

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chemie**



**Antimikrobiální aktivita rostlinných látek  
a možnosti jejich využití ke konzervaci potravin**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Martina Janáková**

**Vedoucí práce: Ing. Jan Táborský, Ph.D.**

© 2014 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Antimikrobiální aktivita rostlinných látek a možnosti jejich využití ke konzervaci potravin" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11. 4. 2014

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto formou poděkovala panu Ing. Janu Táborskému, Ph.D. za odborné vedení, rady a věcné připomínky při zpracování diplomové práce. Velký dík patří i paní Ing. Adéle Fraňkové za cenné rady, podporu a vedení při zpracování experimentální části této diplomové práce a také děkuji doc. Ing. Pavlu Kloučkovi, Ph.D. za umožnění experimentu. Závěrem děkuji celé mé rodině nejen za podporu během studia.

# Antimikrobiální aktivita rostlinných látek a možnosti jejich využití ke konzervaci potravin

## Souhrn

V posledních desetiletích stoupla obliba minimálně zpracovaných produktů, u kterých se používají pouze minimální konzervační metody, a proto se může vyskytnout problém se zdravotní nezávadností. Mezi tyto produkty patří i čerstvý špenát, který byl v minulosti spojován s několika epidemiemi onemocnění způsobenými zejména bakterií *Escherichia coli*.

Plynná fáze silice rostlin rodu *Monarda* a *Satureja* má prokazatelné antimikrobiální účinky *in vitro*. Lze předpokládat, že tuto vlastnost silic je možné využít ke snížení výskytu patogenních mikroorganismů na špenátu a jiných minimálně zpracovaných produktech a zajistit tak zdravotní nezávadnost pro spotřebitele. Cílem diplomové práce bylo stanovit efektivní způsob ošetření špenátu silicemi rodu *Monarda* a *Satureja*.

Byla testována antimikrobiální aktivita silice saturejky horské (*Satureja hortensis* L.) a zavinutky prostřední (*Monarda media* Willd.). Vzorky zavinutky byly odebírány na experimentálním pozemku ČZU v Praze. Silice byla získána parní destilací po usušení rostlin. Silice saturejky byla k dispozici na katedře rostlinné výroby. Nejvyšší testovaná koncentrace silice saturejky byla 128  $\mu\text{l/l}$ , minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla stanovena na 8  $\mu\text{l/l}$ . Následně byla zkoumána silice zavinutky, která inhibovala množství *E. coli* při použití o polovinu nižší koncentrace silice (4  $\mu\text{l/l}$ ) v porovnání se saturejkou a dosahovala výborných účinků i na snížení celkového počtu mikroorganismů (CPM) obzvláště za podtlaku.

Výsledky byly vyhodnocovány bezprostředně a po čtyřech dnech skladování v chladicím boxu. Silice saturejky při MIC inhibovala množství *E. coli* o 1,48 log KTJ/g a průměrné snížení oproti kontrolním vzorkům bylo až o 2 řády. Na množství CPM měla vliv především koncentrace 128  $\mu\text{l/l}$  za podtlaku, při které došlo ke snížení o téměř o 3 řády. Silice zavinutky při stejné koncentraci, jako u saturejky, 8  $\mu\text{l/l}$  měla výraznější vliv na množství CPM a to zejména v podtlaku, kde byl pokles CPM o 4 řády a při koncentraci 4  $\mu\text{l/l}$  o 2 řády. Silice zavinutky v MIC měla stejnou úroveň inhibice počtu *E. coli* a to o 1,48 log KTJ/g.

Obě testované silice prokázaly výbornou antimikrobiální účinnost v porovnání s kontrolními neošetřenými vzorky a díky svým prokázaným účinkům by se jednou mohly používat jako přírodní konzervační látky.

**Klíčová slova:** silice; *Monarda*; *Satureja*; antimikrobiální aktivita; konzervace potravin; minimálně zpracované potraviny

# Antimicrobial activity of plant substances and the possibilities of their use for food preservation

## Summary

Essential oils of some *Monarda* and *Satureja* plant species in the gas phase have proved distinctive antimicrobial effects *in vitro*. It can be supposed, that this property of these essential oils can be used for the number reduction of patogen microorganisms on spinach and other minimally processed foods and to insure the safety of these foods in this way. The main goal of my diploma work was to determine an effective way of spinach treatment with *Monarda* and *Satureja* essential oils.

Antimicrobial activity of the essential oils from two plant species (*Satureja hortensis* L. and *Monarda media* Willd.) on *Escherichia coli* was tested. The samples of plants were collected on two experimental fields of the Czech University of Life Sciences in Prague and the essential oils were isolated from dried plant material by steam distillation. The highest concentration tested of *Satureja* essential oil was 128  $\mu\text{l/l}$ , the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined as 8  $\mu\text{l/l}$ . The MIC value of *Monarda* essential oil was determined as 4  $\mu\text{l/l}$  and excellent results for the reduction of total number of microorganisms (TNM) under reduced pressure were reached at the same time.

The results of antimicrobial activity were measured immediately after the treatment of spinach and after four days of storage in a cooling box. *Satureja* essential oils inhibited 1,48 log CFU/g (colony forming units) of *E. coli* at the minimum inhibitory concentration and the average reduction of microoganims against cotrol samples was approx. for two orders. The TNM value was influenced first of all at 128  $\mu\text{l/l}$  concentration under reduced pressure (the TNM reduction approx. for three orders against control samples). *Monarda* essential oils at the concentration 8  $\mu\text{l/l}$  was more effective than *Satureja* on the TNM value, especially at reduced pressure (the TNM reduction for four orders at 8  $\mu\text{l/l}$  and for two orders at 4  $\mu\text{l/l}$ ).

Both types of essential oils tested demonstrated excellent antimicrobial activity in comparison with untreated control samples and thanks to their proved antimicrobial effects could be used as natural food preservatives of plant origin.

**Keywords:** essential oils; *Monarda*; *Satureja*; antimicrobial activity; food preservation; minimally processed food

## Obsah:

1.	Úvod.....	- 1 -
2.	Vědecká hypotéza a cíle práce.....	- 2 -
3.	Přehled literatury.....	- 3 -
3.1	Silice.....	- 3 -
3.1.1	Složení silic, jejich vlastnosti a současné využití .....	- 3 -
3.1.2	Významné druhy bylin a koření obsahující silice s antimikrobiálními vlastnostmi .....	- 7 -
3.2	Antimikrobiální aktivita silic .....	- 9 -
3.2.1	Mechanismus účinku silic.....	- 9 -
3.2.2	Testování antimikrobiální aktivity silic <i>in vitro</i> .....	- 12 -
3.2.3	Pokusy na potravinách .....	- 14 -
3.3	Charakteristika zkoumaných druhů rostlin a jejich antimikrobiální aktivita .....	- 17 -
3.3.1	Saturejka zahradní ( <i>Satureja hortensis</i> L.) .....	- 17 -
3.3.2	Zavinutka prostřední ( <i>Monarda media</i> Willd.).....	- 18 -
3.4	Minimálně zpracované potraviny (ready-to-eat) .....	- 20 -
3.5	<i>Escherichia coli</i> .....	- 25 -
4.	Materiál a metody .....	- 28 -
4.1	Rostlinný materiál .....	- 28 -
4.1.1	<i>Monarda media</i> .....	- 28 -
4.1.2	<i>Satureja hortensis</i> .....	- 29 -
4.2	Destilace silice <i>Monarda media</i> .....	- 29 -
4.3	Analýza silice <i>Monarda media</i> plynovou chromatografií .....	- 30 -
4.4	Metodika testování antimikrobiální aktivity .....	- 30 -
4.4.1	Desková kultivační metoda.....	- 31 -
5.	Výsledky .....	- 33 -
5.1	Analýza chemického složení silice <i>Monarda media</i> .....	- 33 -
5.2	Výsledky antimikrobiální aktivity silic .....	- 34 -
5.2.1	Antimikrobiální aktivita silice saturejky.....	- 34 -
5.2.2	Antimikrobiální aktivita silice zavinutky .....	- 38 -
6.	Diskuze .....	- 40 -
7.	Závěr .....	- 44 -
8.	Seznam literatury .....	- 45 -
9.	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	- 52 -
10.	Přílohy.....	- 54 -
10.1	Technický náčrt destilačního přístroje.....	- 54 -

# **Seznam příloh**

Příloha 1: Technický nákres destilačního přístroje

# 1. Úvod

Zelenina je součástí zdravé výživy a v poslední době se významně zvýšila její spotřeba. Čerstvá zelenina a různé zeleninové saláty jsou zejména v západních zemích jednou z nejpobulárnějších minimálně zpracovaných (fresh-cut) potravin. Při výrobě těchto potravin nejsou používány téměř žádné konzervační metody, které by spolehlivě eliminovaly přítomné nežádoucí mikroorganismy. Konzumace fresh-cut potravin tedy pro spotřebitele nepředstavuje pouze přínos v podobě zdravé stravy, ale i riziko nákazy patogenními mikroorganismy způsobující převážně průjmová onemocnění. Kontaminace zeleniny patogeny může proběhnout v různých stupních zpracovatelského řetězce, proto výrobci musí podniknout taková opatření, aby se ke spotřebiteli dostala bezpečná potravina.

Špenát patří mezi zeleninu, která se často prodává čerstvá a její obliba se stále zvyšuje. Zároveň špenát patří mezi vysoce rizikové komodity, protože patogenní mikroorganismy přítomné na špenátu byly příčinou několika epidemií. Příčinou těchto onemocnění může být sérotyp *E. coli* O157:H7, který způsobuje několik onemocnění, nejvážnějším je mnohdy smrtelný hemolyticko-uremický syndrom. Vznik onemocnění *E. coli* O157:H7 je nejčastěji spojován s nedostatečně tepelně upraveným kontaminovaným masem, pitím kontaminované vody, nebo právě konzumací kontaminované zeleniny. V USA je např. každý rok hlášeno asi 73 000 případů infekce a 61 úmrtí způsobené *E. coli* O157:H7. Proto je zřejmé, jaký význam má dezinfekce produktů nabízených koncovým spotřebitelům, aby se snížila rizika případné kontaminace a následných zdravotních problémů. Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na ošetření čerstvých špenátových listů, které byly inokulovány kmenem *E. coli* ATCC 25922.

V potravinářském průmyslu se v současnosti pro čerstvou zeleninu nejčastěji využívá dezinfekce na bázi chemických prostředků, které ale nedokáží zcela odstranit nebo inaktivovat všechny mikroorganismy. Nejpoužívanějšími jsou přípravky na bázi chloru, které mohou mít negativní dopad na zdraví člověka a životní prostředí. V posledních letech navíc spotřebitelé požadují potraviny bez přídavku syntetických látek. Výrobci k nim proto hledají alternativy, jednou z nich jsou přírodní látky.

Velký potenciál stát se touto přírodní alternativou ošetření ready-to-eat produktů nabízí silice, které *in vitro* vykazují dobré antimikrobiální účinky proti širokému spektru mikroorganismů jako je např. *E. coli* nebo salmonela. V experimentální části práce byly zkoumány antimikrobiální účinky silice saturejky a zavinutky, u kterých se předpokládala vysoká účinnost proti patogenním bakteriím.



## 2. Vědecká hypotéza a cíle práce

Vědecká hypotéza:

Plynná fáze silice rostlin rodu *Monarda* a *Satureja* má prokazatelné antimikrobiální účinky *in vitro*. Lze předpokládat, že tuto vlastnost silic je možné využít ke snížení výskytu patogenních mikroorganismů na špenátu a jiných minimálně zpracovaných produktech, a zajistit tak zdravotní nezávadnost pro spotřebitele.

Cíle práce:

1. Na základě literární rešerše posoudit možnosti využití silic k ošetření minimálně zpracovaných potravin.
2. Stanovit efektivní způsob ošetření špenátu (inokulovaného patogenním mikroorganismem *Escherichia coli*) silicemi rodu *Monarda* a *Satureja*, které již dříve prokázaly účinnost proti tomuto mikroorganismu *in vitro*.

## 3. Přehled literatury

### 3.1 Silice

Silice jsou složité směsi těkavých látek obsažené v přírodních rostlinných materiálech. Získávají se z různých částí rostlin, jejich květů (např. jasmín), stonků nebo případně kvetoucích stonků (např. máta, zavinutka), plodů nebo semen (kmín, pepř, jalovec), oplodí plodů (citrusy), dřeva (santal), listů (bobkový list), cibulí či složených cibulí (česnek), oddenků (puškovec, kurkuma) či kořenů (hořec) (Velíšek, 2002).

Mohou být získány několika způsoby. Prvním a nejčastěji využívaným způsobem získávání silic je destilace s vodní párou (Burt, 2004). Dalším způsobem je superkritická fluidní extrakce oxidem uhličitým, která vykazuje lepší organoleptické vlastnosti získaných silic, ale její nevýhodou je větší cenová náročnost. Tato metoda je upřednostňována především pro výrobu parfémů (Bakkali et al., 2008). Další způsob získání silic je extrakce nepolárními rozpouštědly, například benzinem, petroléterem aj. Dnes se jen velmi zřídka využívá anfleráže, což je extrakce tuky (např. vepřovým sádlem). Silice z oplodí citrusových plodů se získává lisováním a oddělením vrstvy silice (Velíšek, 2002).

#### 3.1.1 Složení silic, jejich vlastností a současné využití

Silice jsou sekundární metabolity rostlin, které slouží rostlinám jako morforegulátory, atraktanty nebo obranné látky. Jsou to většinou čiré, nestálé kapaliny a proto musí být uloženy v hermeticky uzavřených obalech v temnu, aby se zabránilo změnám složení (Burt, 2004). Jsou rozpustné v tucích a organických rozpouštědlech a obvykle mají nižší hustotu než voda (Bakkali et al., 2008)

Silice jsou složeny z velkého počtu chemických sloučenin. Většina silic obsahuje značný podíl terpenových (monoterpenových a seskviterpenových) nebo aromatických uhlovodíků. Silice většinou obsahují 20 až 60 jednotlivých komponent, kde dvě až tři složky se vyskytují ve vysokých koncentracích (20 až 70 %), proto tyto složky označujeme jako majoritní, oproti ostatním složkám ve stopových množstvích, které označujeme jako minoritní. Např. silice získaná z koriandru setého (*Coriandrum sativum*) může obsahovat až 68 % linaloolu (Bakkali et al., 2008).

Terpeny tvoří strukturálně a funkčně odlišné třídy, základní stavební jednotku tvoří izopren (C<sub>5</sub>). Podle počtu izoprenových jednotek terpeny dělíme na monoterpeny (C<sub>10</sub>), seskviterpeny (C<sub>15</sub>), diterpeny (C<sub>20</sub>), triterpeny (C<sub>30</sub>) a tetraterpeny (C<sub>40</sub>). Terpenové uhlovodíky tvoří složky aroma většiny druhů ovoce, zeleniny a koření. Například asi 90 až 99 % vonných látek pomerančů a přibližně 70-80 % vonných látek černého pepře tvoří monoterpenové uhlovodíky a 20-30 % seskviterpenové uhlovodíky. Monoterpeny jsou vytvořeny ze dvou izoprenových jednotek a jsou z 90 % nejčastější složkou silic. Druhou nejvýznamnější složkou silic jsou seskviterpeny, které jsou tvořeny ze tří izoprenových jednotek. Méně často se v silicích vyskytují aromatické sloučeniny, které jsou odvozené od fenylypropanu. V případě, že terpen obsahuje kyslík, nazývá se terpenoid. Podle struktury se terpeny dělí na acyklické, monocyklické nebo bicyklické a podle funkční skupiny na uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, ketony, estery, ethery, peroxidy a fenoly (Velíšek, 2002).

Z acyklických monoterpenových uhlovodíků je nejběžnější myrcen a ocimen. Myrcen je součástí silice chmelu. Běžně se vyskytujícím monocyklickým monoterpenovým uhlovodíkem je  $\alpha$ -terpinen (koriandr),  $\alpha$ -felandren (fenykl). Nejnámější bicyklické monoterpenové uhlovodíky jsou pinen (jehličnaté rostliny), kamfen a sabinen (chvojka klášterská). Mezi acyklické seskviterpenové uhlovodíky patří farneseny, monocyklické seskviterpenové uhlovodíky reprezentuje např. zingiberen (zázvor) a běžnými bicyklickými seskviterpenovými uhlovodíky jsou  $\beta$ -kadinen a  $\beta$ -karyofyllen. Aromatické uhlovodíky, s výjimkou monoterpenu p-cymenu (složkou silic mnoha koření a zelenin), se vyskytují poměrně vzácně (Velíšek, 2002; Bakkali et al., 2008).

Acyklické monoterpenové alkoholy jsou charakteristickými složkami některých druhů silic, vykazují většinou sladké, těžké, květinové aroma. Z běžných acyklických alkoholů je nejvýznamnější linalool, vonná látka mnoha květů (levandule), dále citronellol a geraniol. Z monocyklických monoterpenových alkoholů je častou složkou silic  $\alpha$ -terpineol (majoránka), 4-terpineol (tymián) a menthol (máta). Významnou aromatickou složkou silice šalvěže je bicyklický monoterpenový alkohol borneol. Seskviterpenový acyklický alkohol farnesol je přítomen v pomerančové silici. Hlavním zástupcem aromatických alkoholů je skořicový alkohol (Velíšek, 2002; Bakkali et al., 2008).

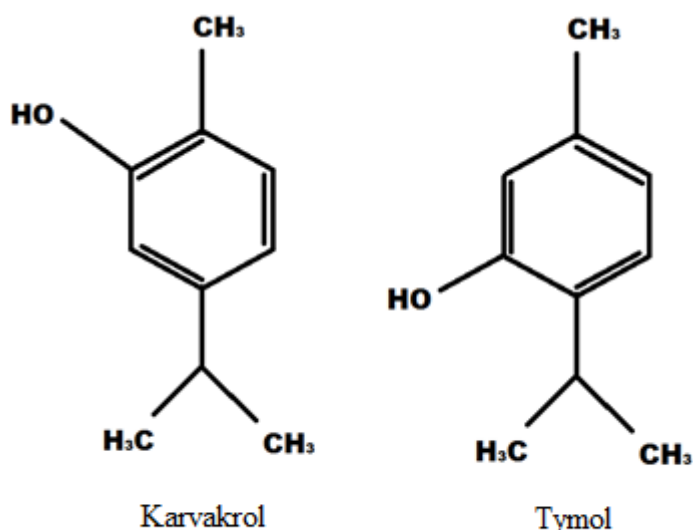
Významným éterem je estragol vyskytující se v estragonové silici, isomerní anetol se vyskytuje v silici anýzové, fenyklové a badyánové (Velíšek, 2002).

K nejčastěji se vyskytujícím acyklickým monoterpenovým aldehydům náleží citral, je vonnou složkou mnoha silic, zejména silic citrusových plodů, zázvoru a pepře. Existují dva isomery citralu: geranial a neral. Mezi známé aromatické aldehydy patří benzaldehyd, skořicový aldehyd (cinnamaldehyd) a vanilin (Velíšek, 2002).

Monocyklické monoterpenové ketony jsou karvon (kmín, kopr), menthon (máta), piperiton (eukalyptus). Jako příklad bicyklických monoterpenových ketonů uvádím thujon (šalvěj) a kafr (rozmarýn). Složkami silice kurkumy jsou monocyklické seskviterpenové ketony turmeron a *ar*-turmeron. Důležitými složkami aroma grapefruitů jsou bicyklické seskviterpenové ketony nootkaton a kamforenon. Složkou silice fenyklu a badyánu je aromatický keton anisketon (Velíšek, 2002; Bakkali et al., 2008).

Významnými fenoly jsou karvakrol a tymol (obr. 1) vyskytující se například v tymiánové silici. Následující fenoly jsou odvozené od guajakolu, prvním z nich je eugenol, který je klíčovou aromatickou složkou hřebíčkové silice. Druhým je isoeugenol, který je přítomen v bazalkové silici (Velíšek, 2002).

Obrázek 1: Významné fenoly



Velmi důležitou skupinou vonných a chuťových látek potravin jsou sírné sloučeniny, např. diallyldisulfid je vonnou a chuťovou složkou česneku a allylthiokyanát je nositelem typického aromatu křenu (Velíšek, 2002).

Složení silic daného druhu rostlin může být vzájemně rozdílné v závislosti na období sklizně a na zeměpisném původu. Složení silic z různých částí téže rostliny se také může značně lišit, například silice získané ze semen koriandru setého (*Coriandrum sativum*) má odlišné složení než z nezralých listů (Delaquis et al., 2002). Bylo zjištěno, že silice získané z bylin sklizených v průběhu nebo ihned po odkvětu mají nejsilnější antimikrobiální aktivitu (Marino et al., 1999).

V současné době je známo přibližně 3000 druhů silic, z nich je asi 300 využíváno komerčně (Burt, 2004). Jejich široké využití se uplatňuje například ve farmacii, stomatologii, agronomii, potravinářství, kosmetickém a parfumérském průmyslu. Dále jsou silice používány v aromaterapii a také jako složka do masážních olejů (Bakkali et al., 2008). Již dlouhou dobu je známo, že některé silice mají antimikrobiální vlastnosti, ale až zvýšení zájmu o zdravější stravování vedlo k obnovení vědeckého zájmu o tyto látky. Kromě antibakteriálních vlastností byly prokázány antivirální, antimykotické, antitoxigenické, antiparazitární a insekticidní vlastnosti (Başer and Buchbauer, 2010).

Některé monoterpeny, které jsou složkou silice citrusů, vykazují potenciální protinádorovou aktivitu. Např. D-limonen, který je hlavní složkou pomerančové silice, měl chemopreventivní účinky u hlodavců proti nádorům mléčné žlázy, kůže, jater, plic a žaludku (Nutr, 1999). Nejdůležitější metabolit D-limonenu perillylalkohol se vyznačuje ještě vyšší účinností (Başer and Buchbauer, 2010).

### 3.1.2 Významné druhy bylin a koření obsahující silice s antimikrobiálními vlastnostmi

Čerstvé, sušené nebo jinak upravené části některých rostlin vyznačujících se intenzivní charakteristickou vůní a chutí našly uplatnění jako koření pro ochucování pokrmů (Velíšek, 2002). Je známo, že různé byliny a koření mají antimikrobiální aktivitu, snižují růst mikroorganismů a tím zlepšují celkovou kvalitu potravinářských výrobků. Některé z těchto přítomných složek mají vysoké antimikrobiální účinky, například složky obsažené v novém koření, skořici, hřebíčku, hořčici, bazalce, oregánu, rozmarýně, šalvěji a tymiánu. Ostatní druhy koření, jako je anýz, bílý pepř, bobkový list, černý pepř, paprika, chilli, koriandr, kmín, kari, kopr, muškátový květ, majoránka, máta, muškátový oříšek a zázvor, vykazují nižší antimikrobiální vlastnosti (Holley and Patel, 2005).

V následujících odstavcích bude uvedeno složení, vlastnosti a použití vybraných bylin a koření, které budou zařazeny do skupin podle chemické struktury jejich majoritní složky silice. Ze skupiny monocyklických monoterpenových uhlovodíků je typický zástupce zázvor (*Zingiber officinale*), jehož silice se z 30-70 % skládá ze zingiberenu, z 15-30 % z  $\beta$ -seskvifellandrenu a z 10-15 % z  $\beta$ -bisabolenu, dále z citralu a citronellyl-acetátu (Velíšek, 2002). Zázvor má široké spektrum účinků na lidský organismus, byla zjištěna účinnost proti onemocnění srdce, migréně, chronické únavě, nachlazení, chřipce, depresím a horečce (Auta et al., 2011).

Druhá skupina - alkoholy - zahrnuje koriandr a mátu. Koriandr je složen až z 80 % z linaloolu, dále z linalyl-acetátu, citralu,  $\alpha$ -pinenu,  $\beta$ -pinenu,  $\alpha$ -fellandrenu,  $\alpha$ -terpinenu, *p*-cymenu, dekanolu, geraniolu a borneolu. Koriandr se především využívá v potravinářském průmyslu. Máta se používá v tradičním a lidovém léčení na celém světě pro svoje antimikrobiální a antioxidační vlastnosti. Rod *Mentha* zahrnuje asi 25 druhů. Máta peprná (*Mentha piperita*) obsahuje 46-60 % mentholu, 20 % menthonu, 10 % menthyl-acetátu, 2-3 % menthofuranu, dále  $\alpha$ -pinen,  $\alpha$ -fellandren,  $\beta$ -karyofyllen (Velíšek, 2002).

Třetí skupina rostlin obsahuje aldehydy. Do této skupiny můžeme zařadit skořici a vanilku. Hlavní součástí skořicové silice je cinnamaldehyd, který je přítomen v koncentraci nad 80 %. Silice se svými přirozenými dezinfekčními účinky je slibnou možností v boji proti bakteriálním biofilmům a to zejména v mlékařském průmyslu. Výhodou použití této přírodní dezinfekce, oproti běžně používané chemické, je dosud neexistující rezistence mikroorganismů na tuto látku (Oliveira et al., 2012). Hlavní složkou silice vanilkových lusků

je vanilin. Vanilka, jak je všeobecně známo, se díky svému aroma používá jako ochucovadlo (Velíšek, 2002).

Následují šalvěj a kmín, jejichž hlavními složkami jsou monoterpenové ketony. Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*) je v lidovém léčitelství používána na celém světě k léčbě mikrobiálních infekcí, rakoviny, malárie, zánětů a také jako dezinfekce domů či bytů (Cardile et al., 2009). Dominantní složky v silicích šalvěje jsou thujon až 60 %, dále 1,8-cineol, kafr,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, bornyl-acetát, myrcen, borneol, linalyl-acetát, ocimen. Kmín (*Carum carvi*) obsahuje 55 % karvonu, 44 % limonenu, dále  $\alpha$ -pinen,  $\alpha$ -felandren, dihydrokarvyl-acetát, 1,8-cineol, linalool. Kmín se používá zejména jako ochucovadlo a také v lidovém lékařství (Velíšek, 2002).

Za antibakteriální vlastnosti silic jsou zodpovědné hlavně fenoly (Holley and Patel, 2005). Sloučeniny s fenolickou strukturou obsahují tymián, oregano a hřebíček. Tymián (*Thymus vulgaris*) se kromě tradičního uplatnění začal v posledních letech využívat v průmyslových, farmaceutických a lékařských oborech (Hudaib et al., 2002). Jeho hlavními složkami jsou tymol do 70 %, karvakrol, p-cymen, linalool, limonen,  $\alpha$ -pinen, kamfen, terpinen,  $\beta$ -karyofyllen, geraniol, borneol. Dva hlavní fenoly oregana (*Origanum vulgare*), karvakrol a tymol, tvoří přibližně 78 až 85 % silice (Velíšek, 2002). Hřebíček (*Syzygium aromaticum*) se tradičně používal jako ochucovadlo a antibakteriální látka v potravinách. Silná antimikrobiální aktivita hřebíčkové silice je způsobena přítomností hlavní složky eugenolu (80-90 %), o které je známo, že má antioxidační účinky (Teixeira et al., 2013).

Poslední skupina zahrnuje česnek a křen, obě rostliny obsahují ve svých sloučeninách síru. Česnek je historicky využíván jako léčivá rostlina, zejména pro své antibakteriální působení, ale využívá se i v potravinářství. Hlavní složkou česnekové silice jsou především trisulfidy (57,4 %) a disulfidy (23,16 %). Křen se již od starověku používá jako léčivá bylina a také díky svým specifickým sensorickým a nutričním vlastnostem se hodí pro kulinární využití. Křen je bohatým zdrojem řady biologicky aktivních látek, jako jsou glukosinoláty, dominantním je sinigrin, je obsažen jak v listech, tak v kořenech (Agneta et al., 2013).

## **3.2 Antimikrobiální aktivita silic**

Ačkoli antimikrobiální vlastnosti silic jsou již dlouho zkoumány, univerzální mechanismus účinku nebyl dosud definován (Burt, 2004). Chemická struktura jednotlivých složek silic ovlivňuje jejich přesný mechanismus působení a bakteriální aktivitu (Dorman and Deans, 2000). Vzhledem k tomu, že silice jsou složené z velkého počtu různých chemických sloučenin, předpokládá se, že neexistuje jeden konkrétní mechanismus účinku, ale obecně je možno říci, že díky lipofilním vlastnostem silic dojde k narušení cytoplazmatické membrány bakterií (Burt, 2004).

Antimikrobiální aktivita je závislá na typu mikroorganismu, což je dáno odlišnou stavbou a složením bakteriální stěny grampozitivní (G+) a gramnegativní (G-) bakterie (Burt, 2004). Aktivita silice závisí kromě chemického složení i na poměru jednotlivých složek a na jejich vzájemných interakcích (Dorman and Deans, 2000). Např. z některých výzkumů vyplývá, že minoritní složky mají rozhodující úlohu v antibakteriální aktivitě a předpokládá se, že existuje synergický účinek mezi složkami silice (Burt, 2004). Mechanismus účinku bude podrobněji diskutován v následující kapitole.

### **3.2.1 Mechanismus účinku silic**

Silice jsou vysoce hydrofobní směsi látek, které mají antagonistické, synergické nebo aditivní účinky na mikrobiální buňky (Lanciotti et al., 2004). Hydrofobní povaha silic umožňuje narušení struktury cytoplazmatické membrány, která se stává více propustná a může dojít k úniku iontů a dalšího buněčného obsahu. Únik menšího množství látek z bakteriální buňky nemá vliv na životaschopnost, avšak rozsáhlá ztráta obsahu buňky nebo únik zásadních molekul a iontů vede k její smrti (Burt, 2004).

Silice obsahující vysoké procento fenolických sloučenin, jako jsou karvakrol, eugenol a tymol, se vyznačují nejsilnějšími antibakteriálními vlastnostmi proti potravinovým patogenům. Předpokládá se, že mechanismus účinku uvedených fenolů vyskytujících se v silicích by měl být podobný jako u jiných fenolických látek, což je obecně považováno za narušení cytoplazmatické membrány, narušení protonmotivní síly (PMF), toku elektronů, aktivního transportu a koagulaci obsahu buněk (Burt, 2004). Mechanismus účinku karvakrolu, jednoho z hlavních složek silic oregana a tymiánu, se zdá být nejprozkoumanější. Tymol je strukturně velmi podobný karvakrolu, liší se pouze polohou hydroxylové skupiny



na fenolickém kruhu (Ultee et al., 2002). Lambert et al. (2001) zjistili, že pozice hydroxylové skupiny na fenolickém kruhu výrazně neovlivňuje antibakteriální aktivitu, což dokazuje antibakteriální účinek tymolu na bakterie *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*, který je srovnatelný s účinkem karvakrolu. Obě tyto látky mohou difundovat přes plasmatickou membránu. Karvakrol a tymol způsobují narušení vnější lipopolysacharidové vrstvy, což způsobí částečné poškození buněčné stěny G- bakterií a tím zvýšení propustnosti cytoplasmatické membrány pro ATP.

Např. Ultee et al. (2002) provedli studii působení karvakrolu na bakterii *B. cereus*. Karvakrol se při interakci s buněčnou membránou navazuje na řetězce mastných kyselin a dochází tak k jeho integraci do fosfolipidové dvojvrstvy. Toto narušení struktury způsobilo expanzi a destabilizaci membrány, zvýšilo to její tekutost a tím se zvýšila pasivní propustnost. V této studii byl dále zkoumán průchod buněčných metabolitů přes buněčnou membránu v přítomnosti karvakrolu. Měřením intracelulárního a extracelulárního množství ATP bylo zjištěno, že hladina ATP se v buňce snížila, zatímco vně buňky nedošlo k úměrnému zvýšení. Proto se předpokládá, že byla snížena rychlost syntézy ATP nebo že se zvýšila rychlost hydrolýzy ATP. Po přidání karvakrolu byl zjištěn prudký pokles membránového potenciálu v buňkách v exponenciální fázi růstu a to indikovalo oslabení protonmotivní síly. V přítomnosti karvakrolu došlo ke snížení gradientu pH (rozdílu koncentrací H<sup>+</sup>) vně a uvnitř buňky. Dále klesly intracelulární hladiny draselných iontů, zatímco extracelulární množství se úměrně zvýšilo (Burt, 2004). Ultee et al. (2000) došli k závěru, že v přítomnosti karvakrolu se mastné kyseliny fosfolipidů se od sebe vzdalují, vytvoří se tak membránové kanály a ionty mohou opustit cytoplazmu.

V zájmu mikrobiologů je kromě inhibice růstu vegetativních bakteriálních buněk také inhibice produkce toxinu. Karvakrol má schopnost inhibovat syntézu průjmových toxinů *B. cereus* jak v živné půdě, tak i v bujónu. Existují dvě teorie způsobu inhibice toxinů. Pokud je toxin vylučován aktivním procesem, musí být dostatečná hladina ATP nebo protonmotivní síly, jinak dojde k akumulaci toxinu uvnitř buňky. Druhá teorie uvádí, že nízká specifická růstová rychlost buňky má za následek, že buňky využívají všechny dostupné energie k udržení životaschopnosti a nespotebouvají energii pro výrobu toxinu (Ultee a Smid, 2001).

V jedné studii bylo zjištěno, že karvakrol a tymol působí rozdílně proti G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> druhům bakterií (Dorman and Deans, 2000). Většina studií zkoumajících účinek silic proti potravinovým patogenním mikroorganismům se shoduje s tím že, silice obecně jsou o něco více účinné proti G<sup>+</sup>, než G<sup>-</sup> bakteriím (Farang et al., 1989, Delaquis et al., 2002). G- bakterie

jsou méně náchylné k působení antibakteriálních látek, neboť jejich buněčná stěna je složená z tenké peptidoglykanové vrstvy a silné vrstvy fosfolipidů a lipopolysacharidů, které brání difúzi silic do buňky. G<sup>+</sup> bakterie mají buněčnou stěnu tvořenou silnou vrstvou peptidoglykanu protkanou kyselinou teichoovou a lipoteichoovou (Burt, 2004; Chung et al., 2007). Nicméně, ne všechny studie došly k závěru, že G<sup>+</sup> bakterie jsou více citlivé na působení antibakteriálních látek (Wilkinson et al., 2003). Z G<sup>-</sup> bakterií se zdá být nejméně citlivá na působení silic zejména *Pseudomonas aeruginosa*, naopak jedním z nejvíce citlivých druhů je *Aeromonas hydrophila* (Deans and Ritchie, 1987; Dorman and Deans, 2000).

V tomto odstavci bude věnována pozornost vzájemným interakcím mezi jednotlivými složkami silice. Jedná se o aditivní účinek, antagonismus nebo synergii. Aditivní účinek je pozorován, když se kombinovaný účinek rovná součtu jednotlivých účinků. Antagonismus nastane, pokud jsou složky silic použity společně a účinek jedné nebo obou složek je menší, než když jsou aplikovány individuálně. Synergie je pozorována, když účinek všech látek je větší než součet účinků jednotlivých (Burt, 2004). Některé studie došly k závěru, že kompletní silice má vyšší antibakteriální účinnost než jen smíchané její hlavní složky (Gill et al., 2002; Mourey and Canillac, 2002). To nasvědčuje, že minoritní složky jsou důležité pro aktivitu a mohou mít synergický účinek. Bylo zjištěno, že hlavní složky silice oregana, karvakrol a tymol mají aditivní účinek při testování proti bakterii *Stafylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* (Lambert et al., 2001). Synergismus mezi karvakrolem a jeho biologickým prekurzorem p-cymenem je založen na tom, že p-cymen naruší bakteriální buněčnou stěnu a tím umožní karvakrolu snadněji proniknout do buňky a zesílit jeho účinek (Burt, 2004).

Synergie a antagonismy byly zkoumány mezi složkami silic a fyzikálními a chemickými faktory. Bylo prokázáno, že chlorid sodný v kombinaci se silicemi může mít synergické i antagonistické účinky za různých podmínek. Jako příklad synergie uvádím výsledky výzkumu, kde byla ošetřena svalovina makrely obecné kombinací účinku 2-3 % NaCl a 0,5 % hřebíčkového prášku, který zcela zabránil růstu a produkci histaminu *Enterobacter aerogenes*. Jako další příklad synergie lze uvést zkoumaný vliv silice oregana v kombinaci s dusitanem sodným na růst a produkci toxinu *Clostridium botulinum*. Aplikace samotné silice oregana nemá žádný významný inhibiční účinek na růst, ale v kombinaci s dusitanem synergicky inhibují růst *C. botulinum* (Burt, 2004). Je známo, že karvakrol a p-cymen působí synergicky, ale tento účinek se snižuje, pokud se přidá sůl. Toto se prokázalo při použití v rýži proti *B. cereus*, kde byl účinek pouze antagonistický

(Ultee et al., 2000). Karatzas et al. (2001) se zabývali kombinovaným účinkem karvonu (5 mmol/l) a teploty (při 45 °C, po dobu 30 min) na exponenciálně rostoucích buňkách *Listeria monocytogenes* kultivovaných při 8 °C. Při působení teploty a karvonu dojde k poklesu o 1,3 log<sub>10</sub> KTJ. Při samostatném působení karvonu nebo teploty nedojde ke ztrátě životaschopnosti buněk. Buňky kultivované při teplotě 35 °C nebo 45 °C už nebyly citlivé ke stejně kombinovanému ošetření, protože membrány buněk kultivovaných při 45 °C obsahují „normální“ poměr nasycených a nenasycených mastných kyselin fosfolipidů a karvon je proto méně účinný. Naopak bakterie kultivované při 8 °C mají fosfolipidy cytoplazmatické membrány více nenasycené. Vysoký stupeň nenasycenosti způsobí, že membrány těchto buněk jsou více tekuté než membrány buněk kultivovaných při 45 °C. Zvýšená tekutost umožní karvonu se snadněji rozpustit v lipidové dvojvrstvě v buňkách kultivovaných při 8 °C než při 45 °C.

### **3.2.2 Testování antimikrobiální aktivity silic *in vitro***

Pro zkoušení antimikrobiální aktivity se nejčastěji používají metody pro testování antibiotik, které jsou přizpůsobené pro silice a lze je rozdělit na difuzní nebo diluční. Vědci si tyto metody přizpůsobili pro lepší aplikaci v konkrétním experimentu, protože uvedené metody byly vyvinuty pro hydrofilní látky. Silice jsou viskózní hydrofobní látky, proto se do živných půd musí přidávat rozpouštědla, např. etanol, Tween, polyetylen glykol (PEG), která umožňují lepší difuzi silic. Nevýhodou použití rozpouštědel je jejich negativní ovlivnění růstu mikroorganismů. Výsledky testů antimikrobiálních aktivit silic jsou tedy obtížně srovnatelné, neboť jsou značně ovlivněny mnoha faktory, jako je metoda používaná k získání silic z rostlinného materiálu, objem inokula, růstová fáze, množství silice, typ rozpouštědla, použité kultivační médium, pH média, inkubační doba a teplota (Burt, 2004; Nedorostová, 2009).

Screening silic na antibakteriální aktivitu je často proveden diskovou difuzní metodou, při které jsou kladeny disky filtračního papíru nasycené silicí na zaočkovanou Petriho misku. Toto se obecně používá jako předběžná kontrola antibakteriální aktivity před začátkem podrobnějších studií (Burt, 2004).

Sílu antibakteriální aktivity můžeme určit dilučními metodami, při kterých se silice rozpustí v agaru nebo bujónu. Existují dvě možnosti provedení, makrodiluční metoda ve zkumavkách nebo novější mikrodiluční metoda prováděná na mikrotitračních destičkách.

Literatura uvádí používání různých rozpouštědel, způsobů zaočkování a objemů inokula. K vyhodnocení minimální inhibiční koncentrace (MIC) existuje celá řada různých technik, nejpoužívanější metodou je měření optické hustoty (denzitometrie) (Burt, 2004).

Při testování antimikrobiální aktivity se sleduje MIC, která je citována většinou výzkumníků jako měřítko antibakteriálního výkonu silic. Definice MIC se liší v různých publikacích, což je další překážkou pro porovnání výzkumů. V některých případech se uvádí i minimální baktericidní (MBC) nebo bakteriostatická koncentrace, oba pojmy úzce souvisí s MIC (Burt, 2004). Dle Delaquis et al. (2002) je MIC definována jako nejnižší koncentrace inhibující viditelný růst testovaného mikroorganismu. Cosentino et al. (1999) definuje MIC, jako nejnižší koncentraci vedoucí k výraznému poklesu životaschopnosti inokula (> 90 %). Canillac a Mourey (2001) uvádějí definici minimální baktericidní koncentrace (MBC) jako koncentraci, při které je zabito minimálně 99,9 % z počátečního inokula. Příklady vybraných MIC silic testovaných *in vitro* proti *Escherichii coli* jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka 1: MIC silic testovaných *in vitro* proti *Escherichii coli* (Burt, 2004).

<b>Rostlina, z níž byla silice izolována</b>	<b>Druhy bakterie</b>	<b>MIC (<math>\mu\text{l ml}^{-1}</math>)</b>
Rozmarýn	<i>Escherichia coli</i>	4,5 - > 10
Oregano	<i>Escherichia coli</i>	0,5 – 1,2
Šalvěj	<i>Escherichia coli</i>	3,5 – 5
Hřebíček	<i>Escherichia coli</i>	0,4 – 2,5
Tymián	<i>Escherichia coli</i>	0,45 – 1,25

### 3.2.3 Pokusy na potravinách

V současné „syntetické“ době se hledají alternativní způsoby konzervace potravin, které mají tzv. „zelenou“ image. Například Světová zdravotnická organizace (WHO) vydala doporučení k celosvětovému snížení spotřeby soli, aby se snížil výskyt srdečně cévních onemocnění. Pokud se sníží hladina soli u polotovarů, k udržení bezpečnosti potravin bude zapotřebí další přísady. Zde je tedy prostor pro nové způsoby, které mají „zelenou“ image. Jednou z variant je použití silic, jako antibakteriálních látek, které se mohou stát přírodními potravinářskými konzervanty a aditivy (Burt, 2004).

Od roku 1990 byl proveden značný počet experimentů zaměřených na ošetření potravin silicemi. Ačkoliv silice vykazují dobré výsledky v antibakteriálních testech *in vitro*, k dosažení stejného účinku v potravinách je nutná jejich vyšší koncentrace. Poměr činí přibližně dvojnásobek u polotučného mléka, u vepřových jater a klobás desetinásobek, padesátinásobek v polévce a až stonásobek u měkkých sýrů. Několik studií zaznamenalo mikrobiální odolnost na řadu silic, ale zatím nikdo nevysvětlil přesný mechanismus účinku (Burt, 2004). Konkrétní příčina není známá, ale pravděpodobně bakterie mohou opravit poškozené buňky rychleji kvůli větší dostupnosti živin z potravin než z laboratorního média (Gill et al,2002).

Citlivost bakterií vůči silicím se zvyšuje s nízkým pH potravin, skladovací teplotou a se sníženým obsahem kyslíku v obalu. Platí, že při nízkém pH se zvyšuje hydrofóbnost silic, což umožňuje snadnější rozpuštění lipidů buněčné membrány bakterií. Na druhou stranu vysoké hladiny tuku nebo bílkovin v potravinách chrání bakterie proti působení silic. Například silice se přednostně rozpustí v lipidové fázi potravin a tím nedojde k poškození patogenních bakteriálních buněk. Toto se potvrdilo ve výzkumu, kde vysoký obsah tuku ryb snížil antibakteriální účinnost silic. Použitá silice oregana (0,5 µl/g) byla účinnější proti bakterii *Photobacterium phosphoreum* na filetech tresky obecné než na filetech z lososa, který je tučnější (Burt, 2004). V dalším výzkumu Tassou et al. (1995) zjistili minimální antibakteriální účinek mátové silice proti bakteriím *Listeria monocytogenes* a *Salmonella enteritidis* ve vysoce tučných výrobcích, jako je paštika a salát z rybích jiker, naproti tomu byla účinnost silice v nízkotučném salátu z okurek a jogurtu mnohem větší. Lepší účinnost silice v okurkovém salátu může být částečně způsobeno nižším pH, které bylo 4,3 na rozdíl od paštiky (pH 6,8), ale salát z jiker má také nízké pH (4,9). To by mohlo znamenat, že procentuální obsah tuku má větší vliv na antibakteriální účinek silic než pH.

Dalším faktorem, který snižuje antibakteriální aktivitu, je struktura potravin. Tímto se zabývali ve studii, kde se testovala účinnost silice oregana proti *Salmonella typhimurium* v bujónu, nebo agaru. Zde bylo zjištěno, že došlo k omezení difúze gelovou konzistencí produktu, která výrazně snižuje inhibiční účinek silice (Tassou et al., 1995).

Mnohé studie prokázaly, že rostlinné silice jsou vhodné pro redukci patogenů v masných produktech (Grosso et al., 2008). Například silice saturejky horské (*Satureja Montana* L.) v kombinaci s jinými konzervačními metodami (jako např. snížená teplota) lze použít jako ekonomické přírodní antibakteriální látky a pro zlepšení kvality mletého vepřového masa (Tajkarimi et al., 2010).

Zde uvedu příklady ošetření silicemi u jiných potravin, než jsou masné produkty. Například bylo prokázáno, že extrakt ze semen manga snižuje celkový počet bakterií, dále potlačuje růst koliformních bakterií a zvláště významně inhibuje *Escherichii coli*. Vysoká aktivita vody příznivě ovlivňuje účinky silic v mléce tím, že urychlí přenos a pohyb silic k cílovým mikroorganismům. Tohoto lze využít k prodloužení trvanlivosti pasterizovaného kravského mléka (Abdalla et al., 2007).

Nyní uvedu příklad antimikrobiální aktivity silic na ovoci. Proti plísňovým chorobám na hroznech, způsobenými *Botrytis cinerea*, byly silice účinnější než syntetické konzervační látky (Tajkarimi et al., 2010). Účinek silic může být ovlivněn i rozdílnými hodnotami pH, čím nižší je pH, tím účinněji působí přírodní antimikrobiální látky. Tuto domněnku potvrzuje studie, kde přírodní mikroflóra kiwi (pH 3,2–3,6) byla účinně inhibována karvakolem a cinnamaldehydem, ale méně efektivně byla inhibována na melounu (pH 5,4–5,5) (Burt, 2004).

Pokud se zaměříme na zeleninu, nejlepšího antimikrobiálního účinku silic je dosaženo v kombinaci s nízkou teplotou skladování anebo při nízkých hodnotách pH potravin. Zelenina má obecně nízký obsah tuku, což přispívá k výborným antimikrobiálním účinkům silic. Například dle jedné studie silice oregana (7-21  $\mu\text{l/g}$ ) byla účinná v inhibici počtu *E. coli* v lilkovém salátu ve srovnání s neošetřenou kontrolou, i přestože salát měl poměrně vysoký obsah tuku, ale procentuální obsah nebyl uveden (Burt, 2004).

Nevýhodou přírodních konzervačních látek je, že mohou více či méně ovlivnit senzorické vlastnosti ošetřené potraviny. Proto se klade důraz na pečlivý výběr kombinace silice a potraviny. Silice by bylo např. vhodné začlenit do výroby potravin, které jsou tradičně spojeny s bylinami (pikantní jídla, jako je maso a rybí pokrmy, sýry, zeleninové pokrmy,

polévky a omáčky) nebo s kořením. Například silice oregana má pozitivní vliv na chuť v mase a rybách nebo kombinace špenátu a česnekové silice by mohla mít dobrý vliv na organoleptické vlastnosti (Burt, 2004).

## 3.3 Charakteristika zkoumaných druhů rostlin a jejich antimikrobiální aktivity

### 3.3.1 Saturejka zahradní (*Satureja hortensis* L.)

Saturejka je jednoletá aromatická bylina patřící do čeledi hluchavkovitých (Lamiaceae). V rodu saturejka nalezneme asi 30 druhů, které rostou v mírných a subtropických pásmech obou polokoulí. Saturejka zahradní původně pochází z jihovýchodní Evropy, Středomoří a teplých oblastí jihozápadní Asie. V České republice se pěstuje na omezených plochách a zahrádkách, kde občas zplaňuje. Vzpřímená ze spodu zdřevnatělá lodyha saturejky dosahuje výšky 0,3 až 0,6 m. Listy mají tmavě zelenou barvu, jsou čárkovité, zašpičatělé, mírně chlupaté. Květy jsou drobné, na krátkých stopkách, se zvonkovitým zeleným nebo fialovým kalichem (Pavela a Bárnet, 2011).

Saturejka má uplatnění v tradičním lidovém léčitelství, v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Silice saturejky má antioxidační, antimikrobiální, antidepresivní, antispasmodické a antidiarhoické vlastnosti. Bylo prokázáno, že extrakty získané superkritickou fluidní extrakcí (SFE) i tradiční extrakční technikou mají insekticidní vlastnosti (Pländer et al., 2012). Hlavními složkami silice jsou tymol (40,54 %),  $\gamma$ -terpinen (18,56 %), karvakrol (13,98 %), a p-cymen (8,97 %). Silice ze saturejky vykazovaly aktivitu proti 25 bakteriím, 8 plísním a kvasinkám. Studie ukázaly, že silice saturejky, vzhledem k přítomnosti fenolových složek, jako je tymol a karvakrol, je účinná proti humánním, potravinovým i rostlinným mikrobiálním patogenům (Adiguzel et al., 2007).

Pro studium antimikrobiální aktivity silice saturejky byla použita disková difúzní metoda a mikrodiluční metoda. Výsledky ukázaly významnou aktivitu proti širokému spektru gramnegativních bakterií, kde se MIC pohybovala v rozmezí od 0,025 do 0,78  $\mu\text{l/ml}$ , u grampozitivních bakterií byla minimální inhibiční koncentrace v rozmezí od 0,05 do 0,39  $\mu\text{l/ml}$  (Mihajilov-Krstev et al., 2009).

Blažeković et al. (2010) zjistili, že antimikrobiální vlastnosti silice saturejky proti *E. coli* projevily slabý až střední antimikrobiální účinek. Během deseti dnů měření a sledování inhibičních zón byly zkoumané vlastnosti trvalé a stabilní. Poloměr inhibičních zón byl v rozmezí 0,33-7,00 mm v závislosti na základní koncentraci použité silice. Zóna inhibice pro nejnižší koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  byla nejmenší (0,33 mm), zatímco pro nejvyšší koncentraci 600  $\mu\text{g/ml}$  se rovnala 7,0 mm.



### 3.3.2 Zavinutka prostřední (*Monarda media* Willd.)

Zavinutka je trvalka patřící do čeledi hluchavkovitých (Lamiaceae), pochází ze Severní Ameriky, ale pěstuje se i v Evropě, zejména jako dekorativní rostlina. Zavinutka roste v trsech o délce lodyh zhruba půl metru vysokých. Fialové květy zavinutky jsou tvaru symetrických trubkovitých pětizubých kalichů a jsou velmi bohaté na nektar. V Americe květy této rostliny opylovává často kolibřík, ale je velice lákavá i pro včely a motýly. Listy a kvetoucí stonky se používají jako přírodní lék, který se používá pro snížení horečky, léčbu nachlazení nebo kožních vyrážek (Whitten, 1981; Savickiene et al, 2002; Berg, 2010).

Karasová (2013) pomocí plynové chromatografie analyzovala jako majoritní složku silice *Monarda media* Willd. tymol (55,13 %). Havlová (2013) stanovila *in vitro* MIC silice z rostliny *Monarda media* Willd. proti *E. coli* při koncentraci 1024 µg/ml.

V odborné literatuře není přesné chemické složení ani antimikrobiální aktivita silice *Monarda media* popsána, proto zde uvádím výsledky blízce příbuzné rostliny *Monarda didyma* L. V analýze chemického složení silice ze stonku s květy a listy bylo identifikováno 22 složek a to zejména tymol (51,7 %),  $\gamma$ -terpinen (14,3 %), p-cymen (9,7 %),  $\delta$ -3-karen (6,2 %) a myrcen (3,7 %) (Fraternale et al., 2006).

V jiné studii byly identifikovány dva odlišné chemotypy *Monarda didyma* L. lišící se majoritními složkami, kterými byl buď karvakrol (chemotyp 1) nebo tymol (chemotyp 2). Silice chemotyp 1 získaná z květu *Monarda didyma* L. obsahovala: karvakrol (71,9 %), p-cymen (6,2 %), thymochinon (3,7 %), 1-okten-3-ol (3,1 %),  $\gamma$ -terpinen (2,9 %), germakren D (1,6 %) a  $\alpha$ -terpinen (1,0 %) (Táborský, 2011). Tentýž autor stanovil v hexan/metanolovém extraktu u chemotypu 2 rostliny *Monarda didyma* L. tyto složky: tymol (62,57 %), thymochinon (13,11 %), thymohydrochinon (7,84 %), karvakrol (5,50 %), p-cymen (1,26 %), *cis*-sabinen hydrate (1,09 %), okt-1-en-3-ol (0,97 %), dithymochinon (0,14 %) (Táborský et al., 2012).

El Kalamouni et al. (2009) se zabývali výzkumem antimikrobiální aktivity silic čtyř vybraných rostlin (*Calamintha grandiflora*, *Monarda didyma* L., *Myrrhis odorata* a *Tanacetum balsamita*) proti devíti druhům bakterií (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Esherichia coli*, *Salmonella agona*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*). *Monarda didyma* L. ze všech rostlin dosahovala nejvyšší antimikrobiální aktivity a jako jediná inhibovala všechny zkoumané bakterie. Toto testování bylo prováděno diskovou difuzní metodou. Silice *Monardy* byla

nejúčinnější proti *Bacillus cereus* (MIC 40 mm) a proti *Esherichii coli* vykazovala druhou nejvyšší antibakteriální účinnost (MIC 18,9 mm).

Obrázek 2: *Monarda media* v květu



### 3.4 Minimálně zpracované potraviny (ready-to-eat)

V dnešní době roste poptávka po produktech připravených k přímé spotřebě a zároveň i snaha o prodloužení trvanlivosti těchto potravin. Mezi prvotní surovinou a hotovým pokrmem můžeme určit řadu stupňů zpracování, kde lze potraviny rozdělit z hlediska připravenosti ke zpracování a konzumaci (Suková, 2004). Nyní uvedu příklad rozdělení potravin podle stupně zpracování. Základní stupeň je zemědělský produkt (např. obilí, zelenina), následuje produkt ke kuchyňské úpravě (mouka, opaná zelenina), produkt (polotovar) k tepelné úpravě (těsto, syrová zmražená zelenina), produkt tepelně upravený, připravený ke kombinaci s další složkou (instantní těstoviny, sušená bramborová kaše), hotový pokrm (či jeho složka) připravený k ohřevu (zmrazené hotové pečivo, zeleninové konzervy) a nakonec potravina nebo pokrm připravený ke konzumaci nebo také tzv. ready-to-eat (zeleninové saláty, teplé pokrmy s donáškou, i pokrmy v podnicích společného stravování). Obecně chápeme potraviny s anglickým názvem ready-to-eat jako již připravený pokrm ke konzumaci za studena nebo za tepla. Pro potraviny s vyšším stupněm zpracování, než u základních potravin, používáme pojem konvenience. U konvenientních produktů obecně platí, že čím vyšší je stupeň zpracování, tím kratší má produkt trvanlivost (Suková, 2004).

Pokud se zaměříme na ovoce a zeleninu, za minimálně zpracované produkty považujeme jakékoliv čerstvé ovoce nebo zeleninu, které jsou upraveny například loupáním, řezáním nebo mytím pro získání 100 % jedlého produktu, který je následně zabalen a uchováván v chladícím zařízení. Mezi tyto produkty patří i tzv. fresh-cut ovoce a zelenina, což jsou například balené saláty, zeleninové směsi, krájené melouny, jablka apod. (Belloso et Soliva, 2011).

V posledních desetiletích dochází k výraznému nárůstu výroby a spotřeby fresh-cut výrobků z ovoce a zeleniny, které zřejmě souvisí s trendem zdravého stravování. Za tímto nárůstem stojí i doporučení pro zvýšení příjmu ovoce a zeleniny pro snížení vzniku rizika kardiovaskulárních a nádorových onemocnění od organizací jako jsou WHO, FAO, nebo EFSA. Výhodou fresh-cut produktů je možnost jejich okamžité konzumace, a tedy absence odpadů a úspora času v porovnání s případnou přípravou jídla. V USA například 30 % lidí dává přednost fresh-cut produktům před jejich nezpracovanými ekvivalenty. Ovoce a zelenina začaly nahrazovat nezdravé svačiny, proto se dodavatelé fresh-cut produktů zaměřili na zlepšení obalové, zpracovatelské a chladiřenské technologie (Belloso et Soliva, 2011).

Znehodnocení fresh-cut produktů může být fyziologické nebo mikrobiologické. Zpracováním čerstvé zeleniny a ovoce dochází v důsledku mechanického poškození tkání k narušení jejich přirozených ochranných bariér. Rostlinné tkáně proto podléhají rychlejšímu kažení, v porovnání s nezpracovanými produkty. Řezné plochy jsou také dobrým prostředím pro růst mikroorganismů. Např. bylo zjištěno, že na řezných plochách špenátu byly objeveny mikroorganismy po 12 dnech při skladování v 10 °C. Znehodnocení je závislé i na pH, například plísně a kvasinky se spíše objeví na ovoci s nižším pH (např. u jahod, malin, nektarinek), ale na zelenině s vyšším pH bude spíše detekován bakteriální růst. Kažení fresh-cut ovoce a zeleniny ovlivňují i vnější vlastnosti, jako je teplota skladování nebo ochranná atmosféra (Belloso et Soliva, 2011).

Fresh-cut ovoce a zelenina jsou z mikrobiologického hlediska často považovány za relativně bezpečné potraviny v porovnání s potravinami živočišného původu nebo jinými ready-to-eat produkty. Avšak v poslední době je výskyt alimentárních onemocnění stále častěji spojován s konzumací fresh-cut produktů. Např. se jednalo o vypuknutí epidemie *Escherichia coli* O157:H7 spojené s čerstvým špenátem ve Spojených státech v roce 2007 nebo salmonely s rajčatovými saláty v roce 2008 také ve Spojených státech. Patogeny mohou být již přítomny na syrové zelenině nebo až jako důsledek kontaminace při zpracování. Kontaminace střevními patogeny jako je *E. coli* nebo salmonela může proběhnout během pěstování, sklizně nebo i dalšího zpracování (Belloso et Soliva, 2011).

Epidemie pocházející z ovoce a zeleniny jsou nyní více vnímány, což souvisí se stále se zvyšující spotřebou fresh-cut zeleniny a ovoce a i s obecným povědomím spotřebitelů o významu ovoce a zeleniny ve výživě. Kvůli globalizaci trhu se nabízí širší škála čerstvých produktů a dostupnost na trhu je po celý rok. Globalizace ale vede k větším dopravním vzdálenostem a časovým úsekům mezi sklizní, zpracováním a spotřebou, proto se hledají nejvhodnější způsoby skladování a dopravních podmínek pro přepravu. Hledají se i vhodné postupy ošetření při zpracování, protože v důsledku odstranění přírodní ochrany (řezáním, krájením, drcením, atd.) se zde vytváří vhodné prostředí pro růst mikroorganismů a možnosti vzájemné kontaminace (Belloso et Soliva, 2011).

Potravinové epidemie z fresh-cut ovoce a zeleniny jsou v Evropě zřídka. Například v roce 2006 bylo hlášeno pro ovoce a zeleninu 72 varovných oznámení, ale většina byla v souvislosti s přítomností mykotoxinů a zbytků pesticidů. Až na třetím místě jsou patogenní mikroorganismy, zejména salmonela. Ve Spojených státech jsou čerstvé produkty v souvislosti s epidemií potravin druhé nejčastější (22 %), po mořských plodech (33 %),

následuje drůbež (18 %), hovězí maso (16 %) a vejce (13 %). Mezi produkty, u kterých nejčastěji propukla potravinová epidemie, patřily saláty, džusy, melouny. Dominantními patogeny ve Spojených státech jsou salmonela a *E. coli* O157:H7. Špenát patří mezi vysoce rizikové produkty, což potvrzuje i epidemie z roku 2006, kdy z čerstvého špenátu nebo produktů obsahující špenát bylo nakaženo celkem 199 osob *E. coli* O157:H7 (Orue et al., 2013). Významný rozdíl v počtu nahlášených případů potravinových epidemií mezi Spojenými státy a Evropou mohou být z několika důvodů. V Evropě byl zahájen sběr informací např. až v roce 2005 (Belloso et Soliva, 2011).

Protože minimálně zpracovaný špenát byl v poslední době spojován s vypuknutím několika onemocnění z potravin, zaměřila se jedna ze studií na působení koliformních bakterií (*E. coli*, *Salmonela*, *Shigella spp* a *Listeria*) na špenát před zpracováním a po něm. Ve studii bylo zkoumáno celkem 1356 vzorků špenátu po dobu 14 měsíců. Podíl vzorků pozitivních na koliformní bakterie se zvýšil z 53 % před minimálním zpracováním na 79 % po minimálním zpracování. Průměrné počty koliformních bakterií se také výrazně zvýšily po minimálním zpracování špenátu (z  $1,16 \pm 0,14$  log KTJ/g na  $2,37 \pm 0,08$  log KTJ/g). *E. coli* byla izolována u 8,9 % vzorků ( $1,81 \pm 0,14$  log KTJ/g) a po zpracování nebyl pozorován žádný rozdíl ve výskytu nebo v počtu KTJ. Výsledky studie ukazují, že komerčně minimálně zpracovaný špenát ošetřený mytím, sušením a dezinfekcí na bázi chlóru nemusí snížit mikrobiální zátěž, jak se očekávalo (Ilic et al., 2008).

Pro zajištění bezpečnosti potravin se uplatňují preventivní hygienická opatření, jako je například systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů (HACCP) v různých fázích dodavatelského řetězce. Zemědělský sektor, potravinářský průmysl a distribuční síť musí navzájem spolupracovat, aby se zlepšila mikrobiologická bezpečnost. Pro ověření bezpečnosti se provádí odběry mikrobiálních vzorků, proto musí být k dispozici kritéria. V potravinářském průmyslu se používají vnitřní firemní kritéria, ale jejich výsledky jsou málokdy zveřejňovány. S vydáním nařízení komise (ES) č. 2073/2005, „o mikrobiologických kritériích pro potraviny“ jsou určena kritéria pro bezpečnost potravin, které zahrnují například *Salmonelu*, *E. coli* nebo *Listerii monocytogenes* (Belloso et Soliva, 2011).

U fresh-cut produktů je nejvyšší prioritou zajištění zdravotní nezávadnosti pro spotřebitele. Tradiční způsoby snížení mikrobiální populace na čerstvém ovoci a zelenině zahrnují chemické i fyzikální ošetření. Čištění povrchu a dezinfekce obvykle zahrnuje použití vody, dezinfekce chemikáliemi a mechanické úpravy povrchu, například čištění kartáčem. Účinnost eliminace mikroorganismů je však závislá na druhu ošetření, druhu a fyziologii

cílového mikroorganismu, na charakteristice povrchu (praskliny, pukliny, textury apod.), na teplotě, na délce a koncentraci dezinfekce (Belloso et Soliva, 2011). V současnosti ale neexistuje 100 % účinná desinfekční metoda, která by eliminovala všechny patogeny.

Správné mytí fresh-cut ovoce a zeleniny okamžitě po rozřezání je jedním z nejdůležitějších kroků při zpracování produktů. Mytím se odstraňují nečistoty, rezidua pesticidů a mikroorganismy odpovědné za ztrátu kvality. Mytí je založeno na dopravě produktů pod vodou, přes proud tlakové vody a případně vodní nádrže s obsahem desinfekčního činidla. Nevýhodou je, že případné patogeny mohou ve vodě nebo v rostlinné tkáni přežít relativně dlouho a mohou kontaminovat čistý produkt. Velké provozní náklady vedou k recyklaci oplachové vody, což ovlivňuje účinnost mytí, jak již bylo zmíněno. Obecně lze říci, že není cílem odstranit co nejvíce mikroorganismů, ale spíše zajistit, aby přítomné mikroorganismy nevytvářely nebezpečí pro lidské zdraví a v případě, že by byly nechtěně škodlivé organismy přítomny, aby se nevytvářely podmínky k jejich růstu (Belloso et Soliva, 2011).

Technologická voda může být kontaminována, proto se ošetřuje dezinfekcí, aby se zničily patogenní bakterie, plísně, viry nebo jiné mikroorganismy. Cílem dezinfekce je zabránění přenosu mikroorganismů z užitkové vody do výroby a z kontaminovaného produktu na jiné produkty. Běžná komerční dezinfekce je efektivní při odstraňování mikroorganismů na povrchu produktu nebo volně plovoucích ve vodě. Ovšem k mikroorganismům přítomným v zákoutích produktů nemusí dezinfekce proniknout (Belloso et Soliva, 2011).

Z chemických dezinfekcí se nejčastěji využívají prostředky na bázi chlóru, jejich účinnost se výrazně snižuje, pokud v promývací vodě jsou organické zbytky nebo pokud chlor na produkty nepůsobí dostatečně dlouhou dobu. Koncentrace chloru a pH promývací vody musí být kontrolována. Jiné chemické dezinfekce, které se využívají u vhodných produktů, jsou na bázi organických kyselin, s obsahem fenolických sloučenin, tento produkt je například Citrox ® nebo Purac ®. Nevýhodou těchto prostředků je, že nejsou účinné při snižování populace *E. coli*. Dalšími využívanými chemickými dezinfekcemi jsou kyselina peroxyoctová, různé prostředky, které obsahují hydroxid sodný, hydroxid draselný, hydrogenuhličitan sodný nebo ozón (Belloso et Soliva, 2011).

Využívanou alternativou k chemickým látkám pro dezinfekci recyklované nebo recirkulační vody je fyzikální ošetření, jako je ultrafialové (UV) záření. Antimikrobiální

účinek je závislý na dávce UV energie. UV světelné systémy nezanechávají žádná chemická rezidua a nejsou ovlivněny chemií vody, ale jejich účinnost snižuje zakalená voda. Další fyzikální technologie jako pulzní elektrické pole, pulzní záření, oscilující magnetické pole, ošetření ultrazvukem nebo využití vysokého tlaku, jsou stále zkoumány (Belloso et Soliva, 2011).

V praxi se využívají i kombinované metody, kde se používá dvou a více konzervačních technologií pro zabránění růstu mikroorganismů v potravinách. Očekává se, že kombinace dezinfekční a dalších intervenčních metod, jako je teplo nebo záření, bude mít aditivní, synergickou nebo antagonistickou vzájemnou interakci. Například kombinace chloru s ozonem může mít příznivý vliv na prodloužení trvanlivosti a kvality salátu (Belloso et Soliva, 2011).

Nejpoužívanější jsou dezinfekce na bázi chlóru, jejichž přednostmi je nízká cena a snadnost použití. Nedostatkem je, že vysoká koncentrace chloru může mít negativní dopad na sensorické vlastnosti, lidské zdraví a životní prostředí (Belloso et Soliva, 2011). Novou metodou, která by se mohla stát vhodnou alternativou při ošetření minimálně zpracovaného ovoce a zeleniny, je ošetření silicemi. Jedna ze studií byla zaměřena na použití silic k inhibici bakterií na zelenině. Použité silice (karvakrol, tymol, eugenol, kyselina skořicová) byly zkoumány diskovou difúzní metodou z hlediska jejich samotného i kombinovaného účinku proti 15 typům bakterií způsobující kažení. Karvakrol, tymol a eugenol prokázaly silné inhibiční účinky a jejich průměrná MIC byla 167, 648 a 168  $\mu\text{g/ml}$ . Při kombinovaném účinku (karvakrolu + tymolu, karvakrolu + eugenolu, tymolu + eugenolu a karvakrolu + tymolu + eugenolu) byla vykázána vyšší antibakteriální účinnost s průměrnými hodnotami MIC 47, 43, 59 a 42  $\mu\text{g/ml}$ , ale nejsilnější antibakteriální účinnost vykázály kombinace karvakrolu + tymolu a karvakrolu + tymolu + eugenolu. Tyto výsledky naznačují potenciál pro využití silic k ošetření čerstvých surovin (Zheng, 2013).<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Konzervační látky obsahující silice jsou již dostupné. "DMC Base Natural" je potravinový konzervant, vyrobený společností DOMCA S.A., Alhendí'n, Granada, Španělsko, který se skládá z 50 % ze silic (z rozmarýnu, šalvěže a citrusů) a z 50 % z glycerolu (Mendoza-Yepes et al., 1997). "Protecta One" a "Protecta Two" jsou směsi bylinných extraktů vyrobených v Bavaria Corp. Apopka, FL, USA a jsou považované za bezpečné potravinové přídatné látky v USA. Ačkoli přesný obsah bylinných extraktů není od výrobce deklarován, extrakty pravděpodobně obsahují jednu nebo více silic, které jsou rozptýleny v roztoku citrátu sodného a chloridu sodného (Cutter, 2000).

### **3.5 *Escherichia coli***

*E. coli* je dnes jednou z nejvíce prozkoumaných bakterií, byla objevena německým bakteriologem Theodorem Escherichem v roce 1885. *E. coli* patří mezi gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinkovité bakterie, které netvoří spóry. Tato bakterie patří ke střevní mikroflóře člověka a dalších teplokrevných živočichů. Protože dokáže přežít ve vodě, je *E. coli* indikátorem fekální kontaminace a možné přítomnosti dalších střevních patogenů ve vodních zdrojích. Většinou je to neškodný komenzál, který ale za určitých okolností může způsobit vážná onemocnění. Pokud se dostanou patogenní kmeny do trávicího traktu, způsobují průjemy. V případě, že se dostanou mimo trávicí trakt, mají za následek např. infekci močových cest. Rozlišujeme čtyři hlavní kategorie enteropatogenních *E. coli*: Enterotoxigenní (ETEC), Enteroinvazivní (EIEC), Enteropatogenní (EPEC), Enterohemoragické (EHEC) (Adams et Moss, 2008).

#### **Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC)**

Nemoc způsobená ETEC se obvykle projeví po 12 až 36 hodinách po požití patogenu. Příznaky mohou být v rozsahu od mírných afébrilních průjmů až po nemoc připomínající cholera, která je doprovázena vodnatou stolicí bez krve, bolestmi žaludku a zvracením. Onemocnění obvykle trvá 2-3 dny, v rozvojových zemích je častou příčinou dětských průjmů, při kterých může dojít k vážné dehydrataci. ETEC produkuje dva typy enterotoxinů, termolabilní (TL), které jsou inaktivovány při teplotě 60 °C po 30 min, a termostabilní (TS), které odolávají zahřátí až na 100 °C po dobu 15 minut a jsou odolné proti kyselinám (Adams et Moss, 2008).

#### **Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC)**

Infekce EIEC připomíná klasické příznaky bakteriální dysenterie, jejímž původcem je *Shigella*. Podobně jako *Shigella*, EIEC napadá epiteliální buňky tlustého střeva, kde způsobuje vředy a záněty, i když EIEC kmeny neprodukují Shiga toxin. Klinickými příznaky jsou horečka, závažné bolesti břicha, nevolnost a často vodnatý průjem, který přechází v průjem s krví, hlenem a leukocyty. Infekční dávka EIEC se zdá být výrazně vyšší než v případě *Shigelly* (Adams et Moss, 2008).



### **Enteropatogenní (EPEC)**

Příznaky EPEC infekce jsou nevolnost, zvracení a průjem obsahující hlen a objeví se 12 až 36 hodin po požití infekční dávky. U dětí je nemoc vážnější a v některých případech může přetrvávat po dobu delší než dva týdny. Patogeneze souvisí se schopností EPEC kmenů přilnout k enterocytům a vytvářet léze, které mohou vést až k deformaci a ztrátě některých mikrokloků; tím narušením rovnováhy mezi vstřebáváním a vylučováním v tenkém střevě (Adams et Moss, 2008).

### **Enterohemoragické (EHEC)**

Enterohemoragický kmen *E. coli*, známý i jako verotoxin-produkující *E. coli* (VTEC), byl poprvé popsán v Kanadě. Nejběžnějším sérotypem EHEC *E. coli* je O157: H7. EHEC může způsobovat od nekrvavých průjmů přes hemoragické kolitidy až život ohrožující hemolyticko-uremický syndrom (HUS) a trombotickou trombocytopenickou purpuru (TTP) (Adams et Moss, 2008).

Hemoragická kolitida je akutní onemocnění, doprovázené krvavými průjmy trvající 4-0 dní. Příznaky začínají žaludečními křečemi a vodnatými průjmy trvající 1-2 dny (někdy 3-8 dnů) po pozření kontaminovaného jídla a za 1 až 2 dny následují krvavé průjmy se silnou bolestí břicha bez horečky a leukocytů ve stolici. Postihuje především dospělé, hlavně v letních měsících, a u starších pacientů může vést ke smrti (Adams et Moss, 2008).

Hemolyticko-uremický syndrom charakterizují následující tři příznaky: akutní selhání ledvin, hemolytická anémie (snížení počtu červených krvinek) a trombocytopenie (pokles počtu krevních destiček). Nejčastěji se vyskytuje mezi dětmi, u kterých je hlavní příčinou akutního ledvinového selhání. Například v západní Evropě a Severní Americe přibližně u 10 % dětí nakažených *E. coli* O157 může infekce přejít na HUS. Polovina z těchto dětí bude vyžadovat dialýzu ledvin a úmrtnost se pohybuje mezi 3-5 % (Adams et Moss, 2008).

Trombotická trombocytopenická purpura je méně častou komplikací, která se vyskytuje zejména u dospělé populace. TTP souvisí s HUS, příznaky jsou poškození ledvin, horečka a neurologická symptomatologie (Adams et Moss, 2008).

Na propuknutí nemoci způsobené EPEC, EIEC a ETEC se nejčastěji podílí fekální kontaminace vodních zdrojů a potravin. Zdrojem nákazy EHEC sérotypu O157:H7 je většinou nedostatečně tepelně upravené mleté maso a někdy syrové mléko. *E. coli* většinou nepřežívá ve fermentovaných mléčných výrobcích s pH nižším než 5, ale může růst v plísňových sýrech, kde dojde k lokálnímu zvýšení pH (Adams et Moss, 2008).

Po celém světě bylo velké množství epidemií způsobené *E. coli* a jejich dopad byl často dramatický. V roce 1993 ve Spojených státech onemocnělo šest set lidí, z toho čtyři děti zemřely. Nákazu způsobilo nedostatečně tepelně upravené hovězí maso v hamburgerech. Při velkých epidemiích ve Skotsku v roce 1996 nákaza zasáhla téměř 500 lidí, 20 starších pacientů v důsledku nákazy zemřelo. Příčinou epidemie byla křížová kontaminace vařených mas od syrového masa v řeznictví. Mezi nedostatky které vedly k těmto epidemiím, byly většinou jednoduché porušení správné hygienické praxe (GHP), avšak primární příčinou bylo nedostatečné tepelné opracování. (Adams et Moss, 2008).

Nákazy EHEC jsou hlášeny i u jiných potravin, jako jsou například saláty nebo nepasterizovaná jablečná šťáva, která byla nositelem nákazy ve velké epidemii ve Spojených státech. V Japonsku v roce 1996 se nakazilo 5700 lidí kontaminovanými ředkvičkami a klíčky. EHEC mají výraznější schopnost přežít při nízkých hodnotách pH, což může odpovídat relativně nízkým infekčním dávkám (2 až 2000 buněk), zaznamenané v ohniscích nákazy (Adams et Moss, 2008).

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Rostlinný materiál

#### 4.1.1 *Monarda media*

Sklizeň květu a cca 30 cm stonku rostliny *Monarda media* Willd. proběhla 9. 7. 2013 na experimentálním pozemku ČZU v Praze-Suchdole z trvalých porostů, které byly založeny již v minulých letech. Hmotnost odebraných čerstvých rostlin činila 1380 g. Celková hmotnost sušených rostlin byla 386 g a z tohoto množství se získalo 4,16 g silice. Výtěžnost silice ze sušeného materiálu dosahovala 1,08 %.

Obrázek 3: Sušení rostliny *Monarda media* v laboratoři chemie



Obrázek 4: Sušené rostliny připravené k destilaci



#### 4.1.2 *Satureja hortensis*

Odběr rostlinného materiálu proběhl 28. 8. 2013 v Uhříněvsi z polních pokusů. Hmotnost sušeného materiálu činila 6,71 kg. Na katedře rostlinné výroby se destilací získalo 27,79 g silice, výtěžnost silice ze sušeného materiálu tedy dosahovala 0,41 %.

#### 4.2 Destilace silice *Monarda media*

K destilaci silice byl použit destilační přístroj ALBRIGI LUIGI S.R.L. Nejprve do kotle byla nalita voda (pod dolní okraj spodní mřížky). Na mřížku byly rovnoměrně rozloženy sušené rostliny, v našem případě *Monarda media* Willd. Sušené rostliny byly zakryty horní mřížkou a kotel byl uzavřen víkem, ke kterému byla upevněna nerezová kolona a chladič a dále skleněný chladič pro jímání silice. Voda v kotli byla přivedena k varu pomocí plynového hořáku, silice byla unášena parami a v chladiči zkondenzovala zpět do kapalného stavu. Silice mají nižší hustotu a jsou viskózní, proto plavaly na hladině vody a mohly být snadno odděleny.

Obrázek 5: Destilační přístroj ALBRIGI LUIGI S.R.L



### 4.3 Analýza silice *Monarda media* plynovou chromatografií

Pro analýzu vzorků byl použit plynový chromatograf Varian 3300 vybavený kapilární křemennou kolonou DB-5 (30 m x 0,25 mm i.d., tloušťka filmu 0,25 µm) s plamenovým ionizačním detektorem. Jako nosný plyn byl použit dusík s průtokem cca 1 ml/min, vstupní tlak 140 kPa (20 psi), splitovací poměr cca 1:15, objem nastříkovaného vzorku 1 µl. Ředění vzorku před analýzou: 20 µl silice bylo rozpuštěno v 1 ml hexanu GC.

Podmínky analýzy: teplota injektoru a detektoru 280 °C, počáteční teplota kolony 60 °C po dobu dvou minut, nárůst teploty 8 °C/min, horní isoterma 260 °C po dobu 8 minut (celková doba analýzy 35 min). Sloučeniny byly identifikovány na základě porovnání retenčních časů analyzovaných sloučenin s retenčními časy standardů a kvantifikovány metodou vnitřní normalizace na základě procentuálního zastoupení naměřených ploch jednotlivých píků. Vzorek byl analyzován ve dvou po sobě následujících měřeních.

### 4.4 Metodika testování antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální aktivita silice *Monarda media* Willd. a *Satureja horstensis* L. byla testována na špenátových listech, které byly zakoupeny v maloobchodních řetězcích. Na list špenátu bylo ve flow boxu nakapáno a následně rozetřeno 10 µl inokula *E. coli* ATCC 25922 o koncentraci  $10^7$  KTJ/g (výsledná koncentrace  $10^5$  KTJ/g). Nanesené inokulum na listu špenátu se nechalo zaschnout. Na dno sterilního exsikátoru byl vložen filtrační papír s odměřeným množstvím silice (128 µl/l, 64 µl/l, 32 µl/l, 16 µl/l nebo 8 µl/l vzduchu), na který bylo položeno míchátko. Následně byl nad filtrační papír umístěn kruh se sterilní gázou, na kterou byly položeny inokulované listy špenátu (zaočkovanou stranou dolů). Exsikátory byly hermeticky uzavřeny, v jednom byl zachován atmosférický tlak a u druhého byl vytvořen podtlak. Celková doba ošetření silicí trvala 60 minut a poté byly listy z exsikátoru vyjmuty. Exsikátory byly po dobu prvních 5 minut umístěny na ploténku, která byla vyhřátá na teplotu 80 °C a pomocí magnetického míchátko byla vytvořena cirkulace vzduchu zajišťující lepší odpařování silice. Po zbývající dobu probíhalo ošetření za laboratorní teploty. Počty přeživší *E. coli* a celkový počet mikroorganismů (CPM) byl vyhodnocován po 24 hodinách a čtvrtý den po ošetření silicí kvantitativně pomocí standardní kultivační deskové metody. Jako selektivní médium byl použit MacConkey agar (Oxoid CZ, s.r.o.).

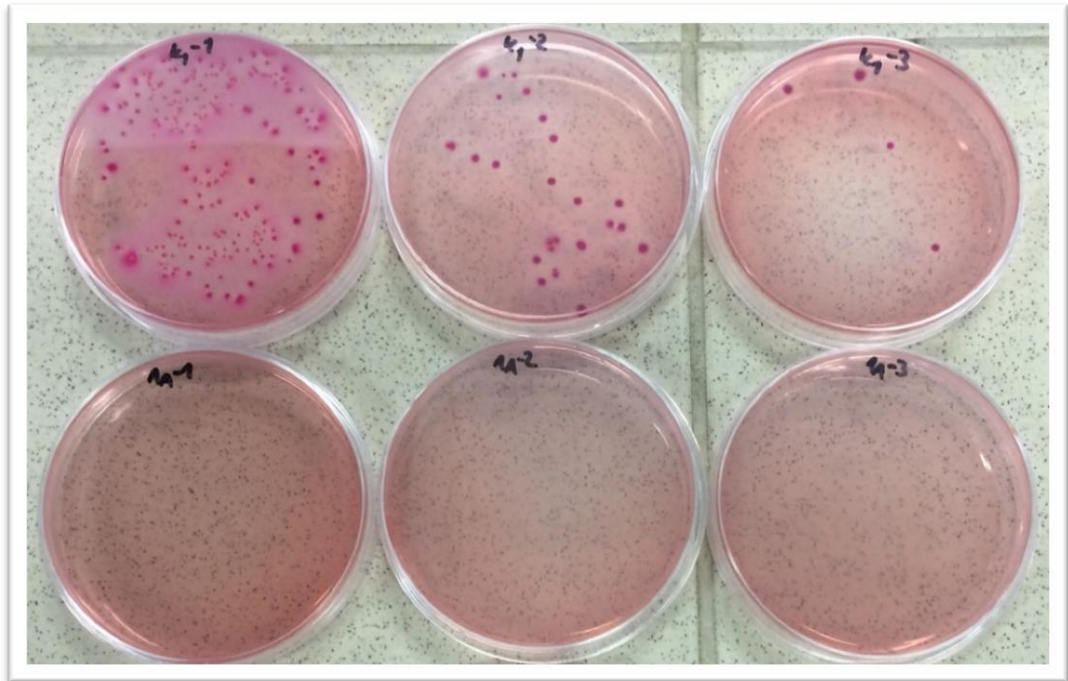
Obrázek 6: Ošetření špenátových listů silicí v exsikátoru.



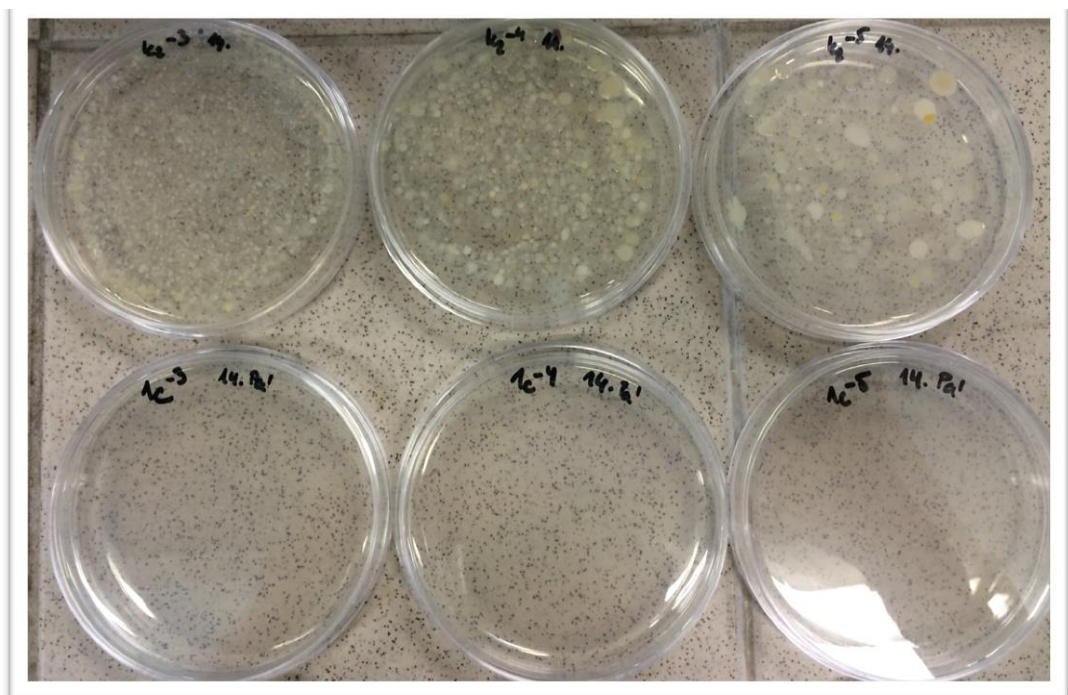
#### 4.4.1 Desková kultivační metoda

Po uplynutí doby ošetření byl každý list špenátu vložen do sterilní Erlenmayerovy baňky a zvážen. Polovina listů (4 +1 kontrola) byla umístěna do chladicího boxu na 3 dny. Ke druhé polovině listů byl přidán fyziologický roztok s přísadkou Tween 80 v devíti násobném množství hmotnosti jednotlivého listu špenátu (tím se získalo ředění o koncentraci  $10^{-1}$ ). Vzorek byl následně třepán po dobu 10 minut na třepačce při nejvyšší frekvenci třepání. Ze vzniklého vzorku byl odebrán 1 ml tekutiny a do zkumavek byla pro každý list připravena ředící řada od  $10^{-2}$  do  $10^{-5}$ . *E. coli* byla stanovena na MacConkey agaru, po inkubaci zaočkovaných Petriho misek při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Celkový počet mikroorganismů byl stanovován na plate count agaru (PCA, Oxoid, Brno), po inkubaci inokulovaných ploten v tmavém boxu po dobu 3 dnů při 27 °C. Na Petriho misky bylo naneseno 100  $\mu$ l od každého ředění (od  $10^{-3}$  do  $10^{-1}$ ), vždy ve dvou opakováních.

Obrázek 7: Vyhodnocení *E. coli* (vyhodnocení bezprostředně po ošetření, K=kontrola, 1=podtlak)



Obrázek 8: Vyhodnocení CMP (vyhodnocení 4. den, K=kontrola, 1=podtlak)



## 5. Výsledky

### 5.1 Analýza chemického složení silice *Monarda media*

Tabulka 2: Složení silice *Monarda media*

číslo složky	ret.čas (min)	složka silice	průměrné zastoupení složky v silici (%)
1	4,73	$\alpha$ -thujen	1,90
2	5,69	1-okten-3-ol	2,90
3	5,91	$\beta$ -pinen	1,41
4	6,45	$\alpha$ -terpinen	3,68
5	6,63	p-cymen	15,78
6	7,29	$\gamma$ -terpinen	6,85
7	10,90	karvakrol methylether	1,88
8	11,08	thymochinon	2,34
9	11,93	tymol	43,33
10	12,07	karvakrol	12,31
11	15,21	germakren D	1,81
<b>suma</b>			<b>94,15</b>

Pomocí plynové chromatografie bylo analyzováno složení silice *Monarda media* metodou vnitřní normalizace (tab. 2). V tabulce jsou uvedeny složky, jejichž zastoupení v silici činí více než 1 %. Z naměřených údajů vyplývá, že hlavní složky testované silice tvoří tymol (43,3 %), p-cymen (15,8 %) a karvakrol (12,3 %).

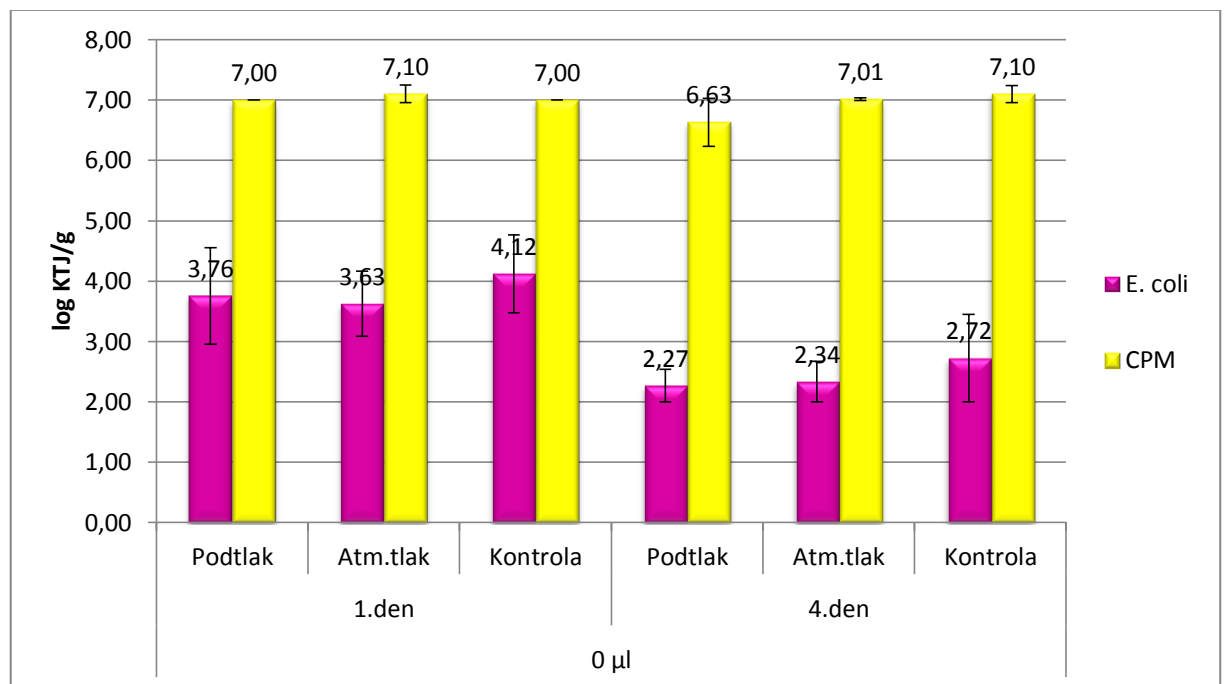


## 5.2 Výsledky antimikrobiální aktivity silice

V následujících podkapitolách uvedu výsledky antimikrobiální aktivity silice satirejky a zavinutky proti patogenní bakterii *E. coli*. Pro větší přehlednost jsou hodnoty uvedeny v následujících grafech. Všechny hodnoty v grafech jsou v log KTJ/g. Minimální uvedená hodnota 2 log KTJ/g značí detekční limit metody (100 bakterií). Hodnota 7 log KTJ/g je uvedena v případě, že počet mikroorganismů na špenátu nebylo možné přesně určit, avšak jejich počet byl vyšší jak  $10^7$  KTJ/g. Použitá zkratka CPM značí celkový počet mikroorganismů.

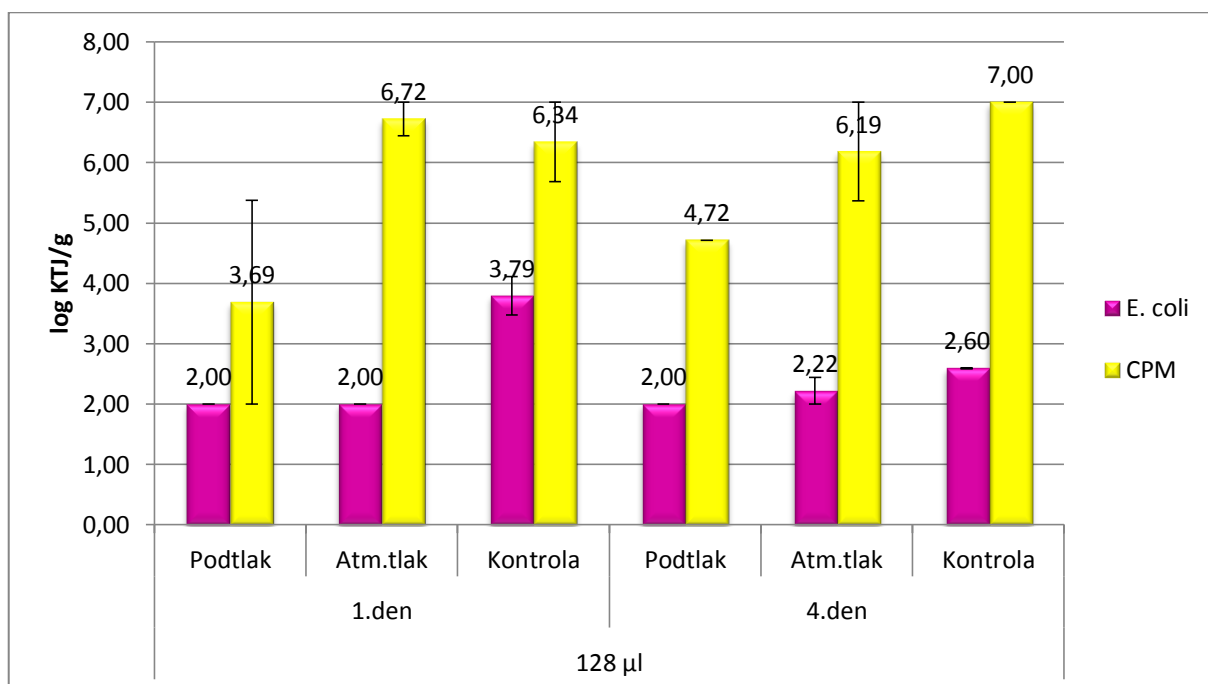
### 5.2.1 Antimikrobiální aktivita silice satirejky

Graf 1: Vyhodnocení počtu *E. coli* a CPM bez ošetření silicí (koncentrace silice: 0  $\mu$ l/l)



Z grafu 1 je patrné, že samotný tlak neměl vliv na snížení počtu *E. coli* a CPM, proto byl v rámci pokusů zkoumán inhibiční účinek silice za podtlaku nebo atmosférického tlaku na inokulovaných listech špenátu. Bezprostředně po vyhodnocení se množství *E. coli* pohybovalo v rozmezí: 3,76 log KTJ/g v podtlaku, 3,63 log KTJ/g v atmosférickém tlaku a 4,12 log KTJ/g u kontroly. Po 4 dnech byl zaznamenán pokles kolonií *E. coli*, který byl pravděpodobně způsoben teplotou v chladícím boxu. CMP dosahoval ve všech případech zhruba 7,00 log KTJ/g.

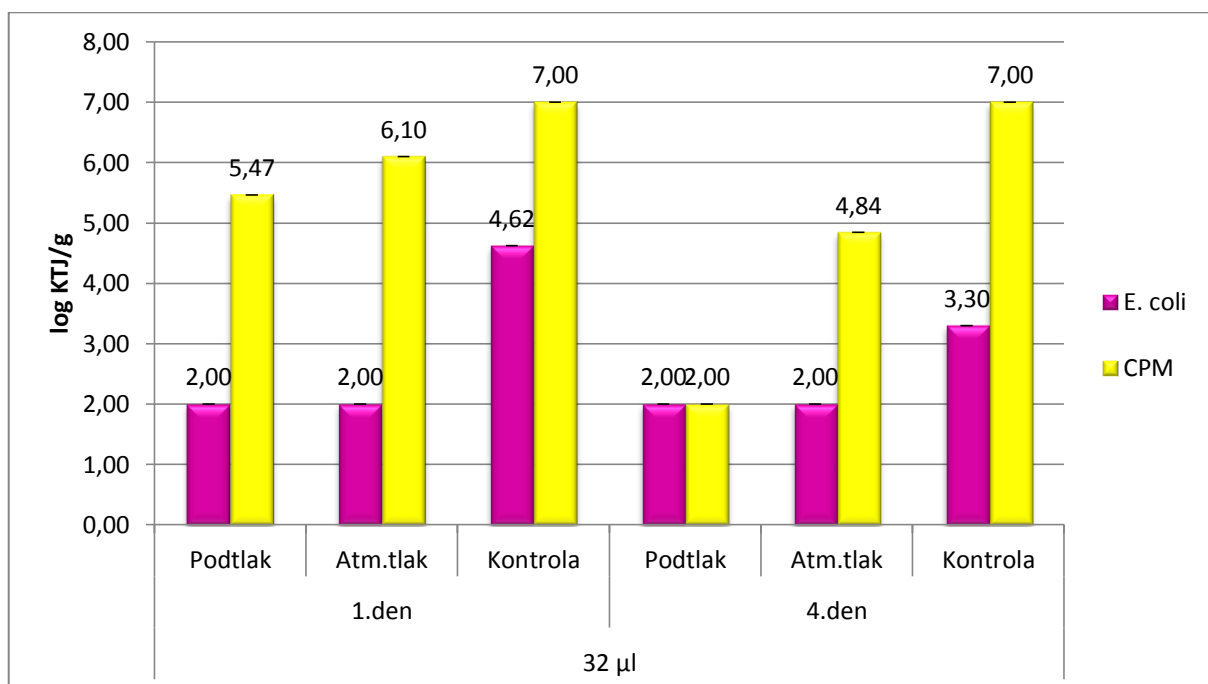
Graf 2: Vyhodnocení počtu *E. coli* a CPM při koncentraci silice satirejky 128 µl/l.



V grafu 2 jsou uvedeny výsledky z nejvyšší použité koncentrace 128 µl/l. Bezprostředně po vyhodnocení byl zaznamenán pokles počtu *E. coli* v podtlaku i v atmosférickém tlaku o 1,79 log KTJ/g oproti kontrole. Nejúčinnější metodou pro inhibici CPM bylo ošetření v podtlaku, kde došlo po prvním dnu ke snížení o 2,65 log KTJ/g a po 4 dnech o 2,28 log KTJ/g oproti neošetřené kontrole. V atmosférickém tlaku nedošlo k významné inhibici CPM.

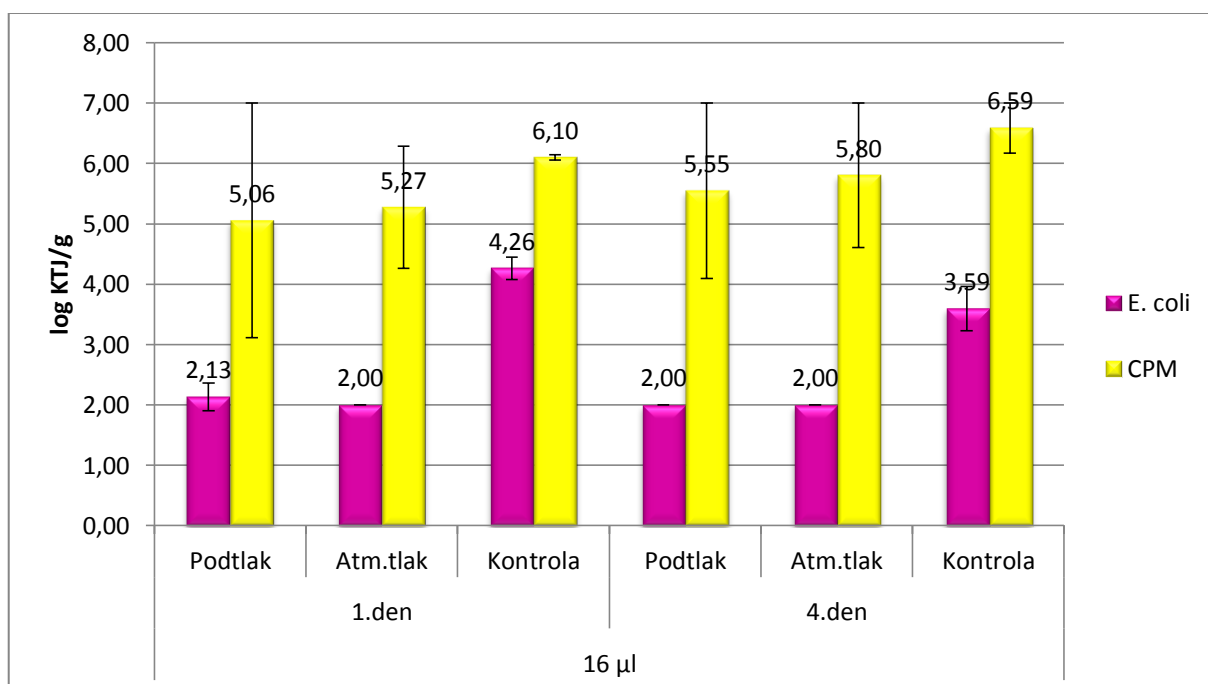
Koncentrace silice satirejky 64 µl/l byla prováděna najednou s koncentrací 32 µl/l a protože i při nižší koncentraci byla pozorována úplná inhibice, tak se upustilo od opakování koncentrace 64 µl/l. Proto zde nejsou uvedeny výsledky počtu *E. coli* a CPM při koncentraci silice satirejky 64 µl/l.

Graf 3: Vyhodnocení počtu *E. coli* a CPM při koncentraci silice saturejky 32 µl/l.



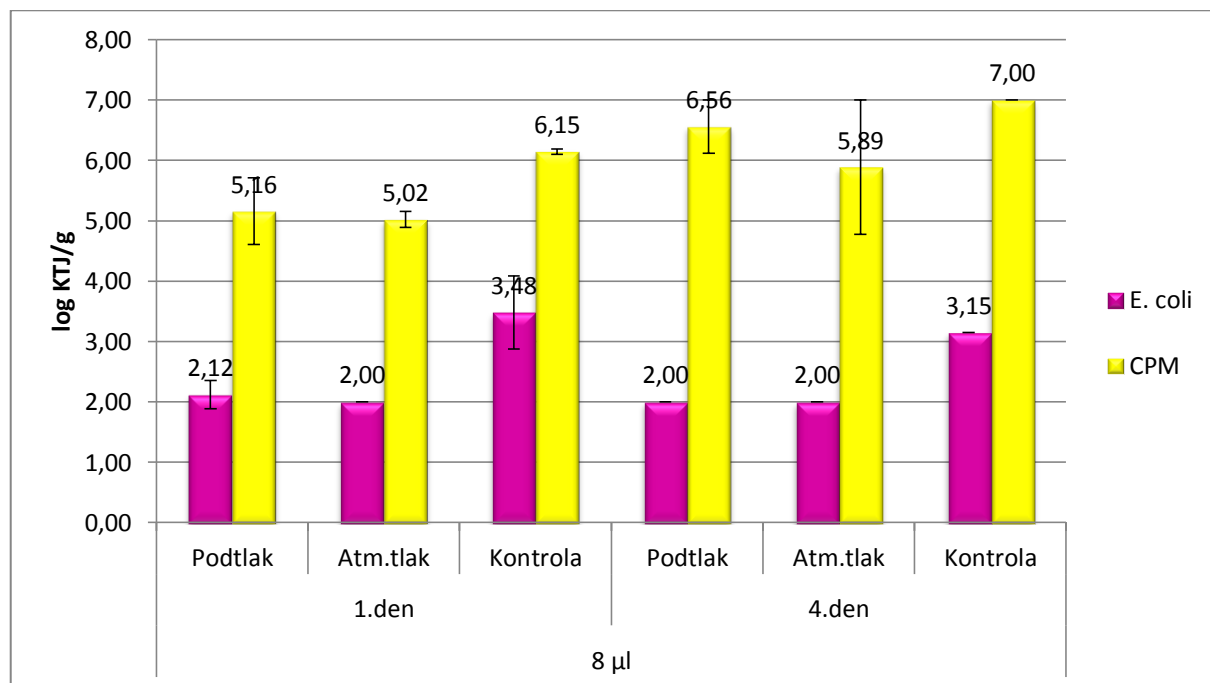
V grafu 3 je uvedena koncentrace silice saturejky 32 µl/l, při které došlo k inhibici počtu *E. coli* bez rozdílu vlivu tlaku v obou vyhodnoceních. V podtlaku došlo k výraznější inhibici CPM než v atmosférickém tlaku a navíc ve vyhodnocení po 4 dnech bylo pozorováno snížení CPM až na mez detekce.

Graf 4: Vyhodnocení počtu *E. coli* a CPM při koncentraci silice saturejky 16 µl/l.



Při koncentraci 16  $\mu\text{l/l}$  došlo opět k výrazné inhibici počtu *E. coli*, např. po bezprostředním vyhodnocení o 2,26 log KTJ/g. V obou případech byl zjištěn pokles CMP téměř o jeden řád oproti kontrole. Vliv podtlaku na CPM nebyl v této koncentraci zaznamenán.

Graf 5: Vyhodnocení počtu *E. coli* a CPM při koncentraci silice satirejky 8  $\mu\text{l/l}$ .

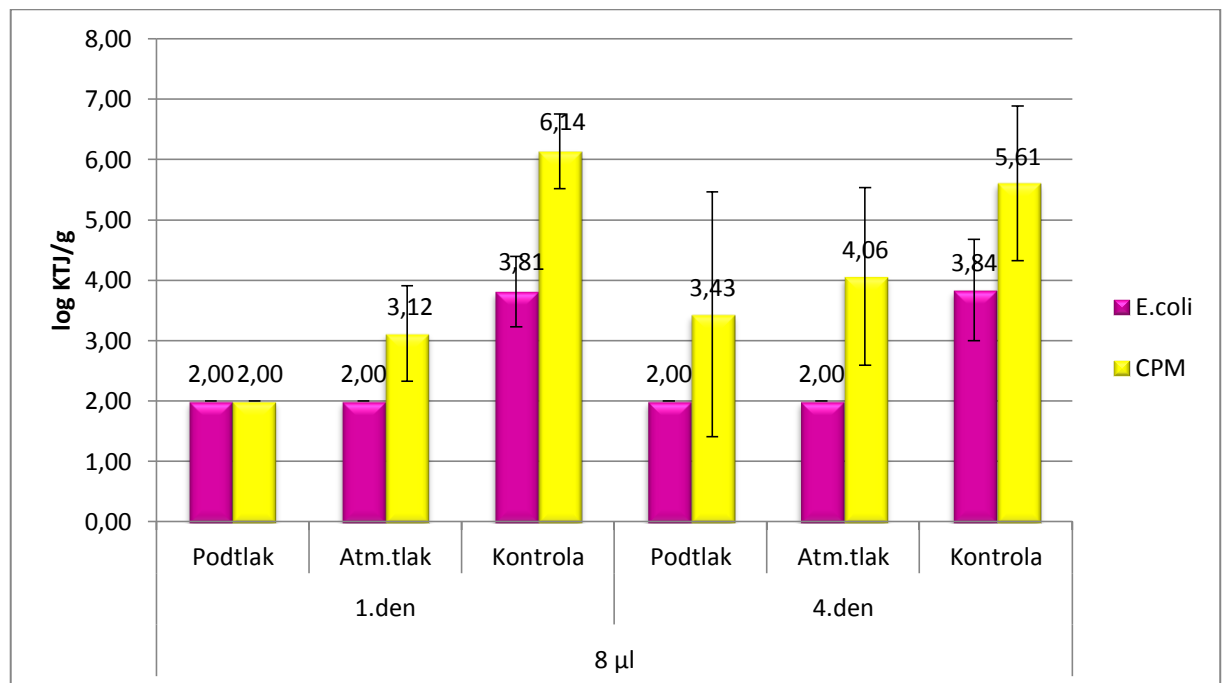


Počty *E. coli* byly i při koncentraci 8  $\mu\text{l/l}$  inhibovány a u této koncentrace bylo zároveň zjištěno, že je minimální inhibiční koncentrace. Pokles CPM byl podobný jako u předchozí koncentrace.

## 5.2.2 Antimikrobiální aktivita silice zavinutky

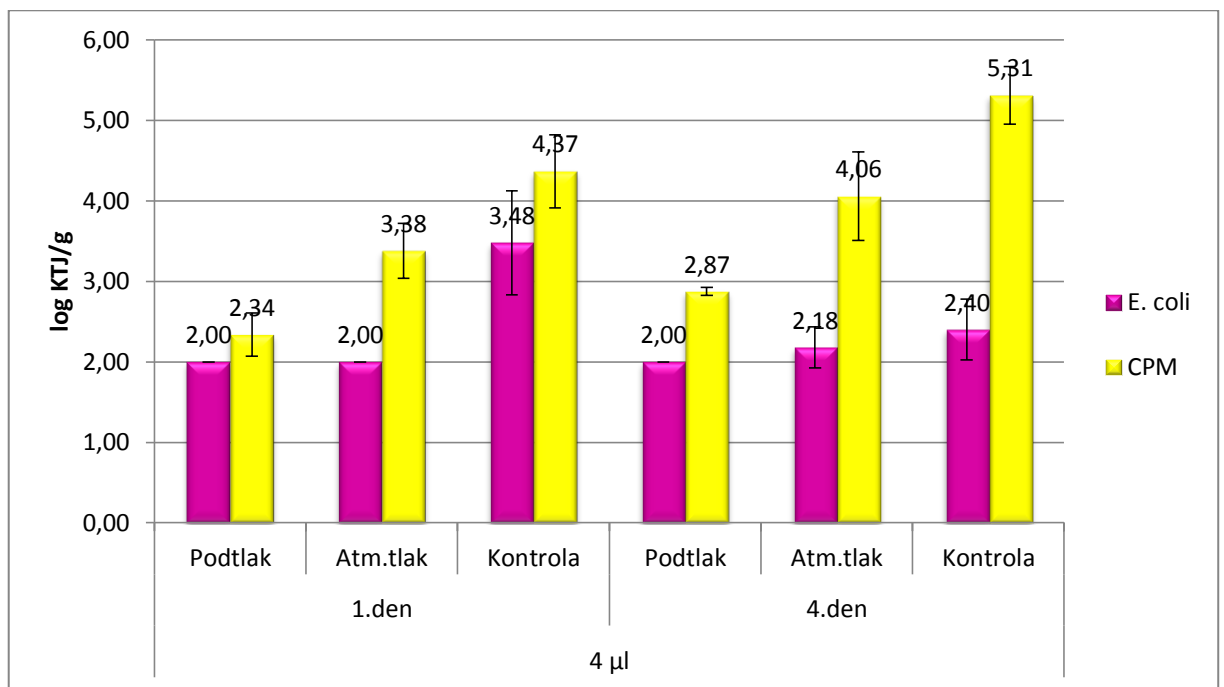
V návaznosti na stanovenou MIC saturejky se antimikrobiální aktivita silice zavinutky testovala od koncentrace 8  $\mu$ l/l. Výsledky jsou uvedeny v následujících grafech č. 6 a 7.

Graf 6: Vyhodnocení počtu *E. coli* a CPM při koncentraci silice zavinutky 8  $\mu$ l/l.



Při této koncentraci došlo k inhibici *E. coli* až na mez detekce a zároveň byly potvrzeny výborné antimikrobiální účinky silice zavinutky výrazným snížením CPM. Především byla účinná metoda ošetření v podtlaku, např. po bezprostředním vyhodnocení byl pokles CPM až na mez detekce (snížení o 4,14 log KTJ/g).

Graf 7: Vyhodnocení počtu *E. coli* a CPM při koncentraci silice zavinutky 4 µl/l.



Uvedená koncentrace silice zavinutky 4 µl/l byla zjištěna jako minimální inhibiční koncentrace na *E. coli*. Tato koncentrace měla výrazný vliv i na snížení CPM a to zejména v podtlaku.

## 6. Diskuze

Z testovaných silic dosahovala silice zavinutky lepší antimikrobiální účinnosti, což je zřejmé ze zjištěných MIC. Např. po bezprostředním vyhodnocení (tj. v den ošetření) bylo pozorováno snížení u silice saturejky při MIC 8  $\mu\text{l/l}$  o 1,48 log KTJ/g a stejného snížení bylo dosaženo i při MIC 4  $\mu\text{l/l}$  silice zavinutky. Navíc silice zavinutky účinněji redukovala CPM oproti silici saturejky a to zejména v podtlaku, kde byl zjištěn pokles o 2 řády. Nepříliš známá rostlina *Monarda media* nabízí díky svým zjištěným antimikrobiálním vlastnostem potenciální využití v potravinářství, ale měla by se otestovat její sensorická přijatelnost. Domnívám se, že organoleptické vlastnosti by nemusely být výrazně ovlivněny díky nízké účinné koncentraci silice zavinutky.

Vyšší antimikrobiální aktivita silice monardy oproti silici saturejky může být způsobena odlišným chemickým složením. V silici *M. media* se vyskytují navíc některé účinné složky, např. tymochinon (2,3 %), jehož biologické účinky byly zkoumány v mnoha souvislostech. Např. Mouhajir et al. (1999) stanovili v rostlině *Nigella sativa* L. vysoký obsah thymochinonu. Antimikrobiální účinky extraktu ze semen této rostliny prokázaly účinnost proti *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium phlei* a *Staphylococcus aureus*. Je pravděpodobné, že i relativně malé množství tymochinonu může mít vliv na antimikrobiální aktivitu, neboť i z mnoha studií vyplývá, že minoritní složky mají rozhodující úlohu v antibakteriální aktivitě (Burt, 2004).

Silice saturejky zcela inhibovala nárůst *E. coli* v koncentraci od 128  $\mu\text{l/l}$  do 8  $\mu\text{l/l}$ , inhibice *E. coli* se oproti kontrole pohybovala od 1,48 do 2,62 log KTJ/g. Na CPM měla vliv především koncentrace 128  $\mu\text{l/l}$  za podtlaku, při které došlo ke snížení o 2,65 log KTJ/g. Podobného snížení *E. coli* (o 1,8 log KTJ/g) dosáhl Orue et al. (2013) s etanolvým extraktem z oregana o minimální baktericidní koncentraci (MBC) 5,3 mg/ml, což je 663 krát vyšší koncentrace než MIC 8  $\mu\text{l/l}$  saturejky. Canillac a Mourey (2001) definují minimální baktericidní koncentraci jako koncentraci, při které je zabito minimálně 99,9 % z počátečního inokula. Na základě výsledků se domnívám, že silice mohou dosáhnout stejných antimikrobiálních účinků jako rostlinné extrakty, avšak s podstatně nižší koncentrací účinné látky. Čehož by se dalo využít v potravinářském průmyslu z hlediska ekonomické výhodnosti a výrazně menšímu ovlivnění organoleptických vlastností produktu.

Podobný výzkum provedli i Azizkhania et al. (2013), kteří zkoumali účinek silic oregana, hřebíčku a zatarii proti *E. coli* O157:H7 naočkovaných na mladém špenátu po

5 dnech skladování při 7 °C. Nejsilnější antimikrobiální aktivitu prokázala silice zatarii o koncentraci 3,2 µl/g špenátu, která snížila množství *E. coli* o 3,5 log KTJ/g. Silnou antimikrobiální aktivitu měla i silice hřebíčku o stejné koncentraci (snížení o 2,5 log KTJ/g), naopak nejnižší aktivitu dosáhla silice oregana (koncentrace 3,2 µl/g), pouze 0,5 log KTJ/g. Pro srovnání silice satirejky při koncentraci 32 µl/l inhibovala množství *E. coli* o 2,62 log KTJ/g a o 1,48 log KTJ/g při MIC satirejky 8 µl/l, což je 400 krát nižší koncentrace silice. Takto významné rozdíly v MIC účinné látky mohou být nejspíš způsobeny rozdílnou metodou ošetření listů špenátu. Metoda ošetření v plynné fázi silice se jeví jako velice účinná, zřejmě díky přirozené vlastnosti silic, což je těkavost, která byla navíc umocněna zahřátím exsikátoru a cirkulací vzduchu.

Antimikrobiální účinnost silic je ovlivněna nejen koncentrací, ale i fyzikálními faktory jako jsou teplota nebo tlak. Např. čtvrtý den po ošetření byl u kontroly pozorován pokles množství *E. coli*, což bylo pravděpodobně způsobeno teplotou skladování. Buchanan (1997) zjistil, že minimální teplota pro růst *E. coli* O157: H7 je přibližně 8 až 10 °C. Vlivem teploty se zabývali Luo et al. (2009), kteří se ve své studii zaměřili na vliv teploty a doby skladování na přežití a růst počtu *E. coli* O157: H7 a změnu v kvalitě baleného mladého špenátu. Balený špenát byl skladován při teplotě 1, 5, 8, a 12 °C po dobu 12 dnů. Množství *E. coli* na špenátu významně rostlo při teplotě 12 °C během prvních 3 dnů (cca o 1,0 log KTJ /g). Významný nárůst počtu *E. coli* byl zaznamenán i při teplotě 8 °C. U špenátu uloženého při 1 a 5 °C se populace *E. coli* během prvních 3 dnů výrazně snížila. Navíc se došlo k zjištění, že nárůst množství *E. coli* proběhne dříve, než dojde k výraznému zhoršení kvality produktu. Závěry z uvedené studie potvrzují i moje výsledky, u kontroly vyhodnocené po 4 dnech skladování při teplotě 4 °C bylo pozorováno průměrné snížení o 1,39 log KTJ /g. Avšak samotné snížení teploty nestačí k potřebnému snížení množství *E. coli*, pokud se použijí silice v kombinaci se sníženou teplotou pokles počtu *E. coli* se ještě zvýší. Toto potvrzuje i můj pokus, u kterého došlo při ošetření silicí u všech koncentrací k poklesu počtu *E. coli* až na mez detekce vyhodnocovací metody.

Kolísání teploty při obchodní přepravě a maloobchodním prodeji listové zeleniny se může negativně podílet na mikrobiální bezpečnosti a kvalitě produktu. Zeng et al. (2014) se proto zaměřili na vliv kolísání teplot a na růst množství *E. coli* O157:H7 v balených salátech během přepravy, skladování a prodeje. Množství *E. coli* maximálně vzrostlo o 3,1 log KTJ/g. Průměrné hodnoty zvýšení počtu *E. coli* byly přibližně 2 log KTJ/g. Lze tedy říci, že maloobchodní doba skladování může významně ovlivnit růst patogenů. Domnívám se,



že silice by mohly zabránit růstu počtu *E. coli* při narušení chladírenského řetězce a tím zvýšit bezpečnost produktů.

Dalším fyzikálním faktorem, který může mít pozitivní vliv na inhibici *E. coli* je podtlak. Lee and Baek (2008) se ve svém výzkumu zaměřili na to, jaký vliv má snížení tlaku vzduchu na množství *E. coli* O157:H7. U neošetřeného špenátu chemickými přípravky byl po 7 dnech zjištěn rozdíl množství *E. coli* 1,71 log KTJ/g za podtlaku oproti vzorkům špenátu balených za atmosférického tlaku. V mé diplomové práci byl prokázán vliv podtlaku na CPM u špenátových listů ošetřených silicí zavinutky. Např. při koncentraci silice zavinutky 8 µl/l činil rozdíl oproti atmosférickému tlaku 1,12 log KTJ/g a při koncentraci 4 µl/l byl rozdíl 1,04 log KTJ/g. U saturejky byl významný rozdíl CPM mezi podtlakem a atmosférickým tlakem pouze u koncentrace 128 µl/l (3,03 log KTJ/g). Dále Fraňková a kol. (2014) zkoumali zvýšenou antibakteriální účinnost silic *in vitro* v podtlaku v závislosti na čase (5 min. až 4 hod.). Např. silice oregana s MIC 64 µl/l inhibovala množství *E. coli* za 30 min. v podtlaku a za 1440 min. v atmosférickém tlaku, tedy inhibice počtu *E. coli* byla 48 krát rychlejší než v atmosférickém tlaku. Vliv podtlaku na *E. coli* v *in vivo* podmínkách nebyl v této diplomové práci prokázán, ale domnívám se, že kdybychom snížili dobu ošetření např. na 30 min., vliv podtlaku by se mohl pozitivně projevit.

Mezi běžně používané antimikrobiální ošetření patří přípravky obsahující chlor. Porovnání účinnosti silic s chlorem je proto zajímavé, i z hlediska případného zavádění alternativních ošetření do potravinářského průmyslu. Např. účinnost silice oregana na ready-to-eat potravinách studovali Gutierrez et al. (2009) a došli k závěru, že dekontaminační účinek silice oregana o koncentraci 250 µl/l byl řádově srovnatelný s chlorem o koncentraci 120 µl/l. Při ošetření mrkve silicí oregana se počty bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, která často způsobuje kažení ovoce a zeleniny, snížily bezprostředně po ošetření o 0,73 log KTJ/g a o 0,4 log KTJ/g při dezinfekci chlorem. V mých výsledcích došlo ke snížení CPM při použití silice zavinutky o koncentraci 4 µl/l v atmosférickém tlaku o 0,99 log KTJ/g a v podtlaku o 2,03 log KTJ/g. Zjištěné výsledky naznačují, že silice zavinutky by měla být účinnější než dezinfekce chlorem, která navíc může mít negativní dopad na zdraví spotřebitele nebo i na životní prostředí.

Kromě využití silic se hledají i další možné šetrné alternativy ošetření minimálně zpracovaných produktů. Zhou et al. (2012) zkoumali vliv ultrazvuku při minutovém ošetření o frekvenci 5, 40, 75 kHz na množství *E. coli* a uvedené frekvence redukovali počty *E. coli* (o 0,056, 0,061, 0,057 log KTJ/(W/l)). Při kombinovaném ošetření chlorem a

ultrazvukem bylo zjištěno další snížení o 0,5 log KTJ/g. Využití ultrazvuku v potravinářském průmyslu má jistě potenciál, ale je to spíše zdokonalení používané metody chemické dezinfekce, na rozdíl od silic, které nabízí přírodní alternativu. Výsledky této diplomové práce naznačují, že silice by měly dosahovat lepších antimikrobiálních účinků, než UV záření.

Dalšími možnými metodami pro snížení *E. coli* se zkoumá využití bakteriofágů. Viazis et al. (2011) zjišťovali inhibiční účinek bakteriofága BEC8 a složky silice trans-cinnamaldehydu (TC) proti životaschopnosti *E. coli* O157:H7 na listech mladého špenátu. Při individuálním ošetření BEC8 (cca  $10^6$  PFU/list, PFU=fágové částice schopné tvořit plaky) nebo TC (koncentrace 0,5 %) došlo k úplné inhibici *E. coli* pouze při nízké úrovni inokula ( $10^4$ ) po 24 hodinách při teplotě 23 a 37 °C. Pokud se inokulum *E. coli* zvýšilo nebo se snížila inkubační teplota, účinnost BEC8 i TC klesla. Nejúčinnější byla kombinace BEC8 s TC, při níž došlo k úplné inhibici *E. coli* po 10 minutách při všech teplotách a úrovních inokula. Např. při teplotě 23 °C po 24 hodinách došlo ke snížení počtu *E. coli* při použití: BEC8 o 1,32 KTJ/g, při TC o 3,62 KTJ/g a u kombinace obou o 4,14 KTJ/g. V našem případě se u *E. coli* nedosáhlo v žádné koncentraci tak výrazného výsledku jako u kombinované metody BEC8 s TC, ale výsledky se nedají přesně porovnat, např. koncentrace TC byla 125 krát vyšší než MIC silice zavinutky.

## 7. Závěr

Byly prokázány antimikrobiální účinky silic rostlin *Monarda media* a *Satureja hortensis in vivo* na špenátových listech zaočkovaných *E. coli* o koncentraci  $10^5$  KTJ/g. Silice satirejky byla účinná v inhibici *E. coli* až do koncentrace 8  $\mu$ l/l (MIC). Silice z rostliny *M. media* inhibovala *E. coli* i v poloviční koncentraci 4  $\mu$ l/l. Takto nízké koncentraci silic bylo zřejmě dosaženo díky kombinaci několika konzervačních technik - nízká teplota, tlak a plynná fáze silice.

Obě testované silice mají jistě velký potenciál v uplatnění jako alternativní „přírodní“ konzervační látky v potravinářství. Silice jako konzervační látky by mohly přispět ke zlepšení bezpečnosti a kvality potravin, především minimálně zpracovaných produktů. V rámci dalšího výzkumu by bylo vhodné optimalizovat metodu ošetření a ověřit senzoricou přijatelnost výsledného produktu.

## 8. Seznam literatury

- Abdalla, A. E. M., Darwish, S. M., Ayad, E. H. E., El-Hamahmy, R. M. 2007. Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. *Food Chemistry*. 103 (4). 1141-1152.
- Adams, M. R., Moss, M. O. 2008. *Food Microbiology*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. p. 463. ISBN 978-0-85404-284-5.
- Adiguzel, A., Ozer, H., Kilic, H., Cetin, B. 2007. Screening of antimicrobial activity of essential oil and metanol extract of *Satureja hortensis* L. on foodborne bacteria and fungi. *Czech Journal of Food Sciences*. 25 (2). 81-89.
- Agneta, R., Mollers, C., Rivelli, A. R. 2013. Horseradish (*Armoracia rusticana*), a neglected medical and condiment species with a relevant glucosinolate profile: a review. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 60 (7). 1923-1943.
- Auta, K. I., Galadima, A. A., Basse, J. U., Olowoniyi, O. D., Moses, O. O., Yako, A. B. 2011. Antimicrobial properties of the etanolic extracts of *Zingiber officinale* (Ginger) on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Sciences*. 6 (1). 37-39.
- Azizkhani, M., Elizaquível, P., Sánchez, G., Selma, M., V., Aznar, R. 2013. Comparative efficacy of *Zataria multiflora* Boiss., *Origanum compactum* and *Eugenia caryophyllus* essential oils against *E. coli* O157:H7, feline calicivirus and endogenous microbiota in commercial baby-leaf salads. *International Journal of Food Microbiology*. 166 (2). 249-255.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck D., Waomar, M. 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46 (2). 446-475.
- Başer, K. H. C., Buchbauer, G. 2010. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. CRC Press. Boca Raton, Florida. p. 975. ISBN: 9781420063158.
- Belloso, O. M., Fortuny, R. S. 2011. *Advances in Fresh-Cut Fruits and Vegetables Processing*. CRC Press. Boca Raton, Florida. p. 386. ISBN: 9781420071238.
- Berg, N., A. Purple bergamot *Monarda media* Willd [online]. Říjen 2010 [cit. 2014-3-21]. Dostupné z <[http://plants.usda.gov/factsheet/pdf/fs\\_mome.pdf](http://plants.usda.gov/factsheet/pdf/fs_mome.pdf)>.

- Blažeković, D., Kakurinov, V., Stojanovski, S., 2010. Antibacterial properties of essential oil of *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) from pelagonian region. *Acta Biologica* 17 (1). 5-18.
- Buchanan, R., L., Doyle, M., P. 1997. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic E. coli. *Food Technology*. 51 (10). 69-76.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94 (3). 223-253.
- Canillac, N., Mourey A. 2001. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology*. 18 (3). 261-268.
- Cardile, V., Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Arnold, N. A., Piozzi, F. 2009. Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: Chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 126 (2). 265-272.
- Chung, K. H., Yang, K. S., Kim, J., Kim, J. C., Lee, K. Y. 2007. Antibacterial activity of essential oils on the growth of *Staphylococcus aureus* and measurement of their binding interaction using optical biosensor. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17 (11). 1848-1855.
- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F. 1999. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. 29 (2). 130-135.
- Cutter, C. N. 2000. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection*. 63 (5). 601– 607.
- Deans, S. G., Ritchie, G. 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 5 (2) 165-180.
- Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 74 (1-2). 101-109.
- Dorman, H. J. D., Deans S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88 (2). 308-316.

- El Kalamouni, C., Raynaud, C., Talou T. 2009. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of Midi-Pyrenées aromatic plants. *Chemine Technologija*. 3 (52). 69-73.
- Farag, R. S., Daw, Z. Y., Hewedi, F. M., Elbaroty, G. S. A. 1989. Antimicrobial activity of some egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection*. 52 (9). 665-667.
- Fraňková, A., Šmíd J., Klouček, P. Pulkrábek, J. 2014. Enhanced antibacterial effectiveness of essential oils vapors in low pressure environment. *Food Control*. 35 (1). 14–17.
- Fraternale, D., Giamperi, L., Bucchini, A., Ricci, D., Epifano, F., Burini, G., Curini, M. 2006. Chemical composition, antifungal and in vitro antioxidant properties of *Monarda didyma* L. essential oil. *Journal of essential oil research*. 18 (5). 581-585.
- Gill, A. O., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R. A. 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*. 73 (1). 83-92.
- Grosso, C., Ferraro, V., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Coelho, J. A., Palavra, A. M. 2008. Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds. *Food Chemistry*. 111 (1). 197-203.
- Gutierrez, J., Bourke, P., Lonchamp, J., Barry-Ryan, C. 2009. Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 10 (2). 195–202.
- Havlová, K. 2013. Biologická aktivita silic vybraných druhů rostlin čeledi Lamiaceae. Bakalářská práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 47 s.
- Holley, R. A., Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 22 (4). 273-292.
- Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A. M., Cavrini, V. 2002. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 29 (4). 691-700.
- Ilic, S., Odomeru, J., LeJeune, J. T. 2008. Coliforms and prevalence of *Escherichia coli* and foodborne pathogens on minimally processed spinach in two packing plants. *Journal of Food Protection*. 71 (12). 2398-2403.

- Karasová, Z. 2013. Antimikrobiální aktivita silic rodu *Monarda*. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 49 s.
- Karatzas, A. K., Kets, E. P. W., Smid, E. J., Bennik, M. H. J. 2001. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology*. 90 (3). 463-469.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., Nychas, G. J. E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91 (3). 453-462.
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M. E., Gardini, F. 2004. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science & Technology*. 15 (3-4). 201-208.
- Lee, S., Y., Baek, S., Y. 2008. Effect of chemical sanitizer combined with modified atmosphere packaging on inhibiting *Escherichia coli* O157:H7 in commercial spinach. *Food Microbiology*. 25 (4). 582-587.
- Luo, Y., He, Q., McEvoy, J., L., Conway, W., S. 2009. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in the presence of indigenous microorganisms on commercially packaged baby spinach, as impacted by storage temperature and time. *Journal Food Protection*. 72 (10). 2038-2045.
- Marino, M., Bersani, C., Comi, G. 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection*. 62 (9). 1017-1023.
- Mihajilov-Krstev, T., Radnovic, D., Kitic, D., Stojanovic-Radic, Z., Zlatkovic, B. 2009. Antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil against pathogenic microbial strains. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 23 (4). 1492-1496.
- Mouhajir, F., Pedersen, J., A., Rejdali, M., Towers, G., H., N. Antimicrobial thymohydroquinones of Moroccan *Nigella sativa* seeds detected by electron spin resonance. *Pharmaceutical Biology*. 37 (5). 391-395.
- Mourey, A., Canillac, N. 2002. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control*. 13 (4-5). 289-292.

- Nedorostová, L., Klouček, P., Kokoška, L., Štolcová, M., Pulkrábek, J. 2009. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*. 20 (2). 157-160.
- Nutr, J. 1999. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *Crowell PL*. 129 (3). 775-778.
- Oliveira, M. M. M., Brugneram, D. F., Nascimento, J. A., Batista, N. N., Piccoli, R. H. 2012. Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces. *European Food Research and Technology*. 234 (5). 821-832.
- Orue, N., García, S., Feng, P., Heredia, N. 2013. Decontamination of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* O157:H7 from leafy green vegetables using edible plant extracts. *Journal of Food Science*. 78 (2). 290-296.
- Pavela, R., Bárnet. M. 2011. Alternativní plodina saturejka zahradní (*Satureja hortensis* L.) pěstování, význam, využití v ochraně rostlin. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha. 24 s. ISBN: 9788074270833.
- Savickiene, N., Dagilyte, A., Barsteigiene, Z., Kazlauskas, S., Vaiciūniene, J. 2002. Analysis of flavonoids in the flowers and leaves of *Monarda didyma* L. *Medicina (Kaunas)*. 38 (11). 1119-1122.
- Suková, I. Stupně convenience u potravin [online]. 26. srpen 2004 [cit. 2014-1-18]. Dostupné z <<http://www.agronavigator.cz/service.asp?act=email&val=28760>>.
- Táborský, J. 2011. Stanovení thymochinonu a příbuzných sloučenin ve vybraných rostlinných taxonech. Disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 81 s.
- Táborský, J., Kunt, M., Klouček, P., Lachman, J., Zelený, V., Kokoška, L. 2012. Identification of potential sources of thymoquinone and related compounds in Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae, and Ranunculaceae families. *Central European Journal of Chemistry*. 10 (6). 1899-1906.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., Cliver, D. O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21 (9). 1199-1218.
- Tassou, C. C., Drosinos, E. H., Nychas, G. J. E. 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model



- food systems at 4-degrees and 10-degrees and 10-degrees-C. *Journal of Applied Bacteriology*. 78 (6). 593-600.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J. A., Nunes, M. L. 2013. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*. 43 (1). 587-595.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (4). 1561-1568.
- Ultee, A., Kets, E. P. W., Alberda, M., Hoekstra, F. A., Smid, E. J. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*. 174 (4). 233-238.
- Ultee, A., Smid, E. J. 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*. 64 (3). 373-378.
- Velíšek, J. 2002. *Chemie potravin 2*. OSSIS. Tábor. 303 s. ISBN: 8086659011.
- Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., Diez-Gonzalez, F. 2011. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture. *International Journal of Food Microbiology*. 145 (1). 37-42.
- Whitten, W. M. 1981. Pollination ecology of *Monarda didyma*, *M. clinopodia*, and hybrids (Lamiaceae) in the Southern Appalachian Mountains. *American Journal of Botany*. 68 (3) 435-442.
- Wilkinson, J. M., Hipwell, M., Ryan, T., Cavanagh, H. M. A. 2003. Bioactivity of backhousia citriodora: Antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (1). 76-81.
- Zeng, W., Vorst, K., Brown, W., Marks, B., P., Jeong, S., Pérez-Rodríguez, F., Ryser, E., T. 2014. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in packaged fresh-cut romaine mix at fluctuating temperatures during commercial transport, retail storage, and display. *Journal Food Protection*. 77 (2). 197-206.
- Zheng, L., Bae, Y. M., Jung, K. S., Heu, S., Lee, S. Y. 2013. Antimicrobial activity of natural antimicrobial substances against spoilage bacteria isolated from fresh produce. *Food Control*. 32 (2). 665-672.

Zhou, B., Feng, H., Arne J. Pearlstein, A., J. 2012. Continuous-flow ultrasonic washing system for fresh produce surface decontamination. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 16 (1). 427–435

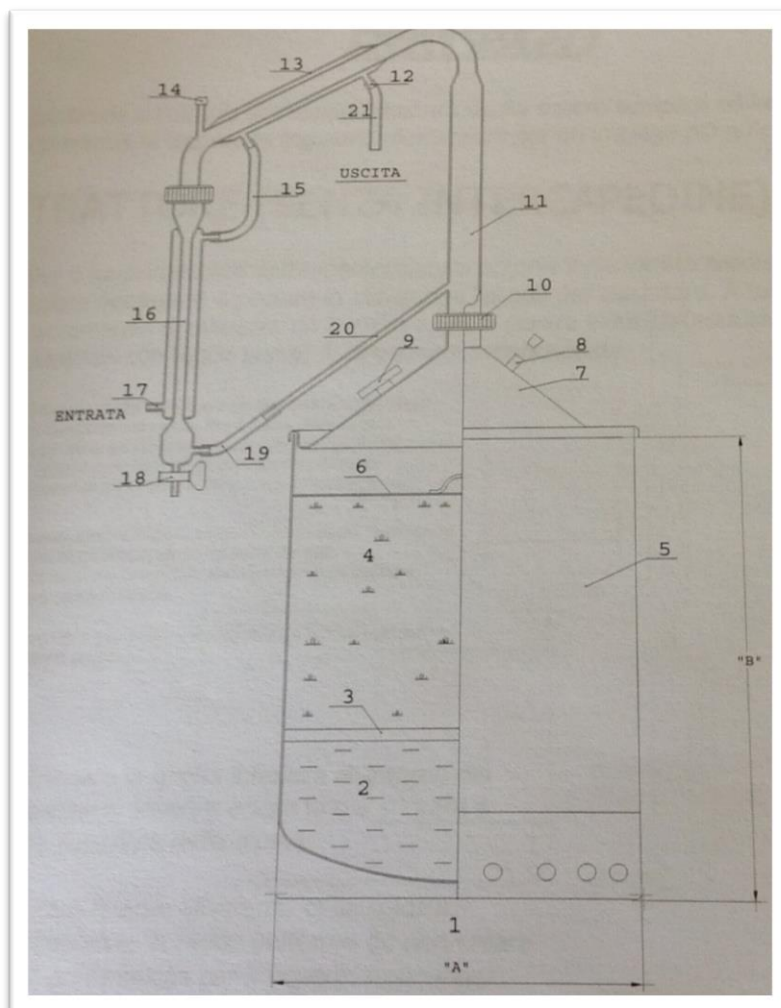
## 9. Seznam použitých zkratek a symbolů

<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>BEC8</b>	označení bakteriofága
<b>CFU</b>	colony forming unit
<b>CPM</b>	celkový počet mikroorganismů
<b>EFSA</b>	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
<b>EHEC</b>	enterohemoragická <i>Escherichia coli</i>
<b>EIEC</b>	enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
<b>EPEC</b>	enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
<b>ES</b>	Evropské společenství
<b>ETEC</b>	enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
<b>FAO</b>	Organizace pro výživu a zemědělství
<b>G-</b>	gramnegativní bakterie
<b>G+</b>	grampozitivní bakterie
<b>GHP</b>	správná hygienická praxe
<b>HACCP</b>	system analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů (Hazard Analysis and Critical Control Points)
<b>HUS</b>	hemolyticko-uremický syndrom
<b>KTJ</b>	kolonie tvořící jednotky
<b>MBC</b>	minimální baktericidní koncentrace
<b>MIC</b>	minimální inhibiční koncentrace
<b>PCA</b>	plate count agar
<b>PEG</b>	polyetylen glykol
<b>PFU</b>	fágové částice schopné tvořit plaky
<b>PMF</b>	protonmotivní síla
<b>SFE</b>	superkritická fluidní extrakce

<b>TC</b>	trans-cinnamaldehydu
<b>TL</b>	termolabilní enterotoxin
<b>TNM</b>	total number of microorganisms
<b>TS</b>	termostabilní enterotoxin
<b>TTP</b>	trombocytopenická purpura
<b>UV</b>	ultrafialové záření
<b>VTEC</b>	verotoxin-produkující <i>Escherichia coli</i>
<b>W/l</b>	watt/litr (jednotka hustoty výkonu)
<b>WHO</b>	Světová zdravotnická organizace

## 10. Přílohy

### 10.1 Technický náčrt destilačního přístroje



1 plynový vaříč	12 odtok chladicí vody
2 voda	13 nerezový kondenzátor (chladič ?)
3 spodní mřížka	14 pojistný ventil
4 rostliny k destilování	15 gumová hadice
5 kotel	16 skleněné baňky
6 horní mřížka	17 přítok chladicí vody
7 víko k uzavření	18 vypouštěcí kohout
8 bezpečnostní ventil	19 silikonová objímka
9 teploměr	20 trubice pro recyklaci destilované vody
10 upevňovací kroužek	21 hadička na přívod/odtok chladicí vody
11 nerezová kolona	

