkový počet mikroorganismů (CPM) na PCA agaru resp. PCA with skimmed milk (Biokar Diagnostics, France) u vzorků sýra při 30 °C za 72 hodin, *Escherichia coli* na VRBL (Biokar Diagnostics, France) při 37 °C za 24 hodin. U vzorků inokulovaných *E. coli* byla stanovována pouze tato bakterie na výše uvedené půdě.

4.1.5 Označení vzorků

- Kontrola bez inokula: 1K, 2K, 3K, 4K
- *Escherichia coli*: 1E, 2E, 3E, 4E

U každé varianty pro příslušný odběr byla použita 2 až 3 opakování.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

Předmětem této práce bylo zjistit, vykazují-li testované fólie s nástřikem laku se směsí účinných látek o různých koncentracích antimikrobiální účinky proti vybranému mikroorganismu *Escherichia coli*.

5.1 Experiment 1 – balení sýru eidamského typu o 30 % tvs.

V tabulce č. 1 jsou uvedeny výsledky stěrů odebraných v čase založení pokusu ze čtyř použitých cihel sýru eidamu. Stěry byly odebrány z řezu plochy a z povrchu sýra.

Tab. 1. Počty mikroorganismů na KTJ/25 cm² sýra.

	vz. č.	identifikace	CPM	<i>E. coli</i>
1. cihla	1	řez	5,3 x 10 ²	0
	2	povrch	1,8 x 10 ⁴	0
	3	řez	1,6 x 10 ⁴	0
	4	povrch	2,7 x 10 ⁴	0
2. cihla	5	řez	2,3 x 10 ⁴	0
	6	povrch	4,2 x 10 ²	0
	7	řez	4,3 x 10 ⁴	0
	8	povrch	7,8 x 10 ⁴	0
3. cihla	9	řez	5,7 x 10 ²	0
	10	povrch	4,0 x 10 ⁴	0
	11	řez	2,5 x 10 ³	0
	12	povrch	přerostlé	0
4. cihla	13	řez	7,1 x 10 ⁴	0
	14	povrch	4,9 x 10 ²	0
	15	řez	1,1 x 10 ⁴	0
	16	povrch	1,6 x 10 ²	0

Pozn: CPM.....celkový počet mikroorganismů
E. coli..... *Escherichia coli*

Tab. 2 Průměrné počty mikroorganismů na KTJ/25 cm² sýra.

	1. cihla	2. cihla	3. cihla	4. cihla
řez	4,3 x 10 ³	1,7 x 10 ⁵	1,5 x 10 ³	2,0 x 10 ³
povrch	2,3 x 10 ⁴	3,9 x 10 ⁴	přerostlé	3,2 x 10 ²
celkový průměr	3,6 x 10 ³	1,0 x 10 ⁵	přerostlé	2,0 x 10 ⁴
SMODCH řez	8,3 x 10 ³	1,0 x 10 ⁴	9,5 x 10 ²	3,0 x 10 ⁴
SMODCH povrch	4,8 x 10 ³	3,9 x 10 ⁴		1,6 x 10 ²
Pozn:	SMODCH..... směrodatná odchylka			

Celkový počet mikroorganismů se pohyboval v rozmezí od 10² až 10⁴ KTJ/25 cm². Častěji bývá více mikroorganismů na povrchu, to může být zapříčiněno lepšími podmínkami pro růst mikroorganismů (okludovaná voda resp. tekutina uvolněná ze sýra, prostor pro růst pod obalem) jak uvádí Görner et Valík (2004). CPM v tomto případě neinformují o stavu mikrobiální kontaminace, ale do jejich počtu se promítají i přítomné bakterie mléčného kvašení.

V následujících tabulkách (č. 3a. a 3b.) jsou uvedeny výsledky ze stěrů odebraných po 48, 168 a 216 hodinách od založení pokusu. Sýry byly skladovány při teplotě 6 °C. CPM se pohybovaly v rozmezí řádově od několika desítek do 10⁴ KTJ/25 cm². *Escherichia coli* nebyla detekována u varianty 6 °C skladovací teploty.

Tab. 3a. Počty mikroorganismů na KTJ/25 cm² sýra při 6 °C.

vz.č.	identifikace	CPM 6 °C			<i>E. coli</i> 6 °C		
		I. 48 h	II. 168 h	III. 216 h	I. 48 h	II. 168 h	III. 216 h
1	1K	2,5 x 10 ⁴	8,5 x 10 ¹	6,2 x 10 ²	0	0	0
2	1K	2,4 x 10 ²	8,5 x 10 ¹	1,2 x 10 ⁴	0	0	0
	průměr	1,3 x 10⁴	8,5 x 10¹	6,5 x 10³	0	0	0
	SMODCH	1,2 x 10 ⁴	0	5,9 x 10 ³	0	0	0
3	2K	1,1 x 10 ³	2,4 x 10 ³	2,6 x 10 ³	0	0	0
4	2K	7,2 x 10 ²	4,5 x 10 ¹	8,6 x 10 ⁴	0	0	0
	průměr	8,8 x 10³	1,2 x 10³	5,6 x 10³	0	0	0
	SMODCH	1,2 x 10 ²	1,2 x 10 ³	3,0 x 10 ³	0	0	0
5	3K	2,3 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁴	2,8 x 10 ³	0	0	0
6	3K	4,1 x 10 ³	5,9 x 10 ³	6,4 x 10 ³	0	0	0
	průměr	1,3 x 10⁴	9,3 x 10³	4,6 x 10³	0	0	0
	SMODCH	9,2 x 10 ³	3,4 x 10 ²	1,8 x 10 ³	0	0	0
7	4K	1,9 x 10 ⁴	5,9 x 10 ³	4,5 x 10 ³	0	0	0
8	4K	1,2 x 10 ⁴	2,1 x 10 ³	2,6 x 10 ⁴	0	0	0
	průměr	1,6 x 10⁴	4,0 x 10³	1,5 x 10⁴	0	0	0
	SMODCH	3,5 x 10 ³	1,9 x 10 ³	1,1 x 10 ⁴	0	0	0

Pozn: CPM..... celkový počet mikroorganismů
 SMODCH..... směrodatná odchylka
 1K, 2K, 3K, 4K..... kontrola

V tabulce 3b. jsou uvedeny výsledky stěrů odebraných po 48, 168 a 216 hodinách od založení pokusu. Sýry byly skladovány při teplotě 23 °C. CPM se v tomto případě pohybovaly v rozmezí od desítek po 10⁴ KTJ/25 cm². *Escherichia coli* nebyla detekována ani v tomto případě skladování vzorků při 23 °C.

Tab. 3b Počty mikroorganismů na KTJ/25 cm² sýra při 23 °C.

vz.č.	identifikace	CPM 23 °C			<i>E. coli</i> 23 °C		
		I.	II.	III.	I.	II.	III.
		48 h	168 h	216 h	48 h	168 h	216 h
9	1K	6,6 x 10 ⁴	4,0 x 10 ⁴	přerostlé pl.	0	0	0
10	1K	2,5 x 10 ³	přerostlé pl.	4,6 x 10 ⁴	0	0	0
	průměr	3,4 x 10⁴	4,0 x 10⁴	4,6 x 10⁴	0	0	0
	SMODCH	3,2 x 10 ⁴			0	0	0
11	2K	4,6 x 10 ³	9,3 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁴	0	0	0
12	2K	6,0 x 10 ⁴	8,9 x 10 ⁴	0	0	0	0
	průměr	5,3 x 10³	9,1 x 10⁴	1,0 x 10⁴	0	0	0
	SMODCH	7,4 x 10 ²	2,2 x 10 ³	1,0 x 10 ⁴	0	0	0
13	3K	6,2 x 10 ³	přerostlé	přerostlé pl.	0	0	0
14	3K	1,2 x 10 ⁴	5,7 x 10 ⁵	1,0 x 10 ¹	0	0	0
	průměr	9,0 x 10³	5,7 x 10⁵	1,0 x 10¹	0	0	0
	SMODCH	2,7 x 10 ³			0	0	0
15	4K	4,7 x 10 ⁴	3,9 x 10 ²	5	0	0	0
16	4K	6,0 x 10 ⁴	přerostlé	0	0	0	0
	průměr	5,0 x 10⁴	3,9 x 10²	2,5	0	0	0
	SMODCH	2,6 x 10 ³		2,5	0	0	0

Pozn: Vysvětlení popisu tabulky viz. tab. 3a.

Při skladování vzorků sýra za laboratorní teploty byl zaznamenán rychlejší nárůst mikroorganismů. Při teplotě 6 °C se počty mikroorganismů v čase příliš nemění. Při skladovací teplotě 23 °C vykazuje nárůst laku účinné látky v obalech pozitivní vliv proti CPM a snižuje jeho počet.

Tabulka č. 4a. udává počty mikroorganismů v KTJ/25cm² z inokulovaných vzorků. Štěry byly provedeny ze vzorků inokulovaných mikroorganismem *Escherichia coli* a odebrány po 48, 168 a 216 hodinách od založení pokusu. Inokulované vzorky sýra byly skladovány při 6 °C. V 6°C se vliv koncentrace účinné látky na inhibici *Escherichia coli* jeví jako neprůkazný.

Na podobném principu byla provedena studie Herzallah et Holley (2015) kteří studovali antimikrobiální aktivitu obalových materiálů na plátcích hovězího masa v boji proti *Escherichia coli*. Obalové materiály byly vyrobeny z karboxymethylcelulósy. Vzorek hovězího masa inokulovali mikroorganismem *Escherichia coli* a zabalili do připravené fólie. Inokulované vzorky masa byly skladovány při 8 °C po dobu 18 dnů.

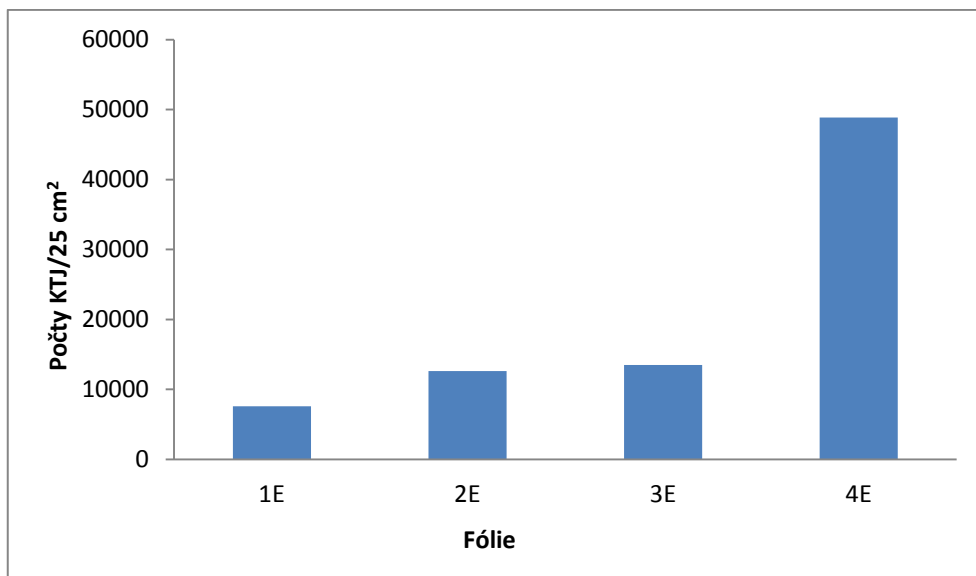
Stěry provedli po 5, 8, 12 a 18 dnech. Při každém stěru byl zjištěn pozitivní inhibiční účinek účinných látek obsažených v obalu na *Escherichia coli*.

Obr. 6 – 8 ukazují počty *Escherichia coli* ve stěrech z plochy 25 cm² sýra. U vzorků balených pod fólií s nástřikem laku s antibakteriálními účinky došlo v průběhu skladování ke snížení počtu *Escherichia coli* u všech variant oproti kontrole balení pod fólií bez nástřiku laku s antibakteriálními účinky.

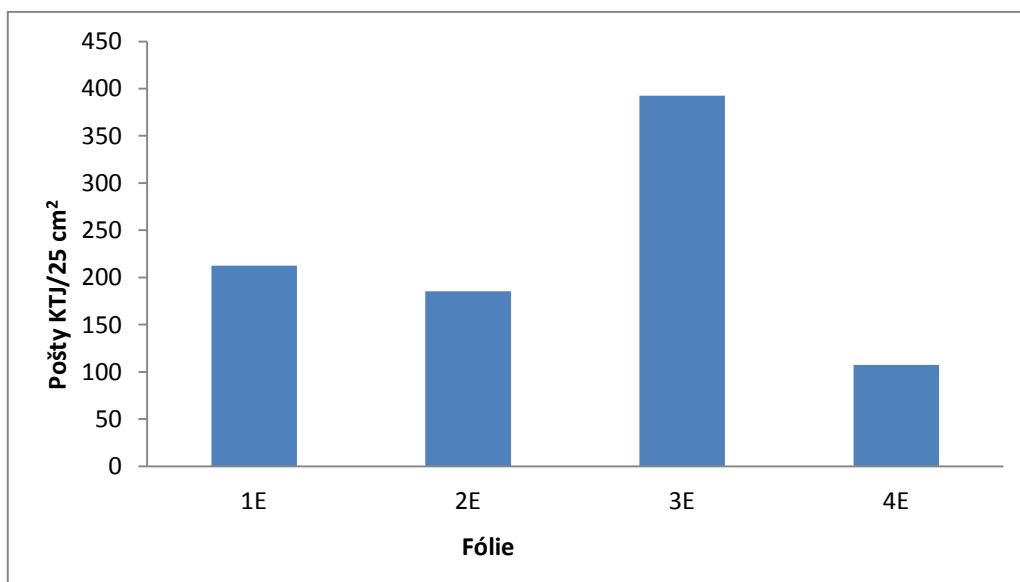
Tab. 4a. Počty mikroorganismů na KTJ/ 25cm² z inokulovaných vzorků skladovaných při 6 °C.

<i>E. coli</i> 6 °C				
vz.č.	identifikace	I. 48 h	II. 168 h	III. 216 h
17	1E	6,0 x 10 ³	3,7 x 10 ²	8,6 x 10 ³
18	1E	9,2 x 10 ³	5,0 x 10 ¹	0
	průměr	7,6 x 10³	2,1 x 10²	4,3 x 10³
	SMODCH	1,6 x 10 ³	1,6 x 10 ²	4,3 x 10 ³
19	2E	1,7 x 10 ⁴	2,7 x 10 ²	0
20	2E	2,3 x 10 ⁴	2,0 x 10 ¹	2,5 x 10 ²
	průměr	1,3 x 10⁴	1,8 x 10²	2,6 x 10³
	SMODCH	3,0 x 10 ³	1,3 x 10 ²	1,3 x 10 ²
21	3E	1,8 x 10 ⁴	4,2 x 10 ²	7,1 x 10 ²
22	3E	8,6 x 10 ³	3,7 x 10 ²	1,1 x 10 ²
	průměr	1,4 x 10⁴	3,92 x 10²	4,1 x 10²
	SMODCH	4,9 x 10 ³	2,2 x 10 ¹	3,0 x 10 ²
23	4E	3,8 x 10 ⁴	2,1 x 10 ²	0
24	4E	6,1 x 10 ⁴	1,0 x 10 ¹	0
	průměr	4,9 x 10⁴	1,1 x 10²	0
	SMODCH	2,0 x 10 ⁴	9,7 x 10 ¹	0

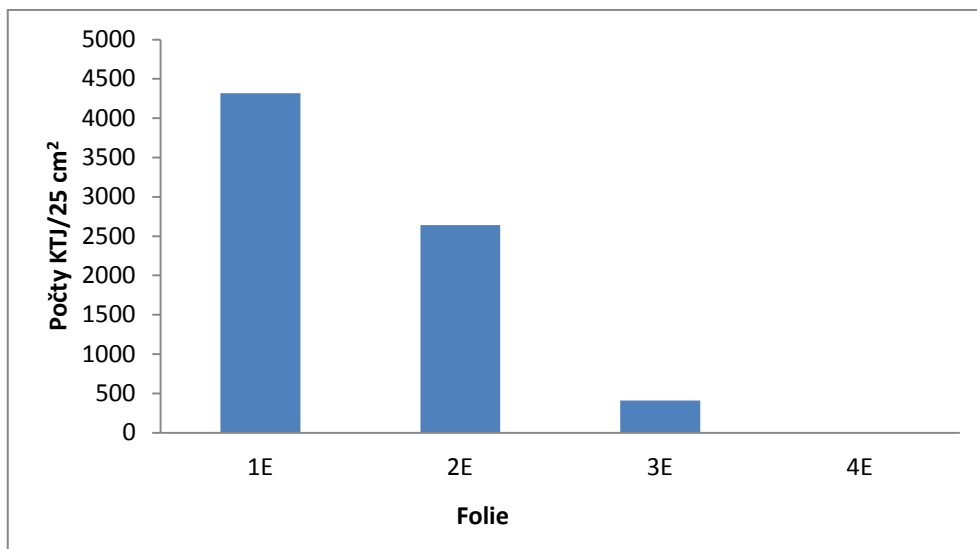
Pozn: SMODCH..... Směrodatná odchylka
1E, 2E, 3E, 4 E..... koncentrace účinné látky ve fólii



Obr 6. Počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² u vzorků sýra inokulovaných *Escherichia coli*, skladových při 6 °C po 48 hodinách.



Obr 7. Počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² u vzorků sýra inokulovaných *Escherichia coli*, skladových při 6 °C po 168 hodinách.



Obr 8. Počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² u vzorků sýra inokulovaných *Escherichia coli*, skladových při 6 °C po 216 hodin.

V tabulce 4b jsou uvedeny počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² stanovených na vzorcích inokulovaných *Escherichia coli* a uložených při 23 °C po dobu 48 hodin. Druhý a třetí stěr tj. po 168 a 216 hodinách u vzorků při 23 °C nebyl proveden, z důvodu toho že vzorky byly viditelně porostlé, páchly a byly zkažené.

Na podobném principu byla provedena studie na plátcích vepřové panenky. Studii provedli Hong et Lim et Song (2008). Studovali antimikrobiální aktivitu obalových materiálů s přídavkem extraktu z grapefruitových jaderek a zeleného čaje. Jako zkoumaný mikroorganismus jim posloužila *Escherichia coli*. Plátky vepřové panenky

o hmotnosti 10 g byly inokulovány *Escherichia coli* a zabaleny do fólií. Fólie byly v těsném kontaktu s masem. Takto připravené vzorky byly skladovány při 4 °C po dobu 10 dnů. Po 10 dnech byly provedeny kontrolní stěry ze vzorků, které prokázaly inhibiční účinky antimikrobiálních látek obsažených ve fólii proti *Escherichia coli*.

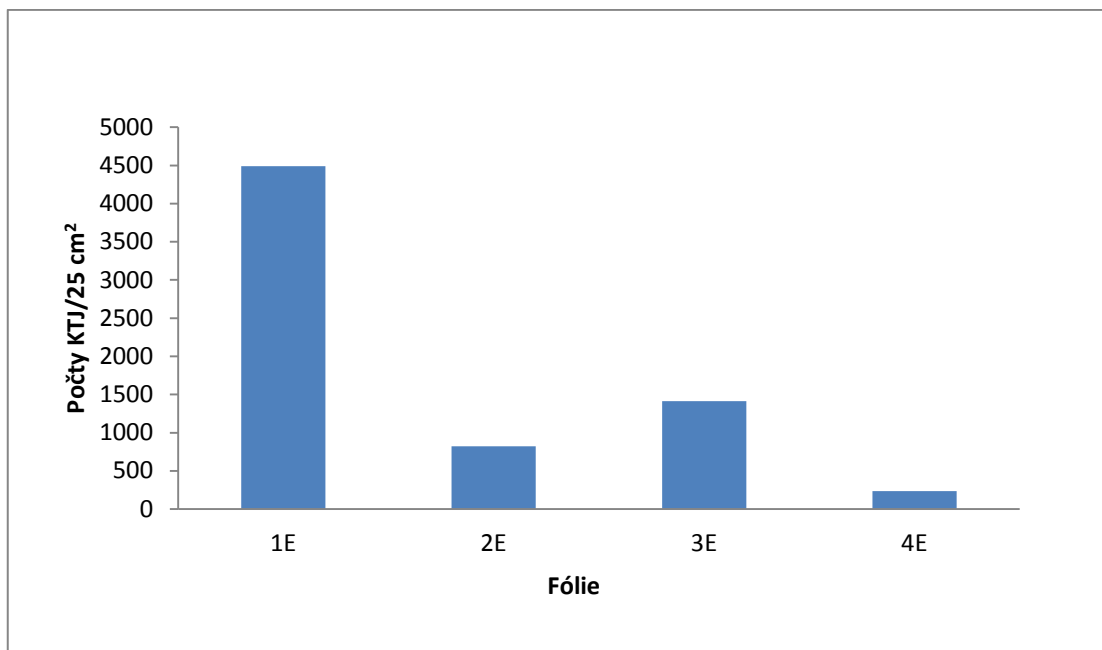
Obr. 9 ukazuje počty *Escherichia coli* z plochy vzorků sýrů inokulovaných *Escherichia coli* a zabalených pod fólií. Skladovací teplota vzorků sýra byla 23 °C. Z obrázku je zřetelně vidět, jaký vliv měla aplikace laku s účinnou látkou na inhibici růstu *Escherichia coli*.

Tab. 4b. Počty mikroorganismů na KTJ/ 25cm² z inokulovaných vzorků skladovaných při 23 °C.

<i>E. coli</i> 23 °C				
vz.č.	identifikace	I. 48 h	II. 168 h	III. 216 h
25	1E	8,1 x 10 ⁴	-	-
26	1E	9,0 x 10 ²	-	-
	průměr	4,5 x 10³	-	-
	SMODCH	3,6 x 10 ³	-	-
27	2E	1,3 x 10 ²	-	-
28	2E	1,5 x 10 ³	-	-
	průměr	8,2 x 10²	-	-
	SMODCH	7,0 x 10 ³	-	-
29	3E	2,3 x 10 ³	-	-
30	3E	3,5 x 10 ²	-	-
	průměr	1,4 x 10³	-	-
	SMODCH	1,1 x 10 ³	-	-
31	4E	2,7 x 10 ²	-	-
32	4E	2,1 x 10 ²	-	-
	průměr	2,4 x 10²	-	-
	SMODCH	3,0 x 10 ¹	-	-

Pozn: Vysvětlení popisu tabulky viz. tab. 4a.

Při skladovací teplotě 23 °C se v čase počty mikroorganismů příliš nemění. Při kontrole po 168 h jsou vzorky sensoricky nepřijatelné, páchnou a je na nich patrný nárůst inokulovaných mikroorganismů.



Obr 9. Počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² u vzorků sýra inokulovaných *Escherichia coli*, skladových při 23 °C po 48 hodin.

5.2 Experiment 2 – balení salámu Junior

Další testovanou potravinou, která sloužila pro experimentální balení, byl salám Junior. Testování antimikrobiální aktivity silic proti *Escherichia coli* probíhalo stejně jako při testování antimikrobiální aktivity silic na vzorcích sýra. V tabulce č. 5. jsou uvedeny výsledky stěrů odebraných po 24, 72 a 144 hodinách od založení pokusu. CPM se pohybovalo v rozmezí řádově od několika desítek do 10^4 KTJ/25 cm². V případě kontroly neinokulovaných vzorků nebyla *Escherichia coli* až na jedinou výjimku detekována.

Tab. 5. Počty mikroorganismů na KTJ/25 cm² salámu.

vz.č.	identifikace	CPM			<i>E. coli</i>		
		I. 24 h	II. 72 h	III. 144 h	I. 24 h	II. 72 h	III. 144 h
1	1K	$1,9 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$3,5 \times 10^4$	0	0	0
2	1K	$9,5 \times 10^1$	$5,7 \times 10^2$	$> 10^4$	0	0	0
	průměr	$1,4 \times 10^2$	$4,1 \times 10^2$	$> 10^4$	0	0	0
	SMODCH	$4,7 \times 10^1$	$1,6 \times 10^2$	$> 10^4$	0	0	0
3	2K	$1,1 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$> 10^4$	0	0	5
4	2K	$3,2 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$5,5 \times 10^3$	0	0	0
	průměr	$2,6 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$> 10^4$	0	0	2,5
	SMODCH	$1,1 \times 10^2$	$5,0 \times 10^1$	$> 10^4$	0	0	2,5
5	3K	$1,0 \times 10^2$	$6,1 \times 10^2$	$> 10^4$	0	0	0
6	3K	$4,5 \times 10^1$	$3,3 \times 10^2$	$> 10^4$	0	0	0
	průměr	$7,3 \times 10^1$	$4,7 \times 10^2$	$> 10^4$	0	0	0
	SMODCH	$2,7 \times 10^1$	$1,4 \times 10^2$	$> 10^4$	0	0	0
7	4K	$1,1 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$> 10^4$	0	0	0
8	4K	$5,5 \times 10^1$	$8,1 \times 10^2$	$6,8 \times 10^4$	0	0	0
	průměr	$8,3 \times 10^1$	$5,3 \times 10^2$	$6,8 \times 10^4$	0	0	0
	SMODCH	$2,7 \times 10^1$	$2,8 \times 10^2$	$> 10^4$	0	0	0

Pozn: CPM.....celkový počet mikroorganismů
 SMODCH.....směrodatná odchylka
 1K, 2K, 3K, 4K.....kontrola

Z výsledků je zřejmé, že v prvních 72 hodinách skladování počty mikroorganismů rychle narůstají a vliv koncentrace účinné látky je nejednoznačný.

Tabulka č. 6. uvádí počty mikroorganismů v KTJ/ 25cm² z inokulovaných vzorků salámu. Stěry byly provedeny ze vzorků salámu inokulovaných *Escherichia coli* a odebrány po 24, 72 a 144 hodinách od založení pokusu. Vliv koncentrace účinné látky obsažené v laku je na *Escherichia coli* inokulovanou na povrch salámu nejednoznačný.

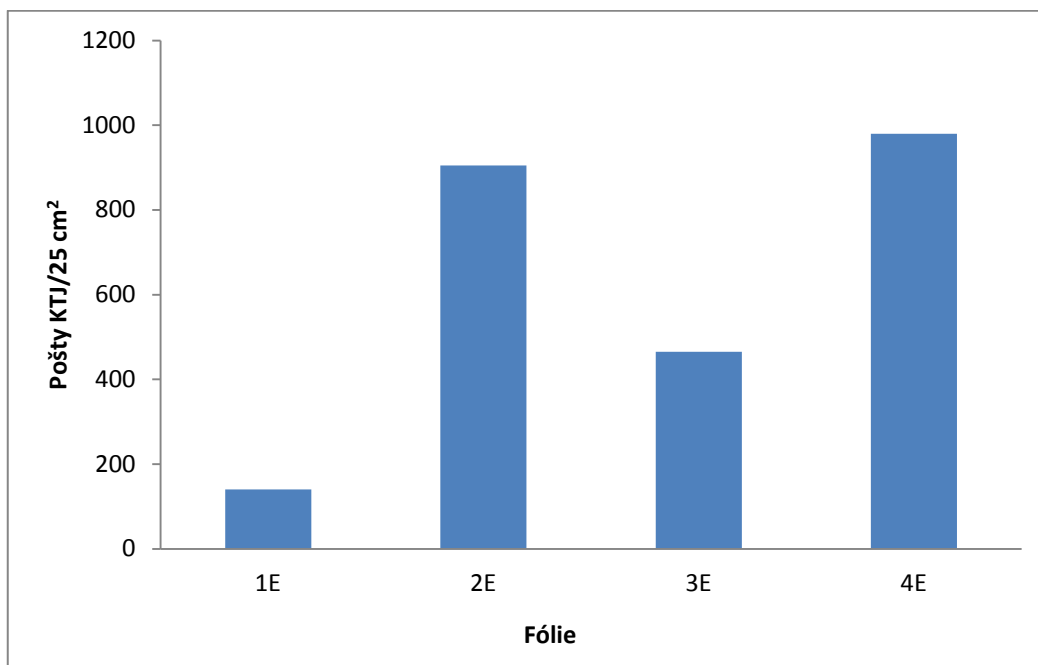
Na podobném principu byla provedena studie na mletém hovězím masu. Studii provedli Emiroğlu et Yemiş et Coşkun et Candoğan (2010). Byly vyrobeny jedlé potravinové fólie ze sójových bílkovin s přidavkem esenciálních olejů oregána a tymiánu o koncentraci účinné látky ve fóliích 1, 2, 3, 4 a 5 %. Vzorky mletého hovězího masa byly inokulovány *Escherichia coli* a zabaleny do fólie. Takto připravené vzorky byly skladovány při 4 °C po dobu 48 hodin. Při konečném stěru byla prokázána inhibiční účinnost antimikrobiálních látek obsažených ve fólii proti *Escherichia coli*. Jako kontrola sloužila fólie bez nástřiku antimikrobiálních látek.

Tab. 6. Počty mikroorganismů na KTJ/25cm² z inokulovaných vzorků salámu.

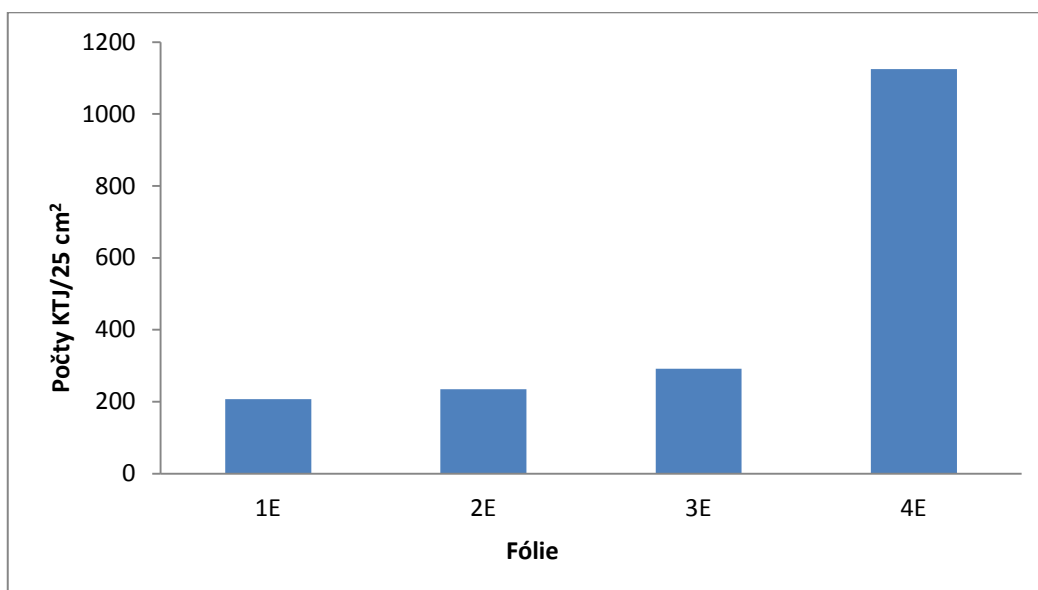
vz.č.	identifikace	<i>E. coli</i>		
		I. 24 h	II. 72 h	III. 144 h
9	1E	2,5 x 10 ²	3,6 x 10 ²	5,0 x 10 ¹
10	1E	0	5,5x10 ¹	2,3 x 10 ²
	průměr	1,2 x 10²	2,1 x 10²	1,4 x 10²
	SMODCH	1,2 x 10 ²	1,5 x 10 ²	9,0 x 10 ¹
11	2E	1,5 x 10 ²	2,1 x 10 ²	1,3 x 10 ²
12	2E	0	2,6 x 10 ²	1,7 x 10 ³
	průměr	7,5 x 10¹	2,4 x 10²	9,1 x 10²
	SMODCH	7,5 x 10 ¹	2,5 x 10 ¹	7,6 x 10 ²
13	3E	4,0 x 10 ²	3,8 x 10 ²	7,6 x 10 ²
14	3E	3,0 x 10 ³	1,5 x 10 ³	1,7 x 10 ²
	průměr	3,5 x 10²	9,3 x 10²	4,7 x 10²
	SMODCH	5,0 x 10 ¹	5,5 x 10 ²	2,9 x 10 ²
15	4E	4,0 x 10 ²	5,3 x 10 ²	1,6 x 10 ³
16	4E	7,5 x 10 ²	1,7 x 10 ³	3,6 x 10 ²
	průměr	5,8 x 10²	1,1 x 10³	9,8 x 10²
	SMODCH	1,6 x 10 ²	5,9 x 10 ²	6,2 x 10 ²

Pozn: SMODCH.....směrodatná odchylka
1E, 2E, 3E, 4E.....koncentrace účinné látky ve fólii

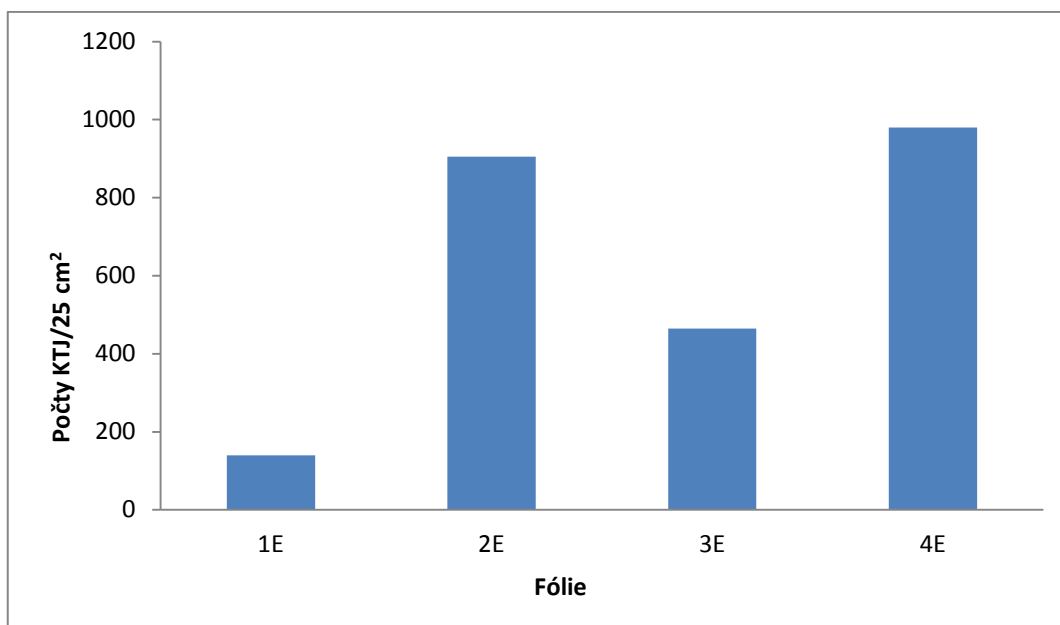
Obr. 10 – 12 prokazuje růst průměrných hodnot *Escherichia coli* na vzorku salámu Junior za použití různé koncentrace antimikrobiálních látek v obalu po 24, 72 a 144 hodinách. Bylo prokázáno, že v čase se počty bakterií příliš nemění.



Obr 10. Počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² u vzorků salámu inokulovaných *Escherichia coli* po 24 hodinách.



Obr 11. Počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² u vzorků salámu inokulovaných *Escherichia coli* po 72 hodinách.



Obr 12. Počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² u vzorků salámu inokulovaných *Escherichia coli* po 144 hodinách.

5.3 Experiment 3 – balení celeru

Poslední balenou potravinou jako vzorek, byl celer. Testování antimikrobiální aktivity silic proti *Escherichia coli* probíhalo stejně jako při testování antimikrobiální aktivity silic na vzorcích sýra a salámu Junior. V tabulce č. 7. jsou uvedeny výsledky stěrů odebraných po 96 hodinách od založení pokusu. CPM se pohybovalo v rozmezí řádově od několika desítek do 10^5 KTJ/25 cm². *Escherichia coli* byla detekována pouze na jediném vzorku celeru zabaleném pod fólii s 9,0 % obsahem účinné látky v laku.

Tab. 7. Počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² na celeru.

vz.č.	identifikace	CPM	<i>E. coli</i>
		96 h	96 h
1	1K	$1,6 \times 10^4$	0
2	1K	$1,7 \times 10^4$	0
	průměr	$1,6 \times 10^4$	0
	SMODCH	$4,8 \times 10^2$	0
3	2K	$9,2 \times 10^4$	0
4	2K	$6,6 \times 10^4$	0
	průměr	$7,9 \times 10^4$	0
	SMODCH	$1,3 \times 10^4$	0
5	3K	$1,1 \times 10^5$	0
6	3K	$1,3 \times 10^4$	0
	průměr	$6,1 \times 10^4$	0
	SMODCH	$4,8 \times 10^4$	0
7	4K	$2,3 \times 10^5$	0
8	4K	$3,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^2$
	průměr	$2,6 \times 10^5$	$3,0 \times 10^2$
	SMODCH	$3,9 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$

Pozn: CPM..... celkový počet mikroorganismů
 SMODCH.....směrodatná odchylka
 1K, 2K, 3K, 4K...kontrola

Při stěrech kontrolních vzorků nebyla *Escherichia coli* až na jedinou výjimku detekována. CPM bylo po 96 hodinách relativně vysoké. Viditelný nárůst plísní nebyl zaznamenán. Na vzorcích byly detekovány pouze kvasinky. Vliv koncentrace účinné látky je tedy nejednoznačný.

Tabulka č. 8. udává počty mikroorganismů v KTJ/25cm² z inokulovaných vzorků celeru. Stěry byly provedeny ze vzorků celeru inokulovaných *Escherichia coli*. Z výsledků vyplývá, že v porovnání s kontrolou aplikace fólie s lakem obsahujícím účinné antimikrobiální látky neměla na počty *Escherichia coli* inhibiční účinek. Relativně nízké počty u všech variant mohly být způsobeny nízkou skladovací teplotou (6 °C).

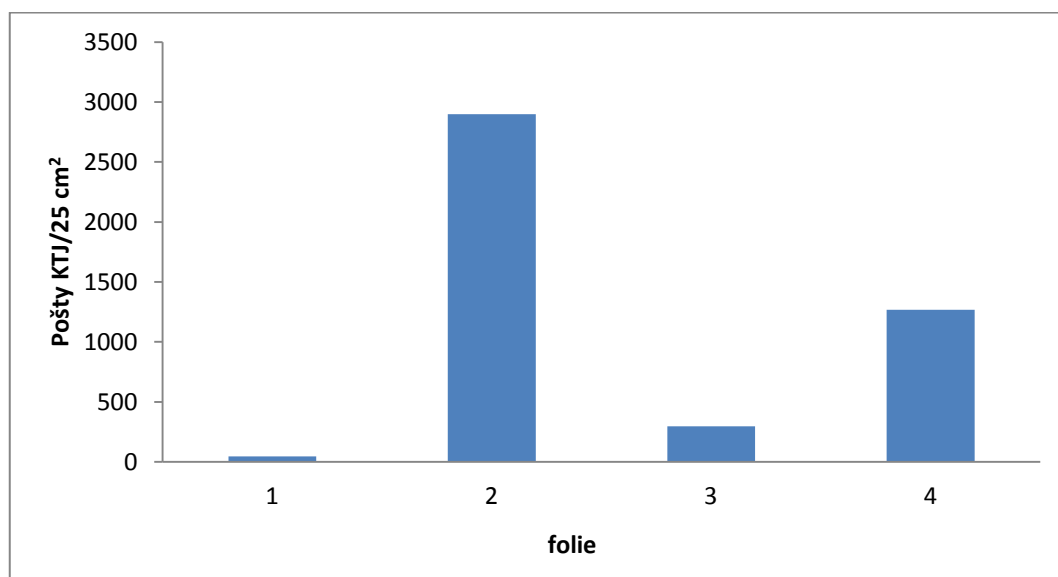
Obr. 13 uvádí růst průměrných hodnot *Escherichia coli* na vzorku celeru za použití různé koncentrace antimikrobiálních látek v obalu.

Tab. 8. Počty mikroorganismů na KTJ/25cm² z inokulovaných vzorků celeru.

<i>E. coli</i>		
vz.č.	identifikace	96 h
9	1E	0
10	1E	9,0 x 10 ¹
	průměr	4,5 x 10¹
	SMODCH	4,5 x 10 ¹
11	2E	5,8 x 10 ³
12	2E	3,5 x 10 ¹
	průměr	2,9 x 10³
	SMODCH	2,8 x 10 ³
13	3E	1,5 x 10 ²
14	3E	4,5 x 10 ²
	průměr	2,9 x 10²
	SMODCH	1,5 x 10 ²
15	4E	3,5 x 10 ¹
16	4E	2,5 x 10 ³
	průměr	1,3 x 10³
	SMODCH	1,2 x 10 ³

Pozn: SMODCH..... Směrodatná odchylka
1E, 2E, 3E, 4E...koncentrace účinné látky ve fólii

Na podobném principu byla provedena studie na plátcích salátové okurky. Studii provedl Alvarez et al. (2014). Studovali antimikrobiální aktivitu pektinových obalových materiálů s přídavkem oregánové silice. Jako zkoumaný mikroorganismus jim posloužila *Escherichia coli*. Plátky salátové okurky byly inokulovány *Escherichia coli* a zabaleny do připravených fólií. Takto připravené vzorky byly skladovány při 4 °C po dobu 15 dnů. Po 15 dnech byly provedeny kontrolní stěry ze vzorků, které prokázaly inhibiční účinky antimikrobiálních látek obsažených v obalech proti *Escherichia coli*. Jako kontrola sloužila fólie bez nástřiku antimikrobiálních látek.



Obr 13. Počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² u vzorků celeru inokulovaných *Escherichia coli* po 96 hodinách.

Porovnáme – li pouze použití fólií s aktivními látkami v laku pak lze říci, že vyšší koncentrace silic v tomto laku má silnější inhibiční účinek na *Escherichia coli*.

Tato studie se zabývala účinkem vybraných rostlinných extraktů, silic a jejich složek na růst a životaschopnost mikroorganismu, sloužící jako model nejběžnějšího, gramnegativního, infekčního agens (*Escherichia. coli*).

Při založení pokusu byly odebrány základní stěry pro zjištění CPM (pod tímto pojmem se rozumí všechny mezofilní aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy) a koliformních bakterií, především *Escherichia coli* na nekontaminovaných vzorcích

sýru Eidamu, salámu Junior a celeru. Stěry byly odebrány z povrchu, ale i řezu potravin. Celkový počet mikroorganismů v našem pokusu se pohyboval v rozmezí od 10^2 až 10^4 KTJ/25 cm². Více mikroorganismů se vyskytovalo na povrchu potravin, což může být zapříčiněno podle Görner et Valík (2004) hlavně lepšími podmínkami pro růst mikroorganismů. CPM u sýra nás v tomto případě neinformovala o stavu mikrobiální kontaminace, protože do jejího počtu se promítají i přítomné bakterie mléčného kvašení.

Vzorky sýrů byly skladovány při teplotě 6 °C a 23 °C a zabaleny do folií s nástřikem rostlinné silice. Nástřik účinné látky by měl zabránit růstu mikroorganismů. Při teplotě 6 °C se CPM u sýru moc nezměnilo, stěry byly prováděny po 48, 168 a 216 hodinách. CPM se stále pohybovalo v rozmezí od 10^2 až 10^4 KTJ/25 cm². K nárůstu CPM došlo při skladovací teplotě 23 °C, kde byly stěry odebrány po 48 hodinách. Po 168 a 216 hodinách byly vzorky viditelně zaplísňené. U těchto vzorků došlo k vysokému nárůstu CPM. U vzorku salámu Junior byly stěry pro stanovení CPM odebrány po 24, 72 a 144 hodinách. CPM u salámu Junior se pohybovaly v rozmezí od 10^1 do 10^4 KTJ/cm². U vzorků celeru byl u CPM sledován po 96 hodinách a pohybuje se v rozmezí od 10^4 do 10^5 KTJ/cm². Účinek aplikace potravinových fólií obohacených o rostlinné extrakty na CPM se jeví jako neprůkazný. Limitní hodnoty na *Escherichia coli* pro všechny potraviny musí být negativní (Nařízení komise (ES) č. 2073/2005). Potraviny použité v našem pokusu je splňovaly po celou dobu trvání pokusu. Hodnoty *Escherichia coli* u vzorků sýra Eidam, salámu Junior a celeru se pohybovaly 0 KTJ/ cm². Část vzorků byla inokulována roztokem kultury *Escherichia coli* o dávce 0,1 ml 1 McF, aby mohla být zjištěna inhibiční účinnost obalového materiálu obsahujícího rostlinné extrakty o různé koncentraci.

Na podobném principu byla provedena studie na rostlinné antimikrobiální látky v jedlých foliových obalech v boji proti *Escherichia coli*. Bylo zjištěno, že přidavek antimikrobiálních látek do jedlých foliových obalů, může působit jako bariéra pro mikroorganismy, které mohou kontaminovat povrch potravin. Ve studii byla zkoumána aktivita jedlých folií na jablečné bázi (jablečný pektin + jablečné pyrē + glycerin rostlinného původu), které obsahovaly rostlinné antimikrobiální látky vůči patogenům. Pokus byl proveden na chlazeném kuřeti. Cílem této studie bylo stanovit antimikrobiální účinnost součástí dobromyslové silice - karvakrolu a hlavní součástí skořicové silice – cinnamaldehydu v jedlých potazích na jablečné bázi proti kmenu

Escherichia coli na kuřecích prsou. Vykostěná kuřecí prsa bez kůže se na 40 sekund vložila do vařící vody, aby se zbavily přirozené mikroflóry. Povrch takto připravených vzorků masa byl vzápětí inokulován mikroorganismem *Escherichia coli*. Vzorky byly poté osušeny, zabaleny do připravených jedlých fólií obsahujících karvakrol či cinnamaldehyd v koncentracích 0,5 %, 1,5 % či 3 %. Jako kontrola byla použita fólie bez přídavku zmíněných látek. Jako kontrola posloužilo též maso, které před zabalením nebylo ponořeno do vařící vody a nebylo inokulováno patogeny. Zabalené maso bylo uchováváno buď při pokojové teplotě 23 °C či chladničkové teplotě 4 °C po dobu 72 hodin. Bylo zjištěno, že fólie obsahující antimikrobiální látky ve srovnání s fólií kontrolní bez těchto látek, jež na bakterie žádné účinky neměla, vykazovaly silnou inhibici proti *Escherichia coli* na kuřecích prsou po 72 hodinách uchovávání při ledničkové i pokojové teplotě. Při pokojové teplotě došlo k nejvyšší míře redukce počtu patogenů u fólie s 3% karvakrolem. Při chladničkové teplotě u masa zabaleného v této variantě fólie nebyly detekovány dokonce žádné přeživší buňky patogenů. Testy prokázaly, že jedlé fólie na jablečné bázi obsahující karvakrol či cinnamaldehyd by mohly být jedním z prostředků použitelných k inaktivaci nežádoucích bakterií na povrchu kuřecího (Ravishankar et al, 2009).

6. ZÁVĚR

V experimentální části diplomové práce byly provedeny testy fólií s aplikací laku obsahujícího různé koncentrace směsi účinných látek s antimikrobiálním účinkem. V experimentech byla jako pokusný mikroorganismus použita *Escherichia coli*. Potraviny sýr eidamského typu o 30 % tuku v sušině, salám Junior a celer byly baleny v polystyrenových miskách tak, aby balicí fólie nebyla přímo v kontaktu s potravinou.

Z výsledků vyplývá následující. V balených potravinách nebyla prokázána až na ojedinělé případy přítomnost *Escherichia coli*. Pozorovány byly dvě varianty experimentu a to potraviny bez úmyslné kontaminace *Escherichia coli* a potraviny inokulované *Escherichia coli*. V případě neinokulovaných potravin nedošlo v průběhu skladování ke zvýšení výskytu *Escherichia coli*. Zatím co u inokulovaných vzorků byly výsledky analýz v průběhu skladování různorodé. U vzorků sýrů došlo v průběhu skladování v 6 °C k výraznému snížení počtů *Escherichia coli*. Při skladování ve 23 °C byl po 48 hodinách zaznamenán oproti kontrole rovněž výrazný úbytek *Escherichia coli*. Antimikrobiální látky však celkově přítomné nedokázaly mikroorganismy zcela inhibovat a v následujícím období se sýry zcela viditelně kazily.

U vzorků salámu Junior a celeru byly výsledky nejednoznačné. Analýzy dále prokázaly větší účinnost vyšších koncentrací aktivních látek. Současně s počty *Escherichia coli* byly sledovány u neinokulovaných vzorků sýrů i celkové počty mikroorganismů (CPM) u tohoto mikrobiologického kritéria byly zaznamenány rozporuplné výsledky. U sýrů skladovaných při 6 °C nebyl prokázán inhibiční účinek. U variant s vyšší koncentrací účinných látek při skladování ve 23 °C byl inhibiční účinek prokázán. U ostatních potravin vliv koncentrační látky prokázán nebyl.

Při použití fólií s antimikrobiálním účinkem je výhoda, že fólie nepřichází do přímého kontaktu s potravinou a minimalizuje se tak její negativní sensorické ovlivnění. Inhibiční účinek je rovněž ovlivněn vnějšími podmínkami (teplota skladování), vlhkost, která aktivizuje antimikrobiální systém (uvolňování účinných látek z laku), velikost mikrobiální kontaminace. Experimenty přesto že nejsou zcela jednoznačné, naznačují cestu a směr dalšího testování a možnost použití fólií pro balení konkrétních potravin.

7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

ALVAREZ,M,V., ORTEGA - RAMIZER,L.A., GUTIERREZ-PACHEO,M.M.M BERNAL- MERCADO,A.T, RODRIGUEZ-GARCIA,I., GONZALER-AGUIAR,G.A., PONCE,A., MOREIRA MDEL,R., ROUSA,S.I., AYALA-ZAVALA,J.F. *Oregano essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents*. Front Microbiol. 2014 Dec 17;5:699. doi: 10.3389/fmicb.2014.00699.eCollection 2014. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4269197/> [cit. 2016-04-21].

AURELI, P., A. CONSTANTINI, S. ZOLEA. *Antimicrobial activity of some plant essential oils against Listeria monocytogenes*. [online]. J. Food Prot. 1992. 55 (5),s.344–348. Dostupný na: <http://md1.csa.com/partners/viewrecord.php?requester=gs&collection=ENV&recid=2972751&q=&uid=1222120&setcookie=yes> [cit. 2015-11-28].

BADGER J. L., STINS M. F. KIM K. S. (1999): *Citrobacter freundii invades and replicates in human brain microvascular endothelial cells*. Infect Immun. 67(8): 4208-4215

BARROW A KOL. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004.

BAUDIŠOVÁ, D. *Koliformní bakterie, fekální (termotolerantní) koliformní bakterie a Escherichia coli jako mikrobiologické ukazatele jakosti vody*. VITEI, 1998, č. 01.

BEDNÁŘ, M. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996, 558 s.

BERGKVIST, T. P.: *Antimicrobial activity of four volatile Essentials oils*. Master Thesis in Pharmacy, Göteborgs Universitet 2007

BESWICK, R., DUNN, J. *Plastics in packaging – Western Europe and North Ame-rica*. 1. vyd. Shawbury: Rapra Publishing, 2002. 156 s. ISBN 1-85957-329-0

BLOCK S. S., 2001: *Disinfection, sterilization, and preservation*, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins, ISBN: 0-683-30740-1, 1481 s

BORENSHTEIN D. SCHAUER D. B. (2006): *The Genus Citrobacter. Prokaryotes*. 6: 90-98.

BURDYCHOVÁ R., SLÁDKOVÁ P., 2007: *Mikrobiologická analýza potravin*, vyd. 1. Brno, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 208 s. ISBN 978-80-7375-116-4.

CEMPÍRKOVÁ, R., LUKÁŠOVÁ, J., HEJLOVÁ, Š.: *Mikrobiologie potravin*. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice 1997, ISBN 80-7040-254-7, 165 str.

CIOCAN, I. D., BĂRA, I. I. *Plant products as antimicrobial agents* [online]. Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară, 2007. s.151 - 156. Dostupný na http://www.bio.uaic.ro/publicatii/anale_biochimie/data/old/2007_VIII_f1/2007_Anale_GBM_VIII_f1_126.pdf [cit. 2016-01-28].

COWAN, M. M. *Plant Products as Antimicrobial Agents* [online]. Clinical Microbiology Reviews, Vol. 12, No. 4, s. 564–582, 1999. Dostupný na www.emersonhemp.com/Documents/AntimicrobialHemp.pdf [cit. 2015-11-27].

DAMANI N., 2004: Infection control: Basic concepts and practices. Cleaning, disinfection and sterilization, dostupné na <http://www.ific.narod.ru/Manual/Clean.htm> [cit. 2016-03-1].

DEL PERO MARTÍNEZ, M.A., MARTÍNEZ, A. J.. *Flavonoid distribution in Tradescantia* [online]. Biochemical Systematics and Ecology 1993, 21 (2), s. 255-265. Dostupný na <http://www.sciencedirect.com/>. [cit. 2015-08-11].

DEMNEROVÁ K., PAZLEROVÁ J. (2009): *Enterobacter sakazakii* alias *Cronobacter sakazakii* – Nová hrozba? Chem Listy 103: 641-646.

EMBUSCADO, E. *Edible films and coatings for food applications*. Ilust. vyd. NY:Springer, 2009. 403 s. ISBN 978-0-387-92823-4

FARMER J. J. III, ASBURY M. A. HICKMANN F. W., BRENNER D. J. (1980): *Enterobacter sakazakii*: a new species of 'Enterobacteriaceae' isolated from clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol.* 30:569-584.

FERNANDEZ, M. A., M. D. GARCIA, M. T. SAENZ. *Antibacterial activity of the phenolic acids fraction of Scrophularia frutescens and Scrophularia sambucifolia*. [online]. *J. Ethnopharmacol.* 1996. 53 (1), s.11–14. Dostupný na <http://www.sciencedirect.com> [cit. 2015-06-18].

GELLERSTEDT, G., EK, M. *Paper chemistry and technology*. Ilust. Vyd. Berlin: Walter de Gruyter, 2009. 400 s. ISBN 978-3-11-021343-0

GÖRNER, F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin : princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.

GROSS R. J., ROWE B., EASTON J. A. (1973): *Neonatal Citrobacter meningitis*. *Arch Dis Child.* 48:455-458.

HANLON, F. *Handbook of package engineering*. 1. vyd. NY: McGraw-Hill, 1971. 698 s. ISBN 70-124138

HERZALLAH,S., HOLLEY,R. (2015), *Use of a nanoparticulate carboxymethyl cellulose film containing sinigrin as an antimicrobial precursor to kill Escherichia coli O157:H7 on fresh beef*. *Letters in Applied Microbiology*, 61: 139–145. doi: 10.1111/lam.12443 dostupné na: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/lam.12443/full>> [cit. 2016-04-08].

HONG,Y.H., LIM,G.O., SONG,K.B. *Physical Properties of Gelidium corneum–Gelatin Blend Films Containing Grapefruit Seed Extract or Green Tea Extract and Its Application in the Packaging of Pork Loins*. J Food Sci. 2009 Jan-Feb;74(1):C6-C10. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00987.x. dostupné na:

< <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3841.2008.00987.x/full>>

[cit. 2016-04-09].

HUBÍK, J.; DUŠEK, J.; SPILKOVÁ, J.; ŠÍCHA, J.: *Obecná farmakognosie. II. Sekundární látky*. U v Praze, SPN, Praha 1989

JANOTOVÁ L., 2006: *Požadavky na hygienu ve stravovacích službách*. Dostupné na <<http://www.jidelny.cz/show.asp?id=503>> [cit. 2016-04-08].

KALEMBA, D.; KUNICKA, A.: *Antibacterial and antifungal properties of essential oils*. Current Medicinal Chemistry, 10, 2003, 813 829.

KOKOŠKA et al *Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity* [online]. (2002) Journal of Ethnopharmacology, 82 (1), s. 51-53. Dostupný na <http://www.sciencedirect.com> [cit. 2015-09-08].

KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007. 148 s. ISBN 978-80-7157-757-7.

KOMPRDA T., 2004: *Obecná hygiena potravin*, vyd. 1., Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 146 s., ISBN 80-7157-757-X.

KUMAR, V. P. et al. *Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants* [online]. Journal of Ethnopharmacology 2006, 107 (2), s. 182-188. Dostupný na <http://www.scopus.com> [cit. 2015-10-08].

KURSA J., JELÍNEK F., VÍTOVEC J., RAJMON R., 1998: *Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 1. Vyd., České Budějovice, 200 s.

KYZLINK, V. *Základy konzervace potravin*. SNTL Praha, 1980. 516 s.

LIU, J. et al. *Flavanes from Dracaena cambodiana* [online]. Zeitschrift fur Naturforschung 2008, 63 (12), s. 1407-1410. Dostupný na <http://www.scopus.com> [cit. 2016-03-28].

MAKKAR, H. P. S. et al. *Plant Secondary Metabolites in some Medicinal Plants of Mongolia Used for Enhancing Animal Health and Production* [online]. Tropicultura, 2009, 27, 3, 159-167. Dostupný na <http://tropicultura.org/text/v27n3/159.pdf> [cit. 2016-03-28].

MAREČEK F., 1997. *Zahradnický slovník naučný, 3. Díl (CH-M). Ústav zemědělských a potravinářských informací*, Praha. ISBN 80-85120-62-3, 559s.

MAŠKOVÁ, H. *Koření - sortiment, účinné látky, antimikrobiální aktivita*. Diplomová práce. MZLU v Brně, 2008

McDONNELL G. E., 2007 – *Antisepsis, disinfection and sterilization: types, action, and resistance*, ISBN: 1555813925, edition 1, 361 s., ASM Press.

MEIER A., CHUSID M. J. STY J. R. (1998): *Neonatal citrobacter meningitis: neurosonographic observations*. J Ultrasound Med. 17(6): 399-401.

MURRAY P. R.; ROSENTHAL K. S., PFALLER M. A., 2005: *Medical Microbiology*, 5th edition. [s. l.] : Elsevier.

NAIDU, A.S. *Natural food antimicrobial systems*. 1. vyd. Florida: CRC Press, 2000. 818 s. ISBN 0-8493-2047-X.

NAŘÍZENÍ EVROPSKÉ KOMISE A PARLAMENTU 852/2004 o hygieně potravin

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny

NCUBE, N.S. et al *Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends* [online]. African Journal of Biotechnology 2008 Vol. 7 (12), s. 1797-1806. Dostupný na www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58804/47130 [cit. 2015-09-08].

NEDOROSTOVÁ, L.; KLOUCEK, P.; KOKOSKA, L.; STOLCOVÁ, M.; PULKRÁBEK, J.: *Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria*. Food Control, 20, 2009, 157–160.

NOVAK, J. *Arbutin - a risk substance in herbs?* [online]. Zeitschrift Für Arznei- & Gewürzpflanzen 2010, Vol. 15, No. 4, s. 170–173. Dostupný na <http://apps.isiknowledge.com.proxy.mzk.cz> [cit. 2015-09-09].

PAINE, F., HEATHER, Y. *A handbook of food packaging*. 2. vyd. NY: Springer, 1992. 497 s. ISBN 0216932106

PODSTATOVÁ, H. *Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena*. 1. vyd. Olomouc: EPAVA, 2001. 283 s. ISBN: 80-86297-07-1

POSTGATE J., 1982: *Mikroby a my*, 1. vyd., Praha, Panorama, 280 s. 605-22-825.

RAKOTONIARINY, M. S.; LAVÉDRINE, B.: *Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas*. International Biodeterioration & Biodegradation, 55, 2005, 141-147.

RAVISHANKAR S., et., al.: *Edible apple film wraps containing plant antimicrobials inactivate foodborne pathogens on meat and poultry products*. Journal of Food Science, 74, 2009, č. 8, s. M440-M445. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01320.x

RICHTER M., 2005: *Obecné principy sanitace*, *Náš chov*, 65,8,3-5.

ŘÍHOVÁ AMBRÓŽOVÁ, J. *Bakterie koliformní*. From Encyklopedie hydrobiologie: výkladový slovník (online). Praha: VŠCHT Praha, 2007. [cit. 2015-10-28].

SAJAD, T. et al *Antibacterial and Anti-inflammatory Potential Bergenia ligulata*. [online]. Am. J. Biomed. Sci. 2010, 2(4), s. 313-321. Dostupný na http://www.nwpii.com/ajbms/papers/AJBMS_2010_4_02.pdf [cit. 2015-10-17].

SEDLÁČEK, T. *Taxonomie prokaryot*. Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80 – 210 – 4207 – 9.

SEDLÁK J., PETR B., HAVRÁNEK J., 1971: *Mikrobiologie, epidemiologie a hygiena*. vyd. 5. Praha, AVICENUM, Zdravotnické nakladatelství n. p., 264 s. 08-009-71.

SHILOVA, I. V. et al *Antioxidant properties of Bergenia crassifolia extract*. [online]. Pharmaceutical Chemistry Journal 2006, Vol. 40, No. 11, s. 39–42. Dostupný na <http://www.springerlink.com/content/3335w53r5251k614/> [cit. 2016-01-28].

SIMOON-SMIT A. M., VERWEIJ-VAN VUGHT A.M.J.J.M., KANIS I. Y., MACLAREN D. M. (1985): *Biochemical and serological investigations on clinical isolates of Klebsiella*. J Hyg. 95: 265-276.

STEINHAUSER L. et al., 1995: *Hygiena a technologie masa*. 1. vyd. Brno, Vydavatelství potravinářské literatury LAST. 664 s. ISBN 80-900260-4-4.

ŠILHÁNKOVÁ L., 2008: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, vyd. 3., opravené a doplněné. Praha, ACADEMIA, 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1.

ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: Academia, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

ŠTEPEK, J., a kol. *Polymery v obalové technice*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1981. 532 s. ISBN 678-621-798-1

TSCHAPE H., PRAGER R., STRECKEL W., FRUTH A., TIETZE E., BOHME G. (1995): *Verotoxinogenic Citrobacter freundii associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: green butter as the infectious source*. *Epidemiol Infect.* 114: 441-450.

URBÁŠKOVÁ P. (1996): *Vybrané metody*. IPVZ, Praha. 32 p.

VAN MINH, C. et al. *Unusual 22S-spirostane steroids from Dracaena cambodiana* [online]. *Natural Product Communications* 2009, 4 (9), s. 1197-1200. Dostupný na <http://www.scopus.com> [cit. 2016-01-28].

VELÍŠEK, J. *Chemie potravin* 3. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3

VICKIE, A., CHRISTIAN, E. *Essentials of foodscience*. 1. vyd. NY: Springer, 2008. 543s. ISBN 978-0-387-69939-4

VOLDŘICH M., JECHOVÁ M., A KOL.: *Bezpečnost pokrmů v gastronomii, malé a střední provozovny*, v roce 2006 vydalo České a slovenské odborné nakladatelství, Praha

VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. vyd. Brno: Neptun, 2005. 351 s. ISBN 80-86850-00-5

TATSUZAWA, F. et al. *Triacylated Anthocyanidin 3-Arabinosylglucoside-7,3'-Diglucosides Isolated from the Bluish Flowers of Tradescantia Virginiana Cultivars and Their Distribution in the Tradescantieae* [online]. *HETEROCYCLES*, 81 (10), 2010. Dostupný na <http://ir.iwate-u.ac.jp/dspace/bitstream/10140/3898/1/heterocycles-v81i10p2257-2267.pdf> [cit. 2016-01-28].

YAO, Q. et al. *A new chitin-binding lectin from rhizome of Setcreasea purpurea with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities* [online]. *Process Biochemistry* 2010, 45 (9), s. 1477-1485. Dostupný na <http://www.scopus.com>. [cit. 2016-03-08].

XU, M. et al. *Steroid saponins from fresh stems of Dracaena angustifolia* [online]. 58 Journal of Natural Products (2010), 73 (9), s. 1524-1528. Dostupný na <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np100351p> [cit. 2015-07-18].

ZEHRA, K.E., GOKCE, P.Y., BETUL, K.C., KEZBAN, C. *Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties*. 2010. Dostupné na:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174010001488> [cit. 2016-04-18]

Zákon č. 120/2002 Sb. o podmínkách uvádění biocidních přípravků a účinných látek na trh ve znění pozdějších předpisů.

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1. *Escherichia coli* (www.ishbytes.blogspot.cz)
- Obr. 2. Kolonie *Citrobacter freundii* na agaru (www.vetbook.org)
- Obr. 3. *Enterobacter cloacae* na agaru (www.gastroscan.ru)
- Obr. 4. *Klebsiella pneumoniae* pod elektronovým mikroskopem (www.Bioquell.com)
- Obr. 5. Kolonie rodu *Serratia* na agaru (www.digjamaica.com)
- Obr. 6. Počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² u vzorků sýra inokulovaných *Escherichia coli*, skladových při 6 °C po 48 hodin.
- Obr. 7. Počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² u vzorků sýra inokulovaných *Escherichia coli*, skladových při 6 °C po 168 hodin.
- Obr. 8. Počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² u vzorků sýra inokulovaných *Escherichia coli*, skladových při 6 °C po 216 hodin.
- Obr. 9. Počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² u vzorků sýra inokulovaných *Escherichia coli*, skladových při 23 °C po 48 hodin.
- Obr. 10. Počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² u vzorků salámu inokulovaných *Escherichia coli* po 24 hodinách.
- Obr. 11. Počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² u vzorků salámu inokulovaných *Escherichia coli* po 72 hodinách.
- Obr. 12. Počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² u vzorků salámu inokulovaných *Escherichia coli* po 144 hodinách.
- 13. Počty mikroorganismů v KTJ/25 cm² u vzorků celeru inokulovaných *Escherichia coli* po 96 hodinách.

9. SEZNAM TABULEK

- Tab. 1. Počty mikroorganismů na KTJ/25 cm² sýra.
- Tab. 2 Průměrné počty mikroorganismů na KTJ/25 cm² sýra.
- Tab. 3a. Počty mikroorganismů na KTJ/25 cm² sýra při 6 °C
- Tab. 3b Počty mikroorganismů na KTJ/25 cm² sýra při 23 °C.
- Tab. 4a. Počty mikroorganismů na KTJ/ 25cm² z inokulovaných vzorků skladovaných při 6 °C.
- Tab. 4b. Počty mikroorganismů na KTJ/ 25cm² z inokulovaných vzorků skladovaných při 23 °C.
- Tab. 5. Počty mikroorganismů na KTJ/25 cm² salámu.
- Tab. 6. Počty mikroorganismů na KTJ/ 25cm² z inokulovaných vzorků salámu.
- Tab. 7. Počty mikroorganismů na KTJ/25 cm² na celeru.
- Tab. 8. Počty mikroorganismů na KTJ/ 25cm² z inokulovaných vzorků celeru.