

# **Možnosti využití rostlinných extraktů pro snížení povrchové kontaminace chlazené drůbeže**

Bc. Alena Bantová

---

Diplomová práce  
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2009/2010

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Alena BANTOVÁ**  
Osobní číslo: **T08784**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Možnosti využití rostlinných extraktů pro snížení povrchové kontaminace chlazené drůbeže.**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Konzervační metody v potravinářství -- zaměření na přírodní látky
2. Charakteristika vybraných druhů koření
3. Rostlinné silice a jejich vlastnosti
4. Povrchová mikroflóra drůbeže

### II. Praktická část

1. Stanovení antimikrobiální aktivity vybraných rostlinných silic diskovou difúzní metodou
2. Aplikace vybrané silice na povrch chlazených kuřat

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils -- A review. Food and Chemical Toxicology, 46, 2004. s. 446-475
- [2] BRUT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -- a review. International Journal of Microbiology, 94, 2004. s. 223-253
- [3] GOULD, G. W. New methods of food preservation. Gaithersburg, Maryland : Aspen Publishers, 1999. 324 s. ISBN 0-8342-1341-9
- [4] DAVIES, A., BOARD, R. The Microbiology of Meat and Poultry. London : Blackie Academic & Professional, 1998. 346 s. ISBN 0-7514-0398-9
- [5] CHÝLEOVÁ, L. Koření a jeho použití v potravinářském průmyslu. 1. vyd. Praha: VÚPP-STI potravinářského průmyslu, 1986. 44 s.

Vedoucí diplomové práce:

**Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.**

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

**4. ledna 2010**

Termín odevzdání diplomové práce:

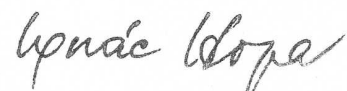
**19. května 2010**

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.

*děkan*



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.

*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: .....BAUTOVA' ALENA.....

Obor: .....CHTP.....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně .....17.5.2010.....

.....Alema Bautova'.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## ABSTRAKT

Rostlinné silice jsou těkavé, ve vodě nerozpustné látky s charakteristickou vůní. Získávají se destilací z rostlinných materiálů (květín, pupenů, semen, listů, bylin a plodů). V této práci byly sledovány antimikrobiální účinky čtyř rostlinných silic, a to z hřebíčku (*Syzygium aromaticum*), bobkového listu (*Laurus nobilis*) a dvou druhů dobromyslu (*Origanum minutiflorum* a *Origanum dubium*). Byla použita disková difúzní a agarová diluční metoda na spektrum bakterií, kvasinek a plísní. Nejvýraznější antimikrobiální účinky byly prokázány u silice z *O. minutiflorum*. Tato silice byla aplikována na povrch chlazené drůbeže metodou postřiku. Ze všech sledovaných mikrobiálních skupin (mezofilní bakterie, psychrotrofní bakterie, koliformní bakterie, kvasinky) vyskytující se na kuřecí kůži byl antimikrobiální vliv silice z *O. minutiflorum* statisticky prokázán pouze na koliformní bakterie.

Klíčová slova: hřebíček, *Origanum minutiflorum*, *Origanum dubium*, bobkový list, bakterie, kvasinky, plísně, drůbež

## ABSTRACT

Essential oils are volatile, hydrophobic liquid with typical odour. Essential oils are generally extracted by distillation from plant materials (flowers, buds, seeds, leaves, herbs and fruits). In this work, an antimicrobial effect of four essential oils from clove (*Syzygium aromaticum*), bay leaf (*Laurus nobilis*) and two species oregano (*Origanum minutiflorum* and *Origanum dubium*). It was observed on bacteria, yeasts and moulds by disk diffusion and agar dilution method. The most significant antimicrobial effect had *O. minutiflorum* essential oil. This essential oil was applied on the surface microflora of chilled poultry by spraying method. Antimicrobial effect of *O. minutiflorum* essential oil was proved statistically significant only against coliform bacteria among all tested groups (mesophilic bacteria, psychrotrophic bacteria, coliform bacteria, yeasts).

Keywords: clove, *Origanum minutiflorum*, *Origanum dubium*, bay leaf, bacteria, yeasts, modls, poultry

Ráda bych poděkovala Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D. za odborné rady, konzultace a čas, který mi věnovala při sestavování této diplomové práce, bez nichž by nevznikla. Za emocionální a ekonomické zázemí děkuji svým rodičům.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 KONZERVAČNÍ METODY V POTRAVINÁŘSTVÍ</b> .....	<b>13</b>
1.1 ROZDĚLENÍ KONZERVAČNÍCH METOD.....	13
1.1.1 Vylučování mikroorganismů z prostředí.....	13
1.1.2 Přímá inaktivace mikroorganismů .....	13
1.1.3 Nepřímá inaktivace mikroorganismů.....	13
1.2 PŘÍRODNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY Z ROSTLIN .....	14
1.2.1 Fytoalexin.....	14
1.2.2 Organické kyseliny .....	14
1.2.3 Rostlinné silice .....	14
<b>2 KOŘENÍ</b> .....	<b>16</b>
2.1 VLASTNOSTI KOŘENÍ .....	16
2.1.1 Chuť a vůně.....	16
2.1.2 Antioxidační vlastnosti.....	16
2.1.3 Antimikrobiální vlastnosti.....	17
2.2 HŘEBÍČEK.....	17
2.2.1 Používaná část rostliny.....	17
2.2.2 Vůně a chuť .....	17
2.2.3 Botanika .....	17
2.2.4 Použití .....	17
2.2.5 Léčivé a antibakteriální účinky .....	18
2.3 DOBROMYSL OBECNÁ.....	19
2.3.1 Používaná část rostliny.....	19
2.3.2 Vůně a chuť .....	19
2.3.3 Botanika .....	19
2.3.4 Použití .....	19
2.3.5 Léčivé a antibakteriální účinky .....	20
2.4 BOBKOVÝ LIST .....	21
2.4.1 Používaná část rostliny.....	21
2.4.2 Vůně a chuť .....	21
2.4.3 Botanika .....	21
2.4.4 Použití .....	21
2.4.5 Léčivé a antibakteriální účinky .....	22
<b>3 ROSTLINNÉ SILICE</b> .....	<b>23</b>



3.1	ZPŮSOBY ZÍSKÁVÁNÍ ROSTLINNÝCH SILIC.....	23
3.2	STÁLOST SILIC .....	24
3.3	VYUŽITÍ KOŘENÍ OBSAHUJÍCÍ SILICE .....	25
3.4	SILICE V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	26
3.5	CHEMICKÉ SLOŽENÍ .....	26
3.5.1	Aldehydy .....	26
3.5.2	Alkoholy.....	26
3.5.3	Estery.....	27
3.5.4	Fenoly a fenolické étery .....	27
3.5.5	Ketony .....	27
3.5.6	Uhlovodíky.....	27
3.6	ANTIMIKROBIÁLNÍ VLASTNOSTI SILIC .....	27
<b>4</b>	<b>MIKROFLÓRA POVRCHU DRŮBEŽE .....</b>	<b>30</b>
4.1	ČELEĎ <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> .....	30
4.1.1	Rod <i>Escherichia</i> .....	30
4.1.2	Rod <i>Salmonella</i> .....	30
4.2	ČELEĎ <i>MORAXELLACEAE</i> .....	31
4.2.1	Rod <i>Acinetobacter</i> .....	31
4.3	ČELEĎ <i>PSEUDOMONADACEAE</i> .....	31
4.3.1	Rod <i>Pseudomonas</i> .....	31
4.4	ČELEĎ <i>STAPHYLOCOCCACEAE</i> .....	32
4.4.1	Rod <i>Staphylococcus</i> .....	32
4.5	KVASINKY .....	32
4.6	PLÍSNĚ.....	33
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>36</b>
6.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	36
6.2	KULTIVAČNÍ PŮDY.....	36
6.3	CHEMIKÁLIE A ROZTOKY .....	38
6.4	POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KMENY .....	39
6.5	POUŽITÉ ROSTLINNÉ SILICE.....	39
6.6	STANOVENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY .....	40
6.7	STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY VŮČI KVASINKÁM .....	40
6.8	STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY VŮČI PLÍSNÍM.....	41
6.9	APLIKACE ROSTLINNÉ SILICE NA POVRCH CHLAZENÝCH KUŘAT .....	41
6.9.1	Původ vzorků .....	41
6.9.2	Aplikace rostlinné silice metodou postříku.....	41
6.9.3	Odběr vzorků pro analýzu .....	41

6.10	IDENTIFIKACE KVASINEK .....	42
6.10.1	Princip jednotlivých identifikačních testů.....	42
6.11	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ.....	43
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>44</b>
7.1	STANOVENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY .....	44
7.1.1	Aplikace rostlinných silic na sbírkové bakteriální kmeny .....	44
7.1.2	Aplikace rostlinných silic na izolované bakteriální kmeny.....	45
7.2	IDENTIFIKACE KVASINEK .....	46
7.3	STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY VŮČI KVASINKÁM .....	47
7.4	STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY VŮČI PLÍSNÍM.....	48
7.4.1	Antimikrobiální vliv rostlinných silic na <i>Penicillium nalgiovensis</i> .....	49
7.4.2	Antimikrobiální vliv rostlinných silic na <i>Penicillium roqueforti</i> .....	49
7.4.3	Antimikrobiální vliv rostlinných silic na <i>Alternaria alternata</i> .....	50
7.5	VLIV ROSTLINNÉ SILICE NA MIKROFLÓRU DRŮBEŽE .....	51
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>55</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>56</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>62</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>63</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>64</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>66</b>

## ÚVOD

Kažením potravin rozumíme nežádoucí pomnožení mikroorganismů, které způsobí, že potraviny jsou nepoživatelné. Účelem konzervace potravin je dosáhnout prodloužení jejich trvanlivosti a vyhnout se tak jejich zkažení.

Spotřebitelé požadují potraviny nejvyšší kvality s dlouhou dobou trvanlivosti a jejich zdravotní nezávadnost s co nejmenším množstvím chemických konzervačních látek. Tato skutečnost podněcuje ke stále většímu použití přírodních konzervačních látek s antimikrobiálním účinkem, které jsou vhodné k tomuto použití.

V potravinářském průmyslu se běžně používají obvyklé konzervační látky, jakými jsou cukr, sůl, kyselina mléčná, octová, citrónová a další méně známé organické kyseliny. Široce rozšířené je použití dalších konzervačních látek, kyseliny benzoové a kyseliny sorbové. Antimikrobiální látky jsou produkovány přirozenou cestou také rostlinami a mohou být použity k usmrcení nebo k inhibování růstu bakterií, virů a hub.

Mnoho rostlin, bylin a koření obsahuje látky, jež jsou známy svými fungicidními, antibakteriálními, antimykotickými a insekticidními účinky. Tyto antimikrobiální substance se vyskytují především v rostlinných silicích. Využití rostlinných extraktů v potravinářství má dlouhodobou tradici. Tato práce je zaměřena na testování účinků vybraných rostlinných silic na mikroorganismy a následně na mikroflóru chlazené drůbeže v průběhu tří dnů skladování.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 KONZERVAČNÍ METODY V POTRAVINÁŘSTVÍ

Konzervací je myšlen každý úmyslný zákrok, popřípadě úprava potravin, prodlužující skladovatelnost suroviny a potraviny déle než dovoluje přirozená údržnost.

Podle metody a intenzity zákroku mohou být produkty konzervačních zákroků údržné krátkodobě nebo dlouhodobě. Při konzervaci potravin je hlavním cílem prodloužení jejich údržnosti, ale současně je třeba respektovat další významná hlediska jako maximální možnou šetrnost vůči organoleptickým vlastnostem a nutričním složkám potravin [1].

## 1.1 Rozdělení konzervačních metod

Podle Kyzlinka [2] se praktické konzervační metody rozdělují do následujících tří skupin.

### 1.1.1 Vylučování mikroorganismů z prostředí

Jedná se o omezování a zmenšování počtu nebo úplné vyloučení mikroorganismů z prostředí. Jde např. o čistotu zařízení a místnosti, vzduchu, vody, pomocného materiálu, dále procesy zbavující materiály nečistot nebo u tekutiny kalů, a tím i mikroorganismů. K úplnému vyloučení mikroorganismů z tekutin mechanickým procesem dochází při mikrobiální filtraci [2].

### 1.1.2 Přímá inaktivace mikroorganismů

Mezi fyzikální metody přímé inaktivace mikroorganismů patří sterilace zvýšenou teplotou, konzervace ionizujícím zářením, sterilace střídavým tlakem, konzervace vysokým hydrostatickým tlakem, konzervace vysokointenzivním pulsujícím elektrickým polem a konzervace vysokointenzivními záblesky světla. Mezi chemické metody patří použití dezinfekčních činidel, kyslíku a stříbra [3, 4].

### 1.1.3 Nepřímá inaktivace mikroorganismů

K fyzikálním nepřímým metodám patří vysušování potravin (tzv. osmoanabióza nebo xeroanabióza), zahušťování, vymrazování vody, proslazování, dále snižování teploty a odnímání kyslíku. K chemickým zákrokům patří konzervace rafinovanými chemikáliemi (kyselina benzoová, sorbová, oxid siřičitý), uzení, konzervace umělou alkoholizací a oky-

selování. Mezi biologické zákroky se řadí konzervace etanolovým a mléčným kvašením [1, 2].

## 1.2 Přírodní antimikrobiální látky z rostlin

Využívání přírodních látek patří k trendům současné doby a týká se i postupů konzervace. Pro omezení nebo vyloučení použití sterilace a chemických konzervantů je možno použít přírodní látky samostatně nebo v kombinaci s dalším postupem upravující potravinu tak, aby nemohlo docházet k rozvoji mikroorganismů nebo látky s antimikrobiálním či antioxidačním účinkem získávané především z rostlin [2].

### 1.2.1 Fytoalexin

Fytoalexiny jsou nízkomolekulární látky, které mají lipofilní charakter. Jsou známy fytoalexiny typu isoflavonoidů, terpenoidů, stilbenů a acetylenů. Rostlina je začne produkovat po napadení houbou, jiným organismem, toxickou látkou nebo zářením. Fytoalexiny se rychle hromadí zejména v listech, plodech a kořenech. Antimikrobiální aktivita fytoalexinů je účinná hlavně proti houbám, ale účinek byl zaznamenán také proti bakteriím. Grampozitivní bakterie byly citlivější než gramnegativní bakterie [5].

### 1.2.2 Organické kyseliny

Kyseliny citrónová, jantarová, jablečná a vinná jsou obsaženy v ovoci (např. citrusy, rebarbora, hrozny, ananas) a zelenině (např. brokolice, mrkev). Obsah organických kyselin závisí ve značné míře na druhu ovoce a zelenině a na stupni jeho zralosti. Organické kyseliny v ovoci a zelenině příznivě ovlivňují hlavně chuť, zejména je-li jejich kyselost harmonicky sladěna s obsahem cukrů, tříslovin, aromatických látek a dalších složek. Kyseliny se používají jako okyselující a konzervační přísada. Využívají se k potlačení bakterií, kvasinek a plísní [1, 5].

### 1.2.3 Rostlinné silice

Ve snaze objevit bezpečnější a přirozenější metody k prodloužení trvanlivosti potravin, byly zkoumány antimikrobiální účinky rostlinných silic. Ze všech rostlinných silic byly nejvíce prozkoumány tymián a dobromysl. Rostlinné silice byly zkoumány v různých potravinách jako hovězí vývar, maso, mléko a ovoce. Zdá se, že rostlinné silice mají lepší

antimikrobiální účinek při nižším pH potraviny, nižší skladovací teplotě, vyšším tlaku. Naopak vyšší množství bílkovin a tuku v potravine antimikrobiální účinek rostlinných silic snižuje [7].

## 2 KOŘENÍ

Vyhláška č. 331/1997 Sb., popisuje koření jako části rostlin jako jsou kořeny, oddenky, kůry, listy, natě, květy, plody, semena nebo jejich části v nezbytné míře technologicky zpracované a užívané k ovlivnění chutě a vůně potravin [8].

Jednotlivé druhy přírodního koření pocházejí z různých částí aromatických rostlin:

- a. plody (např. paprika, černý pepř, kardoman);
- b. semena (např. anýz, kmín, koriandr, fenykl, hořčice atd.);
- c. oddenky nebo kořeny (např. skořice);
- d. listy (např. petržel, bobkový list, majoránka, šalvěj);
- e. kůra (např. skořice);
- f. květy a květní části (např. šafrán, hřebíček);
- g. cibule (např. cibule, česnek) [9].

### 2.1 Vlastnosti koření

#### 2.1.1 Chut' a vůně

Koření jako přísada v potravinářských výrobcích má tu vlastnost, že dává potravinám zvláštní chuť, ale současně vyrovnává vůni a aroma. Existuje celá řada chutí obsažených v různých kořeních. Jejich správným mícháním lze dosáhnout vynikajících chuťových efektů. Některé druhy koření jsou přidávány do potravin za účelem zlepšení barvy nebo vzhledu (např. paprika). Použitím koření se prodlužuje i trvanlivost potravin [9, 10].

#### 2.1.2 Antioxidační vlastnosti

Téměř všechna koření vykazují při dostatečném vyloučení světla více nebo méně slabý antioxidační účinek. Silnější antioxidační účinek vykazuje především rozmarýn, šalvěj, tymián. Antioxidační vlastnosti koření způsobují především flavonoidy a kyseliny fenol-karbonové či kyselina rozmarýnová [9, 11].



### 2.1.3 Antimikrobiální vlastnosti

Hořčice, skořice a hřebíček se řadí mezi koření s největším účinkem na růst bakterií, plísní a kvasinek. Tento účinek je připisován specifickým látkám jako např. eugenol (hřebíček), skořicové aldehydy, kurkumin (kurmuma) a alicin (česnek) [9].

## 2.2 Hřebíček

### 2.2.1 Používaná část rostliny

Jako koření se používá sušená, nerozvitá květná poupata stále zeleného tropického stromu hřebíčkovce vonného (*Syzygium aromaticum*), celá nebo mletá [12].

### 2.2.2 Vůně a chuť

Hřebíček je velmi výrazné a aromatické koření známé svoji výraznou vůní. Má intenzivní nasládlou chuť, která často přechází do jemně hořké chutě [13].

### 2.2.3 Botanika

Hřebíček je stále zelený poměrně vysoký strom z čeledi myrtovitých, který ve všech částech obsahuje aromaticky vonící olej. Jeho listy jsou kožnaté, které mají tvar vejce a jsou dlouhé 5 až 15 cm. Na koncových latách se nacházejí žlutobílé květy. Sklízí se celá květenství, když jsou na nich plně vyvinuté, avšak doposud uzavřené květy. Poté se poupata utrhnou a suší na vzduchu. Během sušení ztratí cca 2/3 své hmotnosti a dostanou tmavě hnědou barvu [12].

### 2.2.4 Použití

Hřebíček (Obr. 1) se používá nejvíce k přípravě svařeného či kořeněného vína a punče, dále při speciální úpravě masa a ryb, na zvěřinu, v menším množství i do vývarů, v uzenářství, likérnictví, při nakládání zeleniny a hub, do omáček, kečupů, kompotů a cukrovinek. V Indii je pravidelnou součástí kari koření [14].



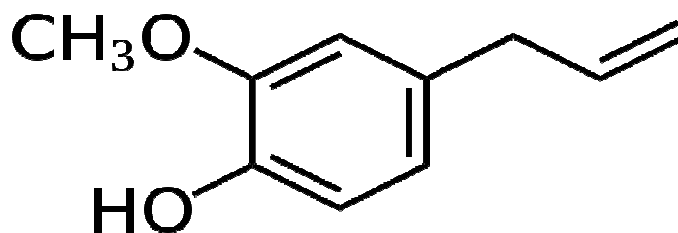
Obrázek 1: Hřebíček [15]

### 2.2.5 Léčivé a antibakteriální účinky

Hřebíček byl už před mnoha tisíci let uznávaným dezinfekčním prostředkem. Jeho výtažky se užívaly k dezinfekci úst, tak i k dalším lokálním ošetřením kůže a špatně se hojících ran. Antisepticky působí i při vnitřním užití, například v případě žaludečních katarů, při otravách zkaženým jídlem a střevních potížích. Hřebíčková silice obsahuje látky, které mají antibakteriální účinky. U hřebíčku je hlavně zastoupen eugenol (75 – 85 %) a acetyleugenol (8–15 %) [13, 16].

Eugenol (Obr. 2) je bezbarvá až bledě žlutá olejovitá kapalina extrahovaná z některých esenciálních olejů, zvláště z hřebíčku, muškátového oříšku, skořice a bobkového listu. Je částečně rozpustný ve vodě a dobře rozpustný v organických rozpouštědlech [16].

Eugenol je zodpovědný za vůni hřebíčku a je hlavní složkou rostlinné silice z hřebíčku, kde tvoří až 85 % [17].



Obrázek 2: Eugenol –chemický vzorec [16]

## 2.3 Dobromysl obecná

### 2.3.1 Používaná část rostliny

Jako koření se používají listy až 50 cm vysoké byliny (Obr. 3). Sklizeň je nejlepší během rozkvětu, kdy mají listy nejvyšší obsah silic [18].

### 2.3.2 Vůně a chuť

Silně aromatická, pikantní, lehce nahořklá, připomíná majoránku a tymián, avšak oproti nim je ostřejší [18].

### 2.3.3 Botanika

Keř je 20 - 50 cm vysoký, který je porostlý žláznatými chloupky a listy vejcovitého tvaru. Růžové květy jsou až 5 mm vysoké a jejich vůně připomíná tymián. Sklízí se horní části rostliny, které se potom suší na vzduchu. Teplota sušení by neměla překročit 35 °C, jinak se ztratí drahocenné oleje. Dobromysl - latinsky *Origanum* má mnoho druhů. Mezi nejznámější můžeme zařadit *Origanum vulgare*, *Origanum onites*, *Origanum syriacum*, *Origanum virens*, řecké oregano – *Origanum dubium* a turecké oregano – *Origanum minutiflorum*. [14, 18].

### 2.3.4 Použití

Celé snítky nebo drhnuté lístky dobromyslu jsou kořením nepostradatelným v italské kuchyni, kde se nejčastěji užívají v čerstvém stavu. Přidávají se do omáček, do bylinných olejů a octů na saláty nebo ke zdobení pokrmů. Hodí se k úpravě ryb, telecího i skopového masa, vaječných a houbových jídel [14].

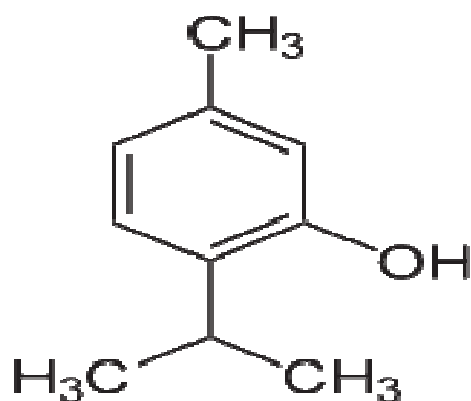


Obrázek 3: Dobromysl obecná [19]

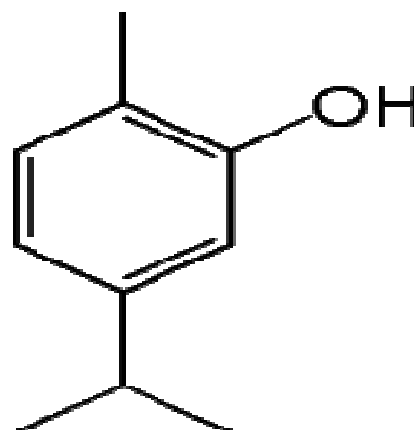
### 2.3.5 Léčivé a antibakteriální účinky

Sušená kvetoucí nať se používá v léčitelství pro své aseptické a protizánětlivé účinky, usnadňuje odkašlávání a zvyšuje vyměšování žluči. Dobromysl je silným prostředkem uvolňující křečovitě stažení hladkého svalstva (spasmolytikum). Používá se i na obklady a osvěžující koupele [20]. Aseptické a protizánětlivé účinky dobromyslu jsou způsobeny hlavními složkami silice jako je karvakrol, tymol,  $\gamma$ -terpinen, p-cymen [17]. Karvakrol (Obr. 4) je bezbarvá až žlutá čirá viskózní kapalina. Je součástí rostlinné silice dobromyslu obecné a silice tymiánu. Karvakrol obsažený v tymiánu se může vyskytovat v množství 5 - 75 % [20].

Vliv karvakrolu byl testován na produkci toxinu bakterií *Bacillus cereus* v živném médiu. Při aplikaci 0,06 mg/ml došlo až k 80 % redukcí tohoto toxinu a ke snížení životaschopných buněk [21].



Obrázek 4: Karvakrol – chemický vzorec [20]



Obrázek 5: Tymol – chemický vzorec [22]

Tymol (Obr. 5) je bílá krystalická látka, která spolu s karvakrolem (Obr. 4) je součástí silice tymiánu. Ve vodě se tymol rozpouští jen mírně, je však výborně rozpustný v alkoholech a v jiných organických rozpouštědlech [22].

Vliv karvakrolu a tymolu byl sledován na bakterii *Bacillus cereus*. Při aplikaci 15  $\mu$ l karvakrolu nebo 30 mg tymolu do 100 ml naočkovaného bujónu byl potlačen bakteriální růst po více jak 60 dnů při 16 °C [23].

## 2.4 Bobkový list

### 2.4.1 Používaná část rostliny

Jako koření jsou nejvíce používané listy rostliny bobkového list (*Laurus nobilis*). Průmyslově mohou být zpracovány i plody, ze kterých je získáván olej. Plody mohou být též použity jako koření [24].

### 2.4.2 Vůně a chuť

Čerstvé bobkové listy jsou poměrně aromatické a hořké, ale sušením je hořkost zdatelně redukována při zachování aroma [24].

### 2.4.3 Botanika

Vavřín (Obr. 6) je stále zelený keř či strom. Listy jsou ručně otrhány a roztříděny. Poté jsou listy rychle sušeny bez přístupu slunečního záření. Vysoce kvalitní bobkové listy lze snadno rozeznat především díky silnému aroma a jasně zelené barvě [14].

### 2.4.4 Použití

Je hojně používán do smetanových omáček, voňavých polévek, kyselých jídel, při nakládání masa, okurek nebo hub, pečení masa a zvláště zvěřiny. Využívá se také k přípravě marinád [24].



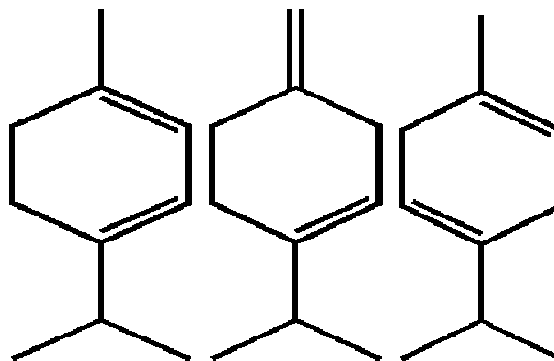
Obrázek 6: Bobkový list [25]

#### 2.4.5 Léčivé a antibakteriální účinky

Působí lehce sedativně, podporuje trávení, má i antiseptický (protizánětlivý) účinek. Mimo jiné má velmi zajímavý účinek na snižování krevního cukru, a proto se využívá jako doplněk léčby diabetiků. Hlavní složky rostlinné silice bobkového listu jsou 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpinen a sabinen [17, 23].

Terpiny jsou izomerní uhlovodíky, které se řadí mezi terpeny.  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ -terpinen se mezi sebou liší v poloze dvojné vazby.  $\alpha$  a  $\gamma$ -terpinen se vyskytují přirozeně v rostlinách.  $\beta$ -terpinen se v přírodě nevyskytuje a byl synteticky připraven ze sabinen [26].

Byl sledován účinek  $\gamma$ -terpinen a  $\alpha$ -terpinen.  $\gamma$ -terpinen nezastavil růst *Salmonella typhimurium*, ale při aplikaci  $\alpha$ -terpinen došlo k inhibici 11 z 25 bakteriálních druhů [17].



Obrázek 7:  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ -terpinen chemický vzorec [26]

### 3 ROSTLINNÉ SILICE

Rostlinné silice jsou též označovány jako éterické, esenciální nebo aromatické oleje. Jsou složitou směsí těkavých látek obsažených v přírodních rostlinných materiálech. Silice jsou často vonné a mají palčivou chuť [27]. Jsou nejčastěji bezbarvé, přičemž oxidací během skladování mohou tmavnout. Některé silice jsou však zbarvené přirozeně: žlutá je silice hřebíčková (*Syzygium aromaticum*), zelenkavou až modravou barvu mívají silice obsahující azulen - např. heřmánková silice (*Oleum chamomillae*). Silice jsou většinou kapalné, některé částečně tuhnou - např. silice růžová (*Oleum rosae*) nebo anýzová (*Oleum anisi*). Jsou většinou lehčí než voda, ale výjimku tvoří silice, obsahující více aromatických sloučenin, jako jsou silice hvozdíková (*Oleum caryophylli*) a skořicová (*Oleum cinnamomi*) [28].

V dnešní době je známo přes 3000 různých rostlinných silic a více než 1000 látek v nich obsažených [29]. Získávají se z různých částí rostlin, jejich květů (např. jasmín), stonků nebo případně kvetoucích stonků (máta, tymián), plodů nebo semen (kmín, pepř), oplodí plodů (citrusy), dřeva (santal), listů (bobkový list), cibulový či složených cibulový (česnek), oddenků (kurkuma), kořenů (hořec). Nacházejí se v žláznatých chlupech, žláznatých buňkách, papilách, kanálcích a mezibuněčných prostorech. Jejich význam pro rostlinu je objasněn jen částečně. Zatím se jim přiřazuje funkce lákadla pro opylující hmyz a jako usměrňovače transpirace. Také plní v rostlině funkci fytoncidů. Obsah silic v rostlině kolísá nejen v průběhu jejího vývinu (ontogeneze), ale též během 24 hodin, což dokazuje jejich aktivní zapojení do látkové výměny [30, 31].

#### 3.1 Způsoby získávání rostlinných silic

Silice se získávají z rostlinných surovin nejčastěji těmito technologickými postupy:

1. Silice se obvykle izolují z rostlinného materiálu pomocí techniky zvané destilace s vodní párou. Rozdrobená droga se v destilační nádobě přelije vodou a do směsi se vhání vodní pára. Páry se vhánějí do chladiče, kde kondenzují, kondenzát se zachycuje a posléze se oddělí silice od vodné vrstvy (např. v dělicí nálevce). Silice je většinou lehčí než voda, a proto tvoří vrchní vrstvu, ale nesmíme zapomenout na výjimky – silice, obsahující mnoho fenolických látek (např. silice hvozdíková a skořicová) [28].

2. Extrakcí nepolárními rozpouštědly např. benzínem, petroléterem za tepla. Takto získaná silice je označována jako konkrétní neboli konkret. „Konkrétní“ silice obsahuje vedle vonných látek ještě látky balastní, zejména vosky. Ty se oddělují jejich rozpuštěním v teplém lihu a vymrazením. Po odstranění balastních látek je silice označována jako absolutní.
3. Další možností je extrakce z květů do tuku (tzv. enfleuráž). Enfleuráž může být provedena za studena bezpachým tukem, nejčastěji vepřovým sádlem nebo za tepla macerací horkým tukem. Enfleuráž se vyplatí jen u vzácných silic, např. u silice z květů jasmínu (*Jasminum*, *Oleaceae*) nebo bělokvětu hlíznatého, známého jako tuberóza (*Polyanthes tuberosa*). Z tuku se po enfleuráži silice extrahuje organickými rozpouštědly. Vysoce kvalitní silice se získávají extrakcí pomocí oxidu uhličitého. CO<sub>2</sub> je udržován pod tlakem v kapalném stavu v uzavřeném systému s rostlinnou drogou, ze které se uvolňuje silice.
4. Lisováním se získávají silice z citrusů (pomeranče, citronu, mandarinky, grapefruitu), které jsou velmi citlivé a již za teploty 100 °C podléhají zkáze a nedají se tedy kvalitně získávat destilací s vodní párou [30, 31].

### 3.2 Stálost silic

Esenciální oleje jsou často charakterizovány svou těkavostí do tří klasifikačních kategorií: vysoce těkavé, středně těkavé a nízce těkavé. Tyto termíny souvisí s rychlostí, s jakou se olej vypaří a s tím, jak dlouho vůně vydrží.

1. Těkavost vysoká – silice vyprchá do prostoru do 24 hod. (např. eukalyptus, máta peprná).
2. Těkavost střední – silice vyprchá do 48 hod. Do této kategorie se řadí většina silic (např. levandule, fenykl, geranium).
3. Těkavost nízká – silice vyprchá do jednoho týdne (např. jasmín, růže, nerol, vetiver, hřebíček) [31].



### 3.3 Využití koření obsahující silice

- Prostředky dráždicí kůži - do této skupiny se řadí silice s vyšším obsahem pinenů, cineolu, karvakrolu, citronalalu a limonenu. Na kůži vyvolávají pocit tepla a z červenání. Jsou součástí složky mastí používaných při revmatismu a neuralgických bolestech
- Antiflogistika - jsou prostředky, které zmírňují záněty a mají antiseptický účinek. Jsou obsaženy např. v heřmánkové silici jako terpeny  $\alpha$ -bisabolol, chamazuleny a  $\beta$ -farnezen.
- Expektorancia - podporují v dýchacím ústrojí sekreci hlenů, a proto podporují vykašlávání a snižují dráždivost ke kašli. Využívají se často jako inhalační prostředky. Patří sem silice kosodřevinová (*Oleum pini pumilionis*), eukalyptová silice. K ústnímu požití slouží silice fenyklová, anýzová a tymiánová.
- Stomachika - jsou látky, podporující chuť k jídlu jednak slabým drážděním žaludeční sliznice, která tak vylučuje více žaludečních šťáv a také svoji vůní a chutí. Patří sem zejména aromatické a ostře chutnající drogy, používané jako kořeniny.
- Karminativa - jsou látky, které působí zejména proti nadměrné plynatosti střev. Na střeva působí protikřečově a desinfekčně. Tento účinek mají zejména plody kmínu, fenyklu, anýzu a koriandru, květy heřmánku, nať máty peprné a nať dobromyslu.
- Diuretika - některé rostlinné silice působí též mírně močopudně. Tento účinek mají např. plody a silice z jalovce (*Oleum juniperi*) nebo plody a kořen petržele (*Radix petroselini*).
- Dezinfekční a antiseptické prostředky - mnohé siličné drogy a silice působí proti parazitům, červům a infekcím. Nejrapidnější je tento účinek u silic, obsahujících tymol, eugenol, cineol a karvakol. Konkrétně např. list buku (*Folium bucco*) působí desinfekčně na močové cesty, peroxid askaridol z merlíku má odčervující účinky, proti hmyzu působí některé terpeny, proto se některé drogy používají jako repelenty (např. kafr, terpentýn, mátová a citronelová silice). Jejich nevýhodou je poměrně krátká účinnost, silný pach a časté projevy kožních alergií [28, 31, 32].

### 3.4 Silice v potravinářství

Některé silice tvoří hlavní účinnou složku různých koření v potravinářství. Ochucují pokrmy, působí příznivě na organoleptické vlastnosti potravin, a tím zpříjemňují i požitek z jídla. Využívá se zároveň i jejich příznivý účinek na zažívání, hlavně na trávení. Koření tedy řadíme mezi karminativa.

Do oblasti potravinářského průmyslu patří rovněž výroba nápojů. Silice tam mají význam jako základní chuťové a vonné složky, a to v nealkoholických i alkoholických nápojích. Silice nebo jejich jednotlivé vonné složky se rovněž používají k aromatizaci cukrářských výrobků, sladkostí, čokolády a tabáku [32].

### 3.5 Chemické složení

Nejčastěji se jedná o složité směsi látek, které mohou obsahovat okolo 20 - 60 složek v různých koncentracích. Rostlinné silice obsahují obvykle dvě až tři složky ve vyšších koncentracích (20 – 70 %). Např. karvakrol (30 %) a tymol (27 %) jsou hlavní složkou rostlinné silice *Origanum compactum*. Linalol (68 %) je součástí *Coriandrum sativum*,  $\alpha$  a  $\beta$ -thujen a camphora (24 %) jsou součástí *Artemisa herba-alba*, 1,8-cineol (50 %) je součástí *Cinnamomum camphora* [29].

Silice jsou nejčastěji tvořeny terpeny, zejména monoterpenickými uhlovodíky, aldehydy, alkoholy, ketony, kyselinami, estery, nebo seskviterpeny. Podle převládajícího typu složek lze silice rozdělit do skupin, obsahujících:

#### 3.5.1 Aldehydy

Aldehydy se v silicích vyskytují jako acyklické např. monoterpeny citral a geranial. Mezi aromatické aldehydy patří benzaldehyd, aldehyd kyseliny skořicové a vanilin [17, 28].

#### 3.5.2 Alkoholy

Alkoholy se vyskytují v silicích jako acyklické, zejména geraniol, linalol a citronelol ze silice růžové (*Oleum rosae*) a geraniové (*Oleum geranii*). Dále se mohou alkoholy vyskytovat ve formě monocyklické, jako je mentol ze silice mátové (*Oleum menthae piperitae*) a bicyklické, jako je borneol ze silice rozmarýnové (*Oleum rosmarini*) [17, 28].

### 3.5.3 Estery

Estery jsou zejména octany terpineolu, borneolu nebo geraniolu, vyskytující se v citronelové silici (*Oleum citronellae*). Dalším esterem je methylsalicylát, který se vyskytuje v silici druhu *Gaultheria procumbens* [17].

### 3.5.4 Fenoly a fenolické étery

Mezi nejvýznamnější fenoly patří eugenol a tymol ze silice hřebíčkové (*Oleum caryophylli*) a tymiánové (*Oleum thymi*) a karvakrol ze silice kmínové (*Oleum carvi*). Fenolickými étery jsou např. anetol z plodů anýzu a fenyklu a safrol ze silice badyánové (*Oleum anisi stellati*) [28].

### 3.5.5 Ketony

Ketony mohou být v silicích monocyklické, např. iron v silici kosatce (*Oleum iridis*), menton ze silice mátové (*Oleum menthae piperitae*) nebo karvon z kmínové silice (*Oleum carvi*). Mezi nejvýznamnější bicyklické ketony patří pravděpodobně kafr [17, 28].

### 3.5.6 Uhlovodíky

Uhlovodíky se vyskytují prakticky ve všech silicích. Jsou to jednak uhlovodíky acyklické, zejména myrcen a ocimen, vyskytující se v silicích některých druhů rodu *Ocimum*, dále monocyklické monoterpeny, zejména limonen, vyskytující se v silici citronové (*Oleum citri*),  $\alpha$ -terpinen, vyskytující se v silici koriandrové (*Oleum coriandri*),  $\alpha$ -felandren, vyskytující se v silici fenyklové (*Oleum foeniculi*) a eukalyptové (*Oleum eucalypti*). Dalšími možnými uhlovodíkovými složkami silic jsou bicyklické monoterpeny, kam patří např.  $\alpha$ -pinen ze silice terpentýnové (*Oleum terebinthinae*) a seskviterpeny jako je např. chamazulen ze silice heřmánkové (*Oleum chamomillae*) [17, 28].

## 3.6 Antimikrobiální vlastnosti silic

Antimikrobiální aktivita rostlinných silic je obecně známa. Z různých výzkumů vyplývá, že nevyšší účinnost má dobromysl/hřebíček/koriandr/skořice > tymián > máta > rozmarýn > hořčice > šalvěj.

Vzhledem k tomu, že rostlinné silice obsahují velké množství různých chemických sloučenin, nelze antimikrobiální aktivitu připisovat pouze jedné sloučenině. Obecně se k látkám s nejvyšší antimikrobiální aktivitou řadí eugenol, tymol a karvakrol. Mezi mechanismy působení silic na bakteriální buňku můžeme zařadit degradaci buněčné stěny, poškození plazmatické membrány, poškození membránových proteinů, prosakování složek plazmy, koagulace cytoplazmy a ztráta protonmotivní síly [17].

Antimikrobiální účinky rostlinné silice z dobromyslu (*Origanum vulgare*) byly testovány na uzenině. Nejprve byly vyhodnoceny MIC rostlinné silice na devět různých bakterií *in vitro*. Následně byla použita nejvyšší MIC (0,69 mg/g) a ta byla ještě 2x (1,725 mg/g) a 5x (3,45 mg/g) zvýšena. Tyto koncentrace byly aplikovány na uzenině. Výsledky ukázaly, že tato koncentrace snížila počet buněk o 1,19 log CFU/g oproti kontrole po 35 dnech, koncentrace 1,725 mg/g snížila počet buněk o 1,6 log CFU/g a koncentrace 3,45 mg/g redukovala buňky dokonce o 4,35 log CFU/g [33].

V jiné studii byl sledován vliv rostlinné silice z dobromyslu (*Origanum minutiflorum*) na bakterie rodu *Campylobacter* rezistentní na ciprofloxacin. Účinek silice byl testován na živných půdách difúzní metodou. Rostlinná silice prokázala antibakteriální účinek na všechny testované bakterie. Byl také prokázán nejvyšší inhibiční účinek s nejnižší koncentrací (7,8 µl/ml) na *Campylobacter lari* [34].

Rostlinné silice z *Origanum minutiflorum*, *Laurus nobilis*, *Lavandula stoechas* a *Foeniculum vulgare* byly testovány proti patogením bakteriím *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* a *Staphylococcus aureus*. Výsledky ukázaly, že inhibiční účinek rostlinných silic je různý. Rozdílné inhibiční účinky mohou být způsobeny různým složením hlavních složek rostlinných silic. Nejvýraznější inhibiční účinek vykazoval *Origanum minutiflorum* a nejméně *Lavandula stoechas* [35].

Antimikrobiální aktivita byla také sledována *in vitro* u etanolových extraktů z rostlin *Salvia cryptantha*, *Origanum acutidens* a *Thymus sipyleus* ssp. *sipyleus* na patogenní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* a na kvasinku *Candida albicans*. Všechny rostlinné extrakty vykazovaly antibakteriální účinek proti gramnpozitivní bakterii *S. aureus* a kvasinkám. Pouze u extraktu z tymiánu byl antibakteriální efekt na kvasinky velmi malý. Na gramnegativní bakterie nebyl antibakteriální účinek silic dostačující [36].

Rozdílnost inhibičního účinku silic na grampozitivní a gramnegativní bakterií byl sledován také ve studii Pasqua a kol. (2005) [37]. V této studii bylo použito 12 různých rostlinných silic na spektrum grampozitivních a gramnegativních bakterií. Bylo prokázáno, že MIC u grampozitivních bakterií byly vyšší než u gramnegativních bakterií [37].

Vliv rostlinných silic z *Origanum majorana* byl testován *in vitro* na několik druhů bakterií a byly stanoveny MIC. Poté byly silice aplikovány na čerstvou klobásu, která byla uměle zaočkována bakterií *Escherichia coli*. Výsledky ukázaly, že koncentrace nižší než MIC mají bakteriostatický efekt, zatímco baktericidní efekt byl sledován u vyšších koncentrací, které ale byly příčinou změny chuti produktu [38].

Antimikrobiální účinky rostlinných silic byly také sledovány na kvasinkách. Účinky rostlinné silice *Origanum vulgare* byly testovány na řadu kvasinek. Výsledky ukázaly, že všechny kvasinky jsou rostlinou silicí inhibovány. U všech kvasinek došlo k inhibici při koncentraci 10  $\mu\text{l/ml}$ , ale u *Pichia minuscula* došlo k inhibici již při koncentraci 5  $\mu\text{l/ml}$  [39].

Rostlinná silice z *Thymus revolutus* byla testována na kvasinky *Torulopsis holmii*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans* a *Saccharomyces cerevisiae*. Výsledky ukázaly, že téměř všechny kvasinky jsou inhibovány. Pouze kvasinka *Torulopsis holmii* nebyla inhibována ani při nejvyšších koncentrací [40].

Rostlinné silice z tymiánu, hřebíčku a dobromyslu byly testovány *in vitro* na plísně *Aspergillus niger* a *Aspergillus flavus*. Rostlinná silice z dobromyslu při koncentraci 4  $\mu\text{l}/18\text{ ml}$  zcela inhibovala růst. U hřebíčku došlo k inhibici při koncentraci 6  $\mu\text{l}/18\text{ ml}$  a tymián byl neúčinnější při koncentraci 8  $\mu\text{l}/\text{ml}$ . Vždy došlo k inhibici obou plísní [41].

Jiná studie se zabývá také plísněmi *Aspergillus niger* a *Aspergillus flavus*. Byl sledován fungicidní účinek rostlinných silic z citronu, mandarinky, grapefruitu a pomeranče. U všech silic došlo k inhibici růstu plísní při koncentraci 0,94 % [42].

## 4 MIKROFLÓRA POVRCHU DRŮBEŽE

Obecně se na povrchu drůbežího masa vyskytují zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Campylobacter*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Brochothrix*, *Listeria*, některé plísně a kvasinky [43].

### 4.1 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Tato čeleď zahrnuje gramnegativní nesporulující fakultativně anaerobní tyčinkovité bakterie většinou pohyblivé peritrichálními bičíky. Většina těchto bakterií žije ve střevech obratlovců, odkud se dostávají do okolního prostředí, odpadních vod a hnojené půdy. Některé bakterie způsobují gastrointestinální i jiná onemocnění člověka a zvířat [44, 45].

#### 4.1.1 Rod *Escherichia*

Z hygienického hlediska je nejdůležitější rod *Escherichia*, jehož jednotlivé druhy jsou obyvateli střevního traktu různých živočichů. *Escherichia coli* je jedním z nejvýznamnějších zástupců střevní mikroflóry a její přítomnost je nezbytná pro správný průběh trávicích procesů ve střevě teplokrevných živočichů.[46, 47].

*E. coli* zkvašuje cukry za intenzivní tvorby kyselin a plynu. Např. z glukózy, laktózy, některých pentóz a alkoholických cukrů tvoří především kyselinu mléčnou, pyrohroznovou, octovou a mravenčí, přičemž část kyseliny mravenčí se rozkládá na oxid uhličitý a vodík [47].

Patogenní kmeny *E. coli* vyvolávají 2 typy onemocnění [45]:

- a) extraintestinální (zejména močových cest, septická onemocnění, infekce ran, hnisavé procesy);
- b) v intestinálním traktu infekce provázené průjmy (určité kmeny).

#### 4.1.2 Rod *Salmonella*

Patří sem tyčinky, jež zkvašují glukózu, maltózu a manitol. Jde o potenciálně patogenní bakterie střevního ústrojí zvířat a člověka, u nichž způsobují septická onemocnění, gastroentritidy a sekundární infekce [44]. Salmonely jsou schopné dlouhodobě přežít ve vnějším prostředí. Jejich rozmnožování je limitováno vhodnou vlhkostí, teplotou, pH

a přítomností živin v prostředí. Salmonely rostou v rozmezí teplot 8 - 44,5 °C. Vyšší teploty (nad 70 - 80 °C) je rychle ničí [48].

Podle genetické analýzy bylo zjištěno, že rod obsahuje jediné genospecies, označené *Salmonella enterica*. Tento druh se člení na 7 subspecies, z nichž pro člověka patogenní kmeny patří do subspecies I. Ostatní subspecies (II-VII) zahrnují patogeny a parazity studenokrevných [45].

## 4.2 Čeleď *Moraxellaceae*

Gramnegativní bakterie čeledi *Moraxellaceae* mají tyčovitý až kulovitý tvar. Jedná se o psychrofilní nebo mezofilní bakterie, které osídlují sliznici člověka a zvířat, vyskytují se také v půdě, vodě, potravinách a na kůži [49].

### 4.2.1 Rod *Acinetobacter*

*Acinetobacter* se řadí do čeledi *Moraxellaceae* spolu s rody *Moraxella*, *Psychrobacter* a dalšími příbuznými rody. Jsou striktně aerobní mikroorganismy. Velmi dobře rostou při teplotě 20 - 35 °C, ale některé druhy mohou růst i při 5 °C [49].

Mezi její hlavní diagnostické znaky patří kataláza pozitivní, oxidáza negativní, rezistentnost vůči penicilinu, neredukuje nitráty a má bílé hladké kolonie, které jsou bez pigmentu [49, 50].

## 4.3 Čeleď *Pseudomonadaceae*

Striktně aerobní rovné nebo mírně zahnuté gramnegativní tyčinky s respiratorním typem metabolismu. Rostou v rozmezí 4 - 43 °C. Z biochemických vlastností lze uvést jen tvorbu katalázy a velmi častou pozitivní oxidázovou reakci [44].

### 4.3.1 Rod *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* se pohybuje polárně nebo laterálně situovanými bičíky. Rostou na běžných půdách, ale kultivační teploty se mohou různit, protože existují mezofilní i psychrofilní druhy. V přírodě jsou značně rozšířené a vyskytují se i na kůži lidí a zvířat. Jsou značně rezistentní vůči desinfekčním prostředkům, většina druhů je silně proteolytická a lipolytická [51, 44, 52].

*Pseudomonas fragi* je proteolytická a lipolytická nefermentující tyčinka. Hraje klíčovou roli v kažení potravin živočišného původu. Tvoří často mikroflóru čerstvých a zkažených potravin z masa, drůbeže a ryb [49].

Podle literatury je až 61 % pseudomonád vyskytující se na mase *P. fragi* a na vepřovém mase se vyskytuje *P. fragi* ze 76 – 79 % . *P. fragi* roste při minimálním pH 5,0 až 5,3 a inhibici růstu způsobuje 10% koncentrace CO<sub>2</sub> [49].

## 4.4 Čeleď *Staphylococcaceae*

Jedná se o novou čeleď navrženou v roce 2001 na základě srovnání bází při sekvencování 16S rDNA u několik rodů grampozitivních koků patřících mezi bakterie s nízkým obsahem G + C [52].

### 4.4.1 Rod *Staphylococcus*

Rod *Staphylococcus* je v současné době řazen do samostatné čeledi *Staphylococcaceae*. Do rodu *Staphylococcus* bylo doposud zařazeno kolem 40 druhů a poddruhů. Stafylokoky jsou charakterizovány jako grampozitivní bakterie, nesporulující, nepohyblivé a většinou neopouzdržené sférické koky. Z širokého spektra biochemických vlastností se sledují především schopnosti aerobního štěpení cukrů a tvorby proteolytických enzymů. Zvláštní význam má průkaz koagulázy [44, 45].

*Staphylococcus aureus* způsobuje angínu, hnisavé onemocnění kůže, hnisání ran a hnisavé onemocnění poraněných kostí. Bakterie produkuje enterotoxin, který se vyskytuje v šesti antigenních formách A až E. Enterotoxin vyprodukovaný za vhodných podmínek v potravině vyvolává alimentární intoxikaci. Za většinu stafylokokových otrav je odpovědný enterotoxin A [53].

## 4.5 Kvasinky

Kvasinky snadno štěpí především sacharidy, mohou rozkládat i organické kyseliny a tuky, mnohem méně dusíkaté látky, zejména bílkoviny masa. Jejich význam jako mikroflóry masa je menší než u bakterií, i když jejich nález na mase je častý. Mezi nejčastěji vyskytující se kvasinky patří *Debaryomyces*, *Sacharomyces*, *Cryptococcus* a *Trichosporon* [49, 44].



Rod *Cryptococcus* zahrnuje kvasinky s kulatými, elipsovými nebo polymorfními buňkami, které multilaterálně pučí, tvoří pseudomycelium nebo jen rudimentární. *Cryptococcus neoformans* vytváří sliznaté kolonie, neboť má silnou vrstvu pouzdra. Důležitým diagnostickým znakem je schopnost utilizace inositolu [54].

Rod *Trichosporum* tvoří typické bohaté mycelium, na němž pučí buňky různých tvarů. Mycelium se může u některých rodů rozpadat v artrospory a některé druhy tvoří vegetativní endospory. Obsahuje 15 druhů, z nichž některé jsou za určitých podmínek patogenní pro člověka [47].

## 4.6 Plísně

U masa jejich podhoubí neproniká zpravidla hlouběji než 2 – 5 mm. Na výživu jsou méně náročné než bakterie a mohou růst nejen v chladárnách při teplotách kolem 0 °C, ale i v mrazárnách do teploty - 10 až - 12 °C. Z velmi široké škály plísní bývají na mase zastoupeny rody *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Rhizopus* a další [49, 44].

Rod *Alternaria* se vyskytuje na rostlinách a jako vzdušná kontaminace v mlékárnách, mlékařských sklepech a na stěnách pivovarských místností. *Alternaria* má vláknité mikromycety, které se na kultivačních médiích vyznačují rychlým růstem a tvoří zpočátku bílé, později šedé až olivově hnědé kolonie. Některé kmeny produkují mykotoxiny. Zástupci rodu *Alternaria* mohou také způsobit mykotické infekce člověka. Nejčastěji je uváděna *Alternaria alternata*, která se přirozeně vyskytuje na rostlinných zbytcích. Vyvolává feohyfo mykózu, postižení subkutánní tkáně, která se obvykle rozvíjí následkem traumatu [47, 55].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

1. stanovit antimikrobiální aktivitu vybraných rostlinných silic;
2. sledovat antimikrobiální účinek vybrané nejúčinnější rostlinné silice na mikroflóru chlazené drůbeže v průběhu tří dnů skladování.

## 6 MATERIÁL A METODIKA

### 6.1 Použité přístroje a pomůcky

- Biohazard box EUROFLOW (Clean Air), Holandsko
- Biologický termostat 30 °C – Laboratorní přístroje Praha, Česká republika
- Autokláv 135 S, H+P VARIOKLAV H+P Labortechnik AG, Německo
- Digitální váha KB 800-2, KERN&Sohn GmbH, Německo
- Chladnička Electrolux ERC 2521, Praha
- Laboratorní sklo
- Mikropipety – 3 – 5000 µl BIOHIT
- Laboratorní sušárna MEMMERT UNB 400, Fischer Scientific, spol. s r.o., Pardubice

### 6.2 Kultivační půdy

- Endo agar (výrobce HiMedia Laboratories Pvt., India)
- Potato dextrose agar (výrobce HiMedia Laboratories Pvt., India)
- Plate count agar (výrobce HiMedia Laboratories Pvt., India)
- Sabouraud agar (výrobce HiMedia Laboratories Pvt., India)
- Masopeptonový agar (Tab. 1)

Tabulka 1: Složení masopeptonového agaru

Složení půdy	Množství [g/l]
masový výtazek	3,0
pepton	5,0
NaCl	3,0
agar	15,0

- Masopeptonový bujón (Tab. 2)

*Tabulka 2: Složení masopeptonového bujónu*

Složení půdy	Množství [g/l]
masový výtažek	3,0
pepton	5,0
NaCl	3,0

- Cibulový agar (Tab. 3)

*Tabulka 3: Složení cibulového agaru*

Složení půdy	Množství [g/l]
cibule	250,0
glukóza	0,5
agar	15,0

- Médium pro důkaz tvorby pouzdrového polysacharidu (Tab. 4)

*Tabulka 4: Složení média pro důkaz tvorby pouzdrového polysacharidu*

Složení půdy	Množství [g/l]
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	5,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,5
glukóza	10,0
kvasničný autolyzát	0,5

- Médium pro zjištění asimilace uhlíku (Tab. 5)

Tabulka 5: Složení média pro zjištění asimilace uhlíku

Složení půdy	Množství [g/l]
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	5,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,5
glukosa	10,0
kvasničný autolyzát	1,0

- Médium pro fermentaci cukrů (Tab. 6)

Tabulka 6: Složení média pro fermentaci cukrů

Složení půdy	Množství [g/l]
masový výtažek	3,0
pepton	10,0
NaCl	5,0
bromkresolová červeň	1,0 ml

### 6.3 Chemikálie a roztoky

- Fyziologický roztok
  - Chlorid sodný (dodavatel Ing. P. Lukeš, Česká republika)
  - Příprava roztoku – 8,5 g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a sterilováno při 121 °C po dobu 15 min.
- D – glukóza (Lachema n.p. Brno)
- D – laktóza monohydrát (Lachema n.p. Brno)
- Sacharóza (Chemapol Praha)
- D - galaktóza (Lachema n.p. Brno)

## 6.4 Použité bakteriální kmeny

Byly použity sbírkové bakteriální, kvasinkové a plísňové kmeny, dále byly použity bakteriální kmeny izolované z chlazených nebalených kuřat od firmy Raciola Jehlička s.r.o. (Tab. 7), v období únor - březen 2006. Všechny kmeny byly poskytnuty Ústavem technologie a mikrobiologie potravin FT UTB ve Zlíně.

Tabulka 7: Izolované bakteriální kmeny z chlazených nebalených kuřat v období únor - březen 2006

Izolovaná bakterie	Sbírkové číslo	Izolovaná bakterie	Sbírkové číslo
<i>Serratia marcescens</i>	3	<i>Pantotea</i>	21
<i>Serratia liquefaciens</i>	48	<i>Enterococcus faecium</i>	105
<i>Pseudomonas fragi</i>	9	<i>Staphylococcus aureus</i>	14
<i>Klebsiella</i>	2	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Acinetobacter</i>	8	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	17		

## 6.5 Použité rostlinné silice

V této diplomové práci bylo pracováno se 4 druhy rostlinných silic: hřebíček, bobkový list (Tab. 8) a dva druhy dobromyslu (*Origanum minutiflorum* (Tab. 9) a *Origanum dubium*), které byly poskytnuty z univerzity Mustafa Kemal v Turecku. U dvou silic (Tab. 8, 9) bylo stanoveno jejich přesné složení metodou GC – MS [35].

Tabulka 8: Chemické složení rostlinné silice bobkového listu [35]

	složení	%		složení	%
<b>1</b>	$\alpha$ -pinen	6,11	<b>7</b>	Terpinen-4-ol	3,29
<b>2</b>	sabinen	12,12	<b>8</b>	$\alpha$ -terpineol	2,04
<b>3</b>	$\beta$ -terpinen	0,06	<b>9</b>	$\alpha$ -terpinen	12,53
<b>4</b>	1,8-cineole	60,72	<b>10</b>	eugenol	0,53
<b>5</b>	$\gamma$ -terpinen	1,04	<b>11</b>	$\beta$ -karyofylen	0,40
<b>6</b>	linalol	0,73	<b>12</b>	methyl eugenol	0,68

Tabulka 9: Chemické složení rostlinné silice *Origanum minutiflorum* [35]

	složení	%		složení	%
1	$\alpha$ -thujen	0,50	10	terpineol-4	0,18
2	$\alpha$ -pinen	1,39	11	karvakrol metyléter	0,73
3	camphen	0,67	12	karvakrol	68,23
4	$\beta$ -pinen	0,31	13	$\alpha$ -humulen	0,22
5	myrcen	0,47	14	$\beta$ -karyofylen	3,44
6	$\alpha$ -terpinen	1,00	15	aromadendren	0,36
7	cymen	11,84	16	ledene	0,28
8	$\gamma$ -terpinen	8,14	17	$\beta$ -bisabolen	0,21
9	linalol	2,15			

## 6.6 Stanovení antibakteriální aktivity

Antibakteriální aktivita byla stanovena diskovou difúzní metodou. Na Petriho misku s MPA bylo napipetováno 100  $\mu$ l 24 hodinové bakteriální kultury, která byla rozetřena sterilní hokejkou. Následně byl na misku položen sterilní disk z papíru o průměru 5 mm, který byl napuštěn 3  $\mu$ l příslušné rostlinné silice. Misky byly kultivovány při 30 °C a po 24 hodinách byly odečítány inhibiční zóny. Vše bylo opakováno třikrát.

## 6.7 Stanovení antimikrobiální aktivity vůči kvasinkám

Antimikrobiální aktivita vůči kvasinkám byla stanovena obdobně jak u bakterií diskovou difúzní metodou. Kvasinková kultura byla sterilní kličkou rozmíchána v malém množství fyziologického roztoku. 100  $\mu$ l kvasinkové suspenze bylo napipetováno na Petriho misku s půdou SAB pro kvasinky a byla sterilně rozetřena hokejkou. Následně byl na misku položen sterilní disk z papíru o průměru 5 mm, který byl napuštěn 3  $\mu$ l příslušné rostlinné silice. Misky byly kultivovány při 25 °C a po 24 hodinách byly odečítány inhibiční zóny. Vše bylo opakováno třikrát.



## 6.8 Stanovení antimikrobiální aktivity vůči plísním

Antimikrobiální aktivita vůči plísním byla stanovena agarovou diluční metodou. Testované rostlinné silice byly přidány do media (PDA) při 40 – 45 °C, tak aby v 18 ml media byly 3 µl příslušné rostlinné silice. Následně byla do misek ihned aplikována 5ti denní plísňová kultura ve formě disku o průměru 5 mm. Misky byly kultivovány při 25 °C a po 3, 5, 7, 10, 14, 18 dnech byly změřeny zóny. Vše bylo opakováno třikrát.

## 6.9 Aplikace rostlinné silice na povrch chlazených kuřat

### 6.9.1 Původ vzorků

Veškeré vzorky čerstvých celých jatečně opracovaných nebalených kuřat pro analýzu byly zakoupeny z obchodní sítě od firmy Raciola Jehlička s.r.o.

### 6.9.2 Aplikace rostlinné silice metodou postřiku

Kuře bylo pro analýzu sterilně rozpůleno na dvě poloviny. První polovina sloužila pro aplikaci rostlinných silic a druhá polovina jako kontrola, kdy byla aplikována sterilní destilovaná voda.

Na kuřecí půlku sloužící jako vzorek bylo ze vzdálenosti 30 – 50 cm aplikováno pomocí rozprašovače roztok rostlinné silice a vody (13 ml H<sub>2</sub>O a 300 µl rostlinné silice) po dobu dvou minut. Vzorek se nechal oschnout a byl uchováván ve sterilním alobalu při 8 °C. Na kontrolu bylo po dobu dvou minut aplikována sterilní destilovaná voda. Kontrola se nechala oschnout a uchovávala se ve sterilním alobalu při 8 °C.

### 6.9.3 Odběr vzorků pro analýzu

Pomocí pinzety a nůžek bylo sterilně odebráno ze vzorku cca 10 g kůže, ta byla dána do mikrotenového sáčku se 100 ml sterilního fyziologického roztoku. Sáček se umístil do homogenizátoru, kde po dobu 5 minut proběhla homogenizace. Stejný postup byl i při odbírání vzorku z kontroly. Při odběru všech vzorků se pracovalo asepticky a používaly se sterilní nástroje.

Následně bylo ze získané suspenze provedeno desítkové ředění a to až do stupně, ve kterém je možné stanovit předpokládaný počet mikroorganismů v 1 g zkoumaného vzorku.

Poté bylo na Petriho misku s příslušnou půdou napipetováno 100  $\mu$ l vzorku příslušného ředění a inkubováno v odpovídající teplotě. Kuřecí půlky byly uchovány při teplotě 8 °C po dobu 3 dnů a každý den byly odebrány vzorky pro analýzu. Po kultivaci byly spočítány narostlé kolonie a výsledek byl přepočítán na log CFU/g.

Při testování byly použity půdy:

Plate count agar (PCA) - pro stanovení celkového počtu mikroorganismů, kultivace probíhala při 30 °C 24 hodin

- pro stanovení psychrotrofních mikroorganismů, kultivace probíhala při 8 °C 7 dní

Endo agar - pro stanovení koliformních bakterií, kultivace probíhala při 37 °C 24 hodin

Sabouraud agar (SAB) – pro stanovení kvasinek a plísní, kultivace probíhala při 25 °C 3 dny

## 6.10 Identifikace kvasinek

Vybrané kvasinkové kolonie byly izolovány ze Sabouraud agaru po kultivaci vzorku chlazené drůbeže. Úkolem identifikace kvasinkové kultury je stanovení příslušnosti studovaného kmene k určité taxonomické skupině. Při identifikaci se sleduje několik skupin vlastností: morfologické, kultivační, sexuální a fyziologické.

### 6.10.1 Princip jednotlivých identifikačních testů

#### Asimilace různých zdrojů uhlíku

Schopnost využívat za aerobních podmínek cukry jako zdroj energie a materiál pro syntézu buněčné hmoty se prokazuje auxanografickou metodou nebo v tekuté půdě. Asimilační testy v tekuté půdě dávají přesnější výsledky než testy na agarové plotně, neboť zachycují i velmi pomalé využívání substrátu. Testy se provádí s glukózou, sacharózou, galaktózou, maltázou a laktázou [56].

### **Kvašení cukrů**

Kvasinky zkvašují některé jednoduché cukry za vzniku etanolu a oxidu uhličitého, vedle toho vzniká malé množství glycerolu a sukcinátu. Ke zkvasitelným cukrům patří především cukry se základní hexózovou jednotkou, přímo zkvasitelné jsou pouze monosacharidy. Disacharidy a trisacharidy zkvašují pouze kvasinky vybavené příslušnými hydrolytickými enzymy [54].

### **Důkaz pouzdrového polysacharidu**

Kličkou byl zaočkován agar pro důkaz tvorby pouzdrového polysacharidu. Po kultivaci byl nárůst přelit Lugolovým roztokem. Přítomnost polysacharidu se projeví zmodráním nátěru [56].

### **Tvorba pseudomycelia**

Tvorbu a charakter pseudomycelia pozorujeme pod mikroskopem na okraji kolonií vyrostlých na cibulovém agaru [54].

## **6.11 Statistické vyhodnocení**

K statistickým výpočtům pro bakterie, kvasinky a plísně byl proveden obecný lineární model (GLM), který nabízí vysokou flexibilitu při popisu vztahů mezi závislou a nezávislými proměnnými. GLM lze navíc použít např. pro opakovaná měření, smíšené modely, výpočty na základě čtyř typů součtů čtverců.

Pro statistické vyhodnocení u mikroflóry drůbeže byl použit klasický T- test. Test je založen na skutečnosti, že výběrový průměr z normálního rozdělení, od něhož se odečte střední hodnota tohoto rozdělení a rozdíl se vydělí výběrovou směrodatnou odchylkou, má T rozdělení.

Testy byly provedeny na 5% hladině významnosti (tj. s 95% spolehlivostí), což znamená, že maximální pravděpodobnost chyby prvního druhu (zamítnutí správné hypotézy) je 5 %.

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 7.1 Stanovení antibakteriální aktivity

#### 7.1.1 Aplikace rostlinných silic na sbírkové bakteriální kmeny

Antimikrobiální účinky rostlinných silic z hřebíčku, *Origanum minutiflorum*, *Origanum dubium* a bobkového listu byly testovány na sbírkové bakterie *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus* a *Staphylococcus aureus*. Z naměřených hodnot bylo provedeno statistické vyhodnocení.

Tabulka 10: Antimikrobiální aktivita rostlinných silic diskovou difúzní metodou pro sbírkové bakterie při aplikaci 3 ul/disk

sbírkové bakterie	Inhibiční zóny (mm) <sup>a</sup>			
	hřebíček	<i>O.minutiflorum</i>	<i>O. dubium</i>	bobkový list
<i>P. fluorescens</i>	8,17 ± 0,29	14,33 ± 0,58	10,33 ± 1,53	5,50 ± 10,87
<i>E. coli</i>	13,33 ± 5,77	25,00 ± 3,00	24,33 ± 6,03	5,67 ± 1,15
<i>M. luteus</i>	17,00 ± 11,27	23,33 ± 10,41	15,67 ± 8,14	6,67 ± 2,89
<i>S. aureus</i>	10,67 ± 1,15	25,00 ± 3,00	13,00 ± 2,00	6,00 ± 1,00

<sup>a</sup> zahrnuje velikost disku (5 mm)

Z tabulky (Tab. 10) je patrné, že k nejvýraznější inhibici bakterií došlo při aplikaci rostlinné silice z *O. minutiflorum*. Nejcitlivější na tuto silici byla bakterie *E. coli* a naopak nejméně citlivá na silici byla bakterie *P. fluorescens*.

Aplikace rostlinné silice *O. minutiflorum* byla vyhodnocena jako statisticky významná na bakterie *M. luteus* a *S. aureus* oproti ostatním silicím, které nebyly na tyto bakterie tolik účinné. Inhibice je zřetelná na obrázku (Příloha I).

Silice z *O. dubium* a hřebíčku měly také významný antimikrobiální vliv a účinky těchto silic byly patrné u všech bakterií. Silice z bobkového listu neměla téměř žádný inhibiční efekt, i když byl zaznamenán nepatrný rozdíl mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi.

### 7.1.2 Aplikace rostlinných silic na izolované bakteriální kmeny

Dále byly testovány antimikrobiální účinky rostlinných silic z hřebíčku, *Origanum minutiflorum*, *Origanum dubium* a bobkového listu na 11 bakteriálních kmenů (*Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas fragi*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Escherichia coli*, *Pantotea*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*), které byly izolované z chlazených nebalených kuřat. Z naměřených hodnot bylo provedeno statistické vyhodnocení.

Tabulka 11: Antimikrobiální aktivita rostlinných silic diskovou difúzní metodou pro izolované bakterie při aplikaci 3 ul/disk

izolované bakterie	Inhibiční zóny (mm) <sup>a</sup>			
	hřebíček	<i>O.minutiflorum</i>	<i>O. dubium</i>	bobkový list
<i>S. typhimurium</i>	12,67 ± 2,08	26,33 ± 1,53	22,33 ± 2,52	5,00 ± 0,00
<i>S. enteritidis</i>	8,67 ± 1,15	19,00 ± 6,56	9,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00
<i>S. marcescens</i>	8,33 ± 0,58	15,33 ± 2,52	9,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00
<i>S. liquefaciens</i>	9,33 ± 1,15	16,67 ± 2,89	13,00 ± 2,65	5,00 ± 0,00
<i>P. fragi</i>	9,00 ± 1,00	9,67 ± 2,08	10,67 ± 3,79	6,33 ± 2,31
<i>Klebsiella</i>	8,67 ± 1,15	16,67 ± 4,16	14,33 ± 3,06	5,00 ± 0,00
<i>Acinetobacter</i>	19,00 ± 1,00	29,00 ± 1,00	23,33 ± 2,89	11,67 ± 2,89
<i>E. coli</i>	8,33 ± 0,58	7,00 ± 2,00	12,67 ± 2,08	5,33 ± 0,58
<i>Pantotea</i>	6,67 ± 1,53	17,00 ± 2,65	6,67 ± 1,15	5,00 ± 0,00
<i>E. faecium</i>	8,33 ± 0,58	18,00 ± 1,00	9,33 ± 1,15	5,00 ± 0,00
<i>S. aureus</i>	8,67 ± 0,58	20,00 ± 0,00	7,33 ± 0,58	6,67 ± 2,08

<sup>a</sup> zahrnuje velikost disku (5 mm)

Výsledky v tabulce (Tab. 11) ukazují, že všechny rostlinné silice z hřebíčku, *O. minutiflorum* a *O. dubium* mají významný antibakteriální účinek. Nejúčinnější byla silice z *O. minutiflorum*, která měla výrazný antibakteriální vliv oproti jiným silicím. Nejméně citlivá bakterie na *O. minutiflorum* byla *E. coli* což se neshoduje se sbírkovou bakterií, která byla právě nejvíce inhibována. Rozdílnost v citlivosti bakterií na silici může být způsoben původem bakteriálního kmene. Izolovaná *E. coli* byla nejvíce inhibována rostlinnou silicí

z *O. dubium*. Tato silice byla vyhodnocena jako statisticky významná na bakterii *E. coli* oproti ostatním silicím.

Rostlinná silice z *O. minutiflorum* měla největší antimikrobiální vliv na izolovanou bakterii *Acinetobacter*, stejně tak byla tato bakterie citlivá na všechny rostlinné silice včetně bobkového listu. Ten se jevil jako nejméně účinný a inhibiční účinek u ostatních bakterií byl téměř zanedbatelný.

Na bakterie *S. typhimurium*, *S. marcescens* a *Pantotea* byla silice z *O. minutiflorum* vyhodnocena jako statisticky významná oproti ostatním rostlinným silicím.

Rostlinná silice z *O. dubium* měla také významný antimikrobiální účinek. Kromě bakterií *Pantotea* došlo aspoň k částečné inhibici u všech bakterií.

U rostlinné silice z hřebíčku nebyly inhibiční zóny tolik výrazné, ale u všech bakterií bylo patrné, že silice má určitý antimikrobiální efekt.

Během pokusu nebyl zaznamenán žádný výrazný rozdíl mezi citlivostí gramnegativních a grampozitivních izolovaných bakterií na rostlinné silice.

Antimikrobiální účinky *O. minutiflorum* byly sledovány v několika studiích. Dadalioglu a kol. [35] zjistil, že je tato rostlinná silice také účinnější než silice z bobkového listu. Antimikrobiální účinky zde byly sledovány rovněž na bakterie *E. coli*, *S. typhimurium* a *S. aureus*. U všech bakterií byly potvrzeny inhibiční účinky, což se shoduje s mými výsledky.

Rostlinná silice z hřebíčku byla také sledována v řadě studií [58] a i zde byly potvrzeny antimikrobiální účinky silice. V této studii byl také sledován účinek silice z bobkového listu, který vykazoval výrazné antimikrobiální účinky, což se odlišuje od mých výsledků. Rozdílnost antimikrobiální aktivity mohla být způsobena složením a původem rostlinné silice či aplikovanou metodou.

## 7.2 Identifikace kvasinek

Kvasinkové kmeny byly izolovány z kůže chlazené drůbeže. Pouze kvasinka č. 4 byla sbírková a jedná se o *Saccharomyces cerevisiae*. U kvasinek byly provedeny zvolené testy, jejichž výsledky jsou znázorněny v tabulce (Tab. 12). Z uvedených testů nelze jednoznačně

určit, o který rod kvasinek se jedná. Muselo by být provedeno více identifikačních testů. Pouze kvasinku č. 1 lze pravděpodobně zařadit do rodu *Aureobasidium*.

Tabulka 12: Výsledky identifikačních testů pro kvasinky

	<b>Kvasinka č. 1</b>	<b>Kvasinka č. 2</b>	<b>Kvasinka č. 3</b>	<b>Kvasinka č. 4</b>	<b>Kvasinka č. 5</b>
Asimilace laktózy	+	+	-	-	-
Asimilace glukózy	+	+	+	+	-
Asimilace galaktózy	+	+	+	-	-
Asimilace sacharózy	+	+	+	+	+
Pouzdrový polysacharid	-	-	-	-	-
Fermentace laktózy	-	+	-	-	-
Fermentace glukózy	+	+	+	+	+
Fermentace sacharózy	-	+	+	+	-
Pigment	černý	bílý slizový	běžový slizový	bílý hladký	fluoreskující žlutobílý
Vzhled kultury v tekutém médium	černý křís se sedlinou na dně	bílý křís se sedlinou na dně	bílá sedlina na dně	bílá sedlina na dně	bílý křís se sedlinou na dně

### 7.3 Stanovení antimikrobiální aktivity vůči kvasinkám

Antimikrobiální účinky rostlinných silic z hřebíčku, *Origanum minutiflorum*, *Origanum dubium* a bobkového listu byly testovány na sbírkovou kvasinku *Saccharomyces cerevisiae* a 4 kvasinky izolované z chlazených nebalených kuřat. Z naměřených hodnot bylo provedeno statistické vyhodnocení.

Tabulka 13: Antimikrobiální aktivita rostlinných silic diskovou difúzní metodou pro kvasinky při aplikaci 3 ul/disk

	Inhibiční zóny (mm) <sup>a</sup>			
	hřebíček	<i>O. minutiflorum</i>	<i>O. dubium</i>	bobkový list
kvasinka č.1	9,00 ± 1,00	10 ± 1,00	9,67 ± 3,35	6,00 ± 1,00
kvasinka č. 2	10,00 ± 1,00	25,67 ± 0,58	19,33 ± 9,20	7,67 ± 0,58
kvasinka č. 3	11,00 ± 1,00	18,67 ± 0,58	13,00 ± 6,08	9,00 ± 3,00
kvasinka č. 4	9,33 ± 2,52	12,67 ± 2,52	12,33 ± 3,92	8,67 ± 0,58
kvasinka č. 5	12,33 ± 2,52	12,33 ± 0,58	8,67 ± 4,16	10,00 ± 1,00

<sup>a</sup> zahrnuje velikost disku (5 mm)

Podle tabulky (Tab. 13) je zřetelné, že rostlinné silice z hřebíčku, *O. minutiflorum* a *O. dubium* mají antimikrobiální účinky na kvasinky. Opět nejvýznamnější účinek má silice z *O. minutiflorum*, která výrazně redukovala růst u všech kvasinek. U kvasinky č. 2 a č. 3 byla rostlinná silice z *O. minutiflorum* vyhodnocena jako statisticky významná oproti ostatním rostlinným silicím.

Silice z hřebíčku a z *O. dubium* také částečně inhibovaly růst, ale ne tak intenzivně jako *O. minutiflorum*. Jako nejméně účinná silice se jevila silice z bobkového listu, která vykazovala pouze nepatrné inhibiční účinky.

Antimikrobiální účinky rostlinných silic byly sledovány na řadu kvasinek [39, 40]. Rostlinná silice z hřebíčku podle Inouey a kol. [101] inhibovala růst nejčastěji sledované kvasinky *Candida albicans* při koncentraci 400 µg/ml.

Rostlinná silice *O. vulgare* byla testovaná proti řadě kvasinek včetně *S. cerevisiae*. Růst kvasinky *S. cerevisiae* byl zcela inhibován při koncentraci 10 µl/ml [39].

#### 7.4 Stanovení antimikrobiální aktivity vůči plísním

Antimikrobiální účinky rostlinných silic z hřebíčku, *Origanum minutiflorum*, *Origanum dubium* a bobkového listu byly testovány na sbírkové plísni *Penicillium nalgiovensis*, *Penicillium roqueforti* a *Alternaria alternata*. Z naměřených hodnot bylo provedeno statistické vyhodnocení.



#### 7.4.1 Antimikrobiální vliv rostlinných silic na *Penicillium nalgiovensis*

Tabulka 14: Antimikrobiální účinek rostlinných silic na plíseň *Penicillium nalgiovensis* agarovou diluční metodou při aplikaci 3  $\mu$ l/18 ml agaru

den	Velikost plísňové kolonie (mm) <sup>a</sup>				
	Kontrola	hřebíček	<i>O. minutiflorum</i>	<i>O. dubium</i>	bobkový list
0	5,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00
3	14,50 $\pm$ 0,71	15,33 $\pm$ 0,58	5,00 $\pm$ 0,00	12,33 $\pm$ 2,08	14,33 $\pm$ 0,58
5	19,00 $\pm$ 1,41	17,67 $\pm$ 1,53	8,00 $\pm$ 0,00	14,33 $\pm$ 2,08	16,67 $\pm$ 0,58
7	27,50 $\pm$ 3,54	19,33 $\pm$ 0,58	9,33 $\pm$ 0,98	21,00 $\pm$ 3,61	25,33 $\pm$ 5,77
10	30,50 $\pm$ 2,12	23,00 $\pm$ 3,61	11,67 $\pm$ 1,15	23,00 $\pm$ 1,00	25,333 $\pm$ 2,52
14	36,00 $\pm$ 5,66	33,00 $\pm$ 6,24	17,33 $\pm$ 1,53	30,33 $\pm$ 4,04	30,33 $\pm$ 0,58
18	38,50 $\pm$ 4,95	35,00 $\pm$ 5,00	34,00 $\pm$ 1,00	45,67 $\pm$ 3,06	34,33 $\pm$ 2,08

<sup>a</sup> zahrnuje velikost disku s inokulem plísně (5 mm)

Z tabulky (Tab. 14) je zřejmé, že nejvyšší antimikrobiální aktivitu proti *P. nalgiovensis* z rostlinných silic má *O. minutiflorum*, která růst inhibuje zcela během prvních tří dnů. I další dny byly zóny i o polovinu menší oproti kontrole a až poslední den došlo k částečnému vyrovnání. Inhibice je vidět na obrázku (Příloha II). Rostlinné silice z hřebíčku, bobkového listu a *O. dubium* vykazovaly určitý antimikrobiální účinek, ale oproti *O. minutiflorum* byl téměř zanedbatelný.

Rostlinná silice z *O. minutiflorum* byla statisticky vyhodnocena jako nejúčinnější silice ze všech na plíseň *Penicillium nalgiovensis*.

#### 7.4.2 Antimikrobiální vliv rostlinných silic na *Penicillium roqueforti*

Antimikrobiální účinky rostlinných silic byly také sledovány na plísni *P. roqueforti*. Z tabulky (Tab. 15) je patrné, že opět nejvyšší antimikrobiální účinek má rostlinná silice *O. minutiflorum*, která inhibovala výrazně růst plísně téměř po celou dobu kultivace. Hřebíček a *O. dubium* vykazovaly určitou inhibici v prvních 7 dnech kultivace, ale v dalších dnech byla inhibice zcela zanedbatelná. Rostlinná silice z bobkového listu neměla žádný

antimikrobiální vliv na plíseň *P. roqueforti*. I zde byla rostlinná silice z *O. minutiflorum* statisticky vyhodnocena jako nejvýznamnější ze všech silic.

Tabulka 15: Antimikrobiální účinek rostlinných silic na plíseň *Penicillium roqueforti* agarovou diluční metodou při aplikaci 3  $\mu$ l/18 ml agaru

den	Velikost plísňové kolonie (mm) <sup>a</sup>				
	Kontrola	hřebíček	<i>O.minutiflorum</i>	<i>O. dubium</i>	bobkový list
0	5,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00
3	22,50 $\pm$ 2,12	12,67 $\pm$ 2,31	5,00 $\pm$ 0,00	13,67 $\pm$ 0,58	23,33 $\pm$ 2,89
5	25,50 $\pm$ 2,12	22,00 $\pm$ 1,00	7,00 $\pm$ 0,00	16,67 $\pm$ 0,58	26,33 $\pm$ 0,58
7	41,50 $\pm$ 4,95	33,33 $\pm$ 1,53	10,67 $\pm$ 2,08	25,33 $\pm$ 0,58	46,33 $\pm$ 1,53
10	45,50 $\pm$ 3,54	46,00 $\pm$ 12,17	14,33 $\pm$ 3,21	47,67 $\pm$ 11,24	55,33 $\pm$ 5,58
14	59,00 $\pm$ 5,66	52,00 $\pm$ 11,79	18,67 $\pm$ 5,51	55,67 $\pm$ 5,51	62,00 $\pm$ 7,00
18	62,00 $\pm$ 5,66	63,33 $\pm$ 1,53	25,67 $\pm$ 8,62	70,67 $\pm$ 1,53	74,67 $\pm$ 2,08

<sup>a</sup> zahrnuje velikost disku s inokulem plísně (5 mm)

### 7.4.3 Antimikrobiální vliv rostlinných silic na *Alternaria alternata*

Tabulka 16: Antimikrobiální účinek rostlinných silic na plíseň *Alternaria alternata* agarovou diluční metodou při aplikaci 3  $\mu$ l/18 ml agaru

den	Velikost plísňové kolonie (mm) <sup>a</sup>				
	Kontrola	hřebíček	<i>O.minutiflorum</i>	<i>O. dubium</i>	bobkový list
0	5,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00
3	36,5 $\pm$ 2,12	29,33 $\pm$ 1,15	5,00 $\pm$ 0,00	25,33 $\pm$ 4,51	34,33 $\pm$ 4,04
5	40,5 $\pm$ 0,71	35,00 $\pm$ 3,00	10,33 $\pm$ 0,58	35,00 $\pm$ 3,61	45,33 $\pm$ 2,52
7	53,5 $\pm$ 0,71	41,33 $\pm$ 2,08	19,67 $\pm$ 1,53	40,67 $\pm$ 5,13	51,67 $\pm$ 2,89
10	56,5 $\pm$ 0,71	48,00 $\pm$ 2,65	26,67 $\pm$ 3,79	47,67 $\pm$ 2,52	57,00 $\pm$ 2,00
14	67,5 $\pm$ 0,71	57,00 $\pm$ 2,65	41,00 $\pm$ 4,58	60,67 $\pm$ 5,13	68,67 $\pm$ 1,15
18	76,5 $\pm$ 2,12	65,00 $\pm$ 3,00	43,33 $\pm$ 4,16	70,33 $\pm$ 2,08	74,33 $\pm$ 0,58

<sup>a</sup> zahrnuje velikost disku s inokulem plísně (5 mm)

Rostlinné silice byly také testovány na plíseň *Alternaria alternata*. Z tabulky (Tab. 16) je patrné, že antimikrobiální aktivita rostlinné silice *O. minutiflorum* je nejvyšší a opět byla statisticky vyhodnocena jako nejvýznamnější ze všech silic. Silice redukovala výrazně růst plísňe po celou dobu kultivace. Antimikrobiální vliv silice je vidět na obrázku (Příloha II).

Hřebíček a *O. dubium* mají přibližně stejné antibakteriální účinky. V prvních dnech kultivace byla inhibice zřetelná, i když ne tak jako u *O. minutiflorum*. Během dalších dnů se vzorek vyrovnal růstu kontrole. Rostlinná silice z bobkového listu opět nevykazovala žádný antimikrobiální vliv.

Závěrem lze říct, že nejvýraznější inhibiční účinek na všechny tři plísně má silice z *O. minutiflorum*, která částečně redukovala růst plísni po celou dobu kultivace. Antimikrobiální vliv silic z hřebíčku a *O. dubium* byl velmi malý a místy až zanedbatelný, přesto v prvních dnech k určité inhibici růstu došlo. Jako nejméně účinná se jeví silice z bobkového listu, která u plísni neměla téměř žádný inhibiční efekt.

Antimikrobiální vliv rostlinných silic na plísně byl sledován v několika studiích. Kde byly také sledovány rostlinné silice z hřebíčku a dobromyslu. Tyto rostlinné silice byly testovány na inhibici plísňe *Aspergillus niger* a *Aspergillus flavus*. Bylo zjištěno, že hřebíčková silice inhibuje růst plísňe po celou 8 denní kultivaci při koncentraci 6 µl/18 ml. Silice z dobromyslu inhibovala růst obou plísni po celou dobu kultivace při koncentraci 4 µl/18 ml [41]. Inhibice růst plísni *A. niger* a *A. flavus* byly potvrzeny pro další druhy rostlinných silic [42].

Plíseň *Alternaria alternata* a rod *Penicillium* byl také testován na rostlinnou silici ze saturejky zahradní. I zde byly prokázány antimikrobiální účinky této silice.

## 7.5 Vliv rostlinné silice na mikroflóru drůbeže

K aplikaci rostlinné silice na povrch chlazené drůbeže byla vybrána silice s nejvyšším antimikrobiálním účinkem, a to *Origanum minutiflorum*. Byla použita metoda postřiku, kdy rozprašovačem byl aplikován roztok rostlinné silice a vody (13 ml H<sub>2</sub>O a 300 µl rostlinné silice) po dobu dvou minut. Z vypočítaných hodnot bylo provedeno statistické vyhodnocení.

Tabulka 17: Dynamika růstu aerobních mezofilních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po aplikaci rostlinné silice *O. minutiflorum* (300  $\mu$ l/13 ml H<sub>2</sub>O) vyjádřené jako log CFU/g kůže

	0 hodin	24 hodin	48 hodin	72 hodin
Kontrola	5,81 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>	7,00 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	8,22 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>	8,39 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>
<i>O. minutiflorum</i>	5,43 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>	6,53 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>	7,73 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	8,51 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Různá písmena značí statistický významný rozdíl (P < 0,05)

Z tabulky (Tab. 17) je patrné, že aplikace rostlinné silice z *O. minutiflorum* na povrch chlazené drůbeže neměla významný vliv na redukci aerobních mezofilních mikroorganismů v průběhu skladování. Během skladování došlo k redukci pouze o půl řádu. Poslední den skladování se téměř vyrovnal růst mikrobů kontrole.

Zárok byl vyhodnocen jako statisticky nevýznamný v průběhu celého chladírenského skladování.

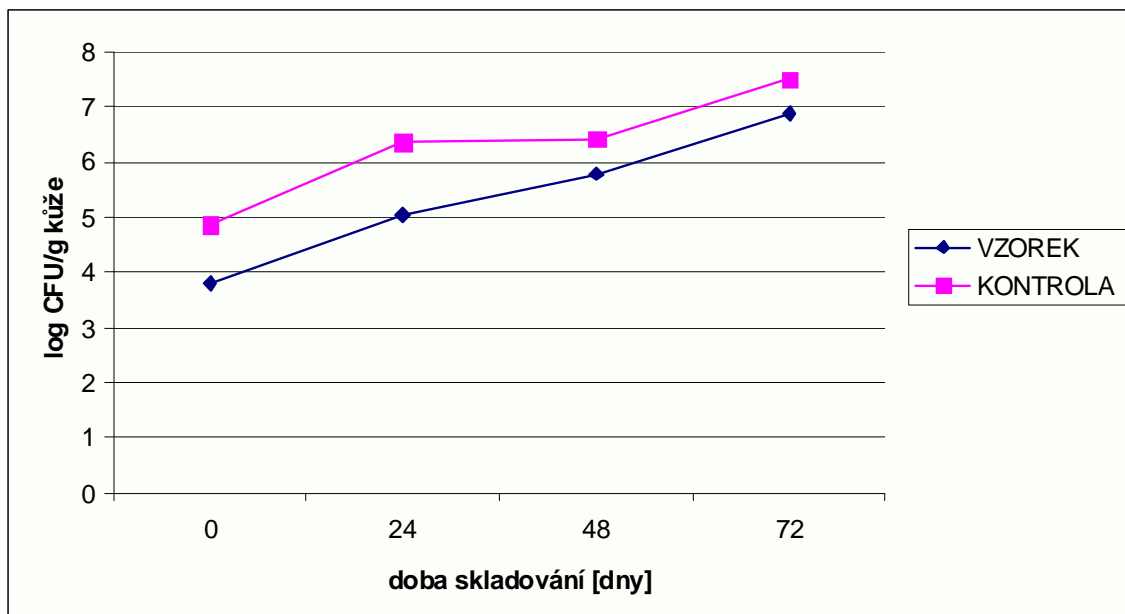
Tabulka 18: Dynamika růstu koliformních bakterií v průběhu chladírenského skladování po aplikaci rostlinné silice *O. minutiflorum* (300  $\mu$ l/13 ml H<sub>2</sub>O) vyjádřené jako log CFU/g kůže

	0 hodin	24 hodin	48 hodin	72 hodin
Kontrola	4,86 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>	6,36 $\pm$ 1,23 <sup>a</sup>	6,42 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	7,50 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>
<i>O. minutiflorum</i>	3,78 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>	5,04 $\pm$ 1,06 <sup>b</sup>	5,79 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	6,88 $\pm$ 0,78 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Různá písmena značí statistický významný rozdíl (P < 0,05)

Z tabulky (Tab. 18) je patrné, že po aplikaci rostlinné silice došlo k významnějšímu úbytku koliformních bakterií ve srovnání s ostatními sledovanými skupinami. V průběhu prvních dvou dnů došlo k redukci bakterií až o jeden řád.

První den byla inhibice bakterií zřetelná (Obr. 8), ale statisticky nebyla potvrzena jako významná. Druhý den chladírenského skladování byl počet mikrobů stále snížen o více jak jeden řád. Takle inhibice koliformních bakterií byla vyhodnocena jako statisticky významná. V dalších dnech skladování byly průměrné hodnoty počtu bakterií nižší oproti kontrole, ale statisticky nebyl potvrzen významný rozdíl.



Obrázek 8: Dynamika růstu koliformních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po aplikaci rostlinné silice *O. minutiflorum* (300  $\mu$ l/13 ml  $H_2O$ ) vyjádřené jako log CFU/g kůže

Z tabulky (Tab. 19) je zřejmé, že rostlinná silice z *O. minutiflorum* nemá žádný inhibiční účinek v celém průběhu chladírenského skladování na psychrotrofní bakterie. Nedošlo k redukci počtu mikrobů ani o půl řádu a nedostatečná inhibice byla potvrzena statistikou jako nevýznamná.

Tabulka 19: Dynamika růstu psychrotrofních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po aplikaci rostlinné silice *O. minutiflorum* (300  $\mu$ l/13 ml  $H_2O$ ) vyjádřené jako log CFU/g kůže

	0 hodin	24 hodin	48 hodin	72 hodin
Kontrola	6,18 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	7,40 $\pm$ 0,72 <sup>a</sup>	8,58 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>	9,04 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>
<i>O. minutiflorum</i>	6,05 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>	6,89 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	8,26 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	8,69 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Různá písmena značí statistický významný rozdíl ( $P < 0,05$ )

Stejně antimikrobiální účinky rostlinné silice z *O. minutiflorum* byly sledovány i na kvasinkách. Z tabulky (Tab. 20) je patrné, že aplikace silice není dostačující k inhibici kvasinek a zázrok byl vyhodnocen jako statisticky nevýznamný v průběhu celého chladírenského skladování.

Tabulka 20: Dynamika růstu kvasinek v průběhu chladírenského skladování po aplikaci rostlinné silice *O. minutiflorum* (300  $\mu$ l/ 13 ml H<sub>2</sub>O) vyjádřené jako log CFU/g kůže

	0 hodin	24 hodin	48 hodin	72 hodin
Kontrola	5,82 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	6,69 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>	7,96 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	8,72 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>
<i>O. minutiflorum</i>	5,32 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>	6,26 $\pm$ 0,85 <sup>a</sup>	7,66 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>	8,40 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Různá písmena značí statistický významný rozdíl (P < 0,05)

Aplikace rostlinných silic na potraviny a sledování jejich antimikrobiálního účinku bylo testováno v několika studiích. Silice z dobromyslu byla sledována v čerstvé uzenině. Po umělém zaočkování uzeniny bakterií *E. coli* byla sledována inhibice tohoto patogenu [33]. Silice z dobromyslu byla také aplikována na grilované kuře a kuřecí vývar, jež byly zaočkovány *Yersinia enterocolitica* a *Listeria monocytogenes*. V kuřecím vývaru došlo k inhibici obou bakterií. Po zaočkování grilovaného kuřete nebyly inhibiční účinky dobromyslu tak významné [60]. Dále byla rostlinná silice testována na hovězím masu. Po zaočkování *Salmonella typhimurium* a uložení masa při 5 °C v aerobní atmosféře došlo k redukci o dva řády oproti kontrole [61]. Při aplikaci rostlinné silice v 0,6% koncentraci na mleté jehněčí maso zaočkované *Salmonella enteritidis*, které bylo skladované při 4 °C došlo k redukci patogenu o dva řády [62].

Silice byly tedy aplikovány na různé potraviny a výsledky nebyly vždy jednotné. V některých studiích byly antimikrobiální účinky dostačující a někdy nedošlo k žádné redukci mikroorganismů. Jak už bylo potvrzeno v řadě studií, antimikrobiální aktivita rostlinných silic klesá s přítomností bílkovin a tuků, což může vysvětlovat dostačující antimikrobiální aktivitu rostlinné silice z *O. minutiflorum* na bakterie, kvasinky a plísně *in vitro*, kde byla použita živná média. Na mikroflóru chlazené drůbeže byl zaznamenán antimikrobiální vliv pouze na koliformní bakterie. Jinak byla rostlinná silice bez inhibičního vlivu. U všech sledovaných skupin mikroorganismů na povrchu drůbeže došlo k mírné redukci mikroorganismů, což mohlo být způsobeno aplikací cizí látky. Inhibice růstu je zaznamenána v příloze III. Bakterie se během chladírenského skladování přizpůsobily a došlo téměř k vyrovnání vzorku s kontrolou.

## ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zkoumat antimikrobiální účinky rostlinných silic diskovou difúzní a agarovou diluční metodou a následně nejúčinnější silici aplikovat na povrch chlazené drůbeže metodou postřiku.

Rostlinné silice jsou složitou směsí těkavých látek obsažených v přírodních rostlinných materiálech. Silice jsou často vonné a mají palčivou chuť. Jsou nejčastěji bezbarvé, přičemž oxidací během skladování mohou tmavnout. Je obecně známo, že některé rostlinné silice vykazují antimikrobiální vliv.

Antimikrobiální účinky byly zkoumány u rostlinné silice z hřebíčku, *Origanum minutiflorum*, *Origanum dubium* a z bobkového listu diskovou difúzní metodou pro bakterie a kvasinky. U plísní byla použita agarová diluční metoda.

Za nejúčinnější silici je považována silice z *O. minutiflorum*, která měla nejvýraznější inhibiční účinky jak proti kvasinkám, bakteriím a také plísním. Méně intenzivní antimikrobiální vliv měly rostlinné silice z *O. dubium* a z hřebíčku. U všech třech sledovaných skupin mikroorganismů měla rostlinná silice z bobkového listu nejmenší antimikrobiální vliv.

Po stanovení antimikrobiální aktivity silic byla silice z *O. minutiflorum* aplikována na povrch chlazené drůbeže. Antimikrobiální efekt byl sledován na aerobní mezofilní mikroorganismy, koliformní bakterie, psychrotrofní mikroorganismy a kvasinky. Rostlinná silice neměla žádný výrazný účinek na mezofilní a psychrotrofní mikroorganismy a na kvasinky v průběhu celého chladírenského skladování. Inhibice byla zaznamenána pouze u koliformních bakterií v průběhu prvních dvou dnů skladování. Další dny byla inhibice nedostačující a statisticky nevýznamná.

Závěrem lze říci, že antimikrobiální aktivita rostlinných silic je obecně známá a proti bakteriím, kvasinkám a plísním na živných médiích potvrzena. Antimikrobiální aktivita se mění v závislosti na typu rostlinné silice, testované metody a na druhu mikroorganismů. Při aplikaci rostlinné silice na povrch chlazené drůbeže nebyla antimikrobiální aktivita tolik výrazná než při aplikaci silic na živná média. Pokud by se zvýšila koncentrace rostlinné silice nebyla by tato metoda dekontaminace chlazené drůbeže ekonomicky rentabilní a mohlo by dojít i k výrazným organoleptickým změnám. Do budoucna by bylo dobré testovat jiné druhy rostlinných silic či jejich kombinace, aby se docílilo co nejvýraznějšího antimikrobiálního účinku.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] INGR, I. *Základy konzervace potravin*. 3. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. 119 s. ISBN 978-80-7375-110-4
- [2] KYZLINK, V. *Teoretické základy konzervace potravin*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1988. 511 s.
- [3] BOLDER, N. M. Decontamination of meat and poultry carcasses. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 1997. s. 221 - 227
- [4] AYMERICH, T., PICOUET, P. A., MONFORT, J. M. Decontamination technologies for meat products. *Meat Science* 78, 2008. s. 114 – 129
- [5] *Handbook of food preservation* – Rahman, M. S. [cit. 31. 3. 2010]. Dostupný z www: <http://books.google.com/>
- [6] GOULD, G. W. *New methods of food preservation*. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, 1999. 324 s. ISBN 0-8342-1341-9
- [7] Aromatherapy - Essential oil [on line]. [cit. 25. 3. 2010]. Dostupný z www: <http://aromatherapy.suite101.com/article.cfm/essential-oils-as-natural-food-preservatives>
- [8] Vyhláška č. 331/1997 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích , pro koření, jedlou sůl, dehydratované výrobky a ochucovadla a hořčici
- [9] CHÝLEOVÁ, L. *Koření a jeho použití v potravinářském průmyslu*. 1. vyd. Praha: VÚPP-STI potravinářského průmyslu, 1986. 44 s.
- [10] Wikipedie otevřená encyklopedie – koření [on line]. [cit. 2. 2. 2010]. Dostupný z www: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Koření>
- [11] PETER, K. V. *Handbook of herbs and spices* [elektronický zdroj]: volume 3. Boca Raton: CRC Press, 2006. 537 s. ISBN 978-1-84569-017-5
- [12] Encyklopedie koření – hřebíček [on line]. [cit. 15. 11. 2009]. Dostupný z www: <http://encyklopedie.kotanyi.cz/Hrebicek.html?kpid=9>
- [13] Abeceda zdraví - hřebíček [on line]. [cit. 15. 11. 2009]. Dostupný z www: <http://bylinky.abecedazdravi.cz/hrebicek-flos-caryophylli-aromatici>



- [14] LORENCOVÁ, K. *Koření známé i neznámé*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2007. 156 s. ISBN 978-80-247-1934-4
- [15] Wikipedie otevřená encyklopedie - hřebíček [on line]. [cit. 2. 2. 2010]. Dostupný z [www:http://cs.wikipedia.org/wiki/H%C5%99eb%C3%AD%C4%8Dek\\_\(ko%C5%99en%C3%AD\)](http://cs.wikipedia.org/wiki/H%C5%99eb%C3%AD%C4%8Dek_(ko%C5%99en%C3%AD))
- [16] Wikipedie otevřená encyklopedie – eugenol [on line]. [cit. 17. 2. 2010]. Dostupný z [www: http://cs.wikipedia.org/wiki/Eugenol](http://cs.wikipedia.org/wiki/Eugenol)
- [17] BRUT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Microbiology*, 94, 2004. s. 223 – 253
- [18] Encyklopedie koření – dobromysl [on line]. [cit. 15. 11. 2009]. Dostupný z [www: http://encyklopedie.kotanyi.cz/Oregano.html?kpid=23](http://encyklopedie.kotanyi.cz/Oregano.html?kpid=23)
- [19] Seznam obrázky – dobromysl [on line]. [cit. 17. 2. 2010]. Dostupný z [www: http://www.obrazky.cz/?q=dobromysl](http://www.obrazky.cz/?q=dobromysl)
- [20] Wikipedie otevřená encyklopedie - karvakrol [on line]. [cit. 2. 2. 2010]. Dostupný z [www: http://cs.wikipedia.org/wiki/Karvakrol](http://cs.wikipedia.org/wiki/Karvakrol)
- [21] ULTEE, A., SMID, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Microbiology*, 64, 2001. s. 373 - 378
- [22] Wikipedie otevřená encyklopedie - tymol [on line]. [cit. 2. 2. 2010]. Dostupný z [www: http://cs.wikipedia.org/wiki/Thymol](http://cs.wikipedia.org/wiki/Thymol)
- [23] VALERO, M., GINER, M. J. Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 2006. s. 90 - 94
- [24] Encyklopedie koření – bobkový list [on line]. [cit. 15. 11. 2009]. Dostupný z [www: http://encyklopedie.kotanyi.cz/Bobkovy-list.html?kpid=4](http://encyklopedie.kotanyi.cz/Bobkovy-list.html?kpid=4)
- [25] Seznam obrázky – bobkový list [on line]. [cit. 17. 2. 2010]. Dostupný z [www: http://www.obrazky.cz/?q=bobkov%C3%BD+list](http://www.obrazky.cz/?q=bobkov%C3%BD+list)
- [26] Wikipedia – The free Encyclopedia – terpinene [on line]. [cit. 2. 2. 2010]. Dostupný z [www: http://en.wikipedia.org/wiki/Terpinene](http://en.wikipedia.org/wiki/Terpinene)

- [27] Wikipedie otevřená encyklopedie - silice [on line]. [cit. 10. 12. 2009]. Dostupný z www: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Silice>
- [28] Biotox – rostlinné silice [on line]. [cit. 15. 11. 2009]. Dostupný z www: <http://www.biotox.cz/naturstoff/chemie/ch-silice.html>
- [29] BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2004. s. 446 - 475
- [30] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*, Tábor, 2002. 304 s. ISBN 8086659011
- [31] Aromaterapie – rostlinné silice [on line]. [cit. 15. 11. 2009]. Dostupný z www: <http://www.aromaterapie.cz/index.php?/pages/aromaterapie.html>
- [32] Silice v rostlinách [on line]. [cit. 2. 1. 2010]. Dostupný z www: <http://www.gymfry.cz/zmp0607/kamenicka/teoretickacast.htm>
- [33] BUSATTA, C., MOSSI, A. J., RODRIGUES, M. R. A., CANSIAN, R. L., OLIVIERA, J. V. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 2007. s. 610 – 616
- [34] ASLİM, B., YUCEL, N. In vitro antimicrobial activity of essential oil from endemic *Origanum minutiflorum* on ciprofloxacin – resistant *Campylobacter* spp. *Food chemistry*, 107, 2008. s. 602 - 606
- [35] DADALIOĞLU, I., EVRENDILEK, G. A. Chemical compositions and antibacterial effect of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 52, 2004. s. 8255 - 8260
- [36] YİĞİT, D., KANDEMİR, A. Antimicrobial activity of some endemic plants (*Salvia cryptantha*, *Origanum acutidens*, *Thymus sipyleus* ssp. *sipyleus*). *Atatürk University, Faculty of Education, Erzincan*, 2002. s. 77 - 81
- [37] DI PASQUA, R., DE FEO, V., MAURIELLO, G. In vitro antibacterial activity of essential oils from Mediterranean *Apiaceae*, *Verbenaceae* and *Lamiaceae* against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Annals of Microbiology*, 55, 2005. s. 139 - 143

- [38] BUSATTA, C., POPIOLSKI, A. S., MOSSI, A. J., DARIVA, C., RODRIGUES, M. R., CORAZZA, F. C, CORAZZA, M. L., VLADIMIR OLIVEIRA, J., CANSIAN, R. L. Application of *Origanum majorana L.* essential oil as an anti-microbial agent in sausage. *Food microbiology*, 25, 2008. s. 207 - 211
- [39] SOUZA, E. L., STAMFORD, T. L. M., LIMA, E. O., TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare L.* essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Contro*, 18, 2007. s. 409 - 413
- [40] KARAMAN, S., DIGRAK, M., RAVID, U., ILCIM, A. Antibacterial and anti-fungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 76, 2001. s. 183 – 186
- [41] VIUDA-MARTOS, M., RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, PÉREZ-ÁLVAREZ, J. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *Journal of Food Safety*, 27, 2007. s. 91 – 101
- [42] VIUDA-MARTOS, M., RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, PÉREZ-ÁLVAREZ, J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata L.*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) essential oils. *Food Control*, 8, 2008. s. 1130 - 1138
- [43] DAVIES, A., BOARD, R. *The Microbiology of Meat and Poultry*. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 346 s. ISBN 0-7514-0398-9
- [44] VAŘEJKA, F. *Speciální veterinární mikrobiologie*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1989. 264 s. ISBN:80-209-0042X
- [45] BEDNÁŘ, M. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996. 558 s. ISBN 80-238-0297-6
- [46] Wikipedie otevřená encyklopedie – *Escherichia coli* [on line]. [cit. 18. 3. 2010]. Dostupný z www: [http://cs.wikipedia.org/wiki/Escherichia\\_coli](http://cs.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli)
- [47] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Academia, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6
- [48] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptum, 2003

- [49] BLACKBURN, C. *Food spoilage microorganisms*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006. 712 s. ISBN 9781855739666
- [50] Miniatlasy mikroorganismů – *Acinetobacter* [on line]. [cit. 18. 3. 2010]. Dostupný z www: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlasy/acin.htm>
- [51] STEINHAUSER, L. 1. vyd. *Hygiena a technologie masa*. Brno: Last, 1995. 643 s. ISBN 80-900260-4-4
- [52] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 271 s. ISBN 80-210-4107-9
- [53] ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for food): *Microorganisms of foods 6*. Microbial ecology of food commodities, New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005, s. 763
- [54] JANDEROVÁ, B., BENDOVIČ, O. *Úvod do biologie kvasinek*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1999. 108 s. ISBN 8071849901
- [55] MALÍŘ, F., OSTRÝ, V. *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2003. 349 s. ISBN 80-7013-395-3
- [56] JANDOVÁ, B., KOTOUČKOVÁ, L. *Praktikum z mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 1996. 64 s. ISBN: 80-210-1374-5
- [57] Přírodní konzervační látky – agris [on line]. [cit. 21. 4. 2010]. Dostupný z www: <http://www.agris.cz/potravinarstvi/detail.php?id=151375&iSub=583&PHPSESSID=71>
- [58] SMITH-PALMER, A., STEWART, J., FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 1998. s. 118 - 122
- [59] INOUE, S., TAKAHASHI, M., ABE, S., Inhibitory activity of hydrosols, herbal teas and related essential oils against filament formation and the growth of *Candida albicans*. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 50, 2009. s. 243 - 251
- [60] FIROUZI, R., SHEKARFOROUSH, S. S., NAZER, A. H., BORUMAND, Z., JOOYANDEH, A. R. Effect of essential oils of oregano and nutmeg on growth

and survival of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in barbecued chicken. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 2007. s. 2626 – 2630

- [61] SKANDAMIS, P., TSIGARIDA, E., NYCHAS, G-J. E. The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 °C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiology*. 19, 2002. s. 97 - 103
- [62] GOVARIS, A., SOLOMAKOS, N., PEXARA, A., CHATZOPOULOU, P. S. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 2010. s. 175 - 180

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

CFU Colony forming units (kolonie tvořící jednotku) - KTJ

MIC Minimální inhibiční koncentrace

MPA Masopeptonový agar

MPB Masopeptonový bujón

PDA Potato dextrose agar

PCA Plate count agar

SAB Sabouraud agar

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1: Hřebíček.....	18
Obr. 2: Eugenol –chemický vzorec.....	18
Obr. 3: Dobromysl obecná.....	19
Obr. 4: Karvakrol – chemický vzorec.....	20
Obr. 5: Tymol – chemický vzorec.....	20
Obr. 6: Bobkový list.....	22
Obr. 7: $\alpha$ , $\beta$ a $\gamma$ -terpinen chemický vzorec.....	22
Obr. 8: Dynamika růstu koliformních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po aplikaci rostlinné silice <i>O. minutiflorum</i> (300 $\mu$ l/13 ml H <sub>2</sub> O) vyjádřené jako log CFU/g kůže.....	53

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1: Složení masopeptonového agaru.....	36
Tab. 2: Složení masopeptonového bujónu.....	37
Tab. 3: Složení cibulového agaru.....	37
Tab. 4: Složení média pro důkaz tvorby pouzdrového polysacharidu.....	37
Tab. 5: Složení média pro zjištění asimilace uhlíku.....	38
Tab. 6: Složení média pro fermentaci cukrů.....	38
Tab. 7: Izolované bakteriální kmeny z chlazených nebalených kuřat v období únor - březen 2006.....	39
Tab. 8: Chemické složení rostlinné silice bobkového listu.....	39
Tab. 9: Chemické složení rostlinné silice <i>Origanum minutiflorum</i> .....	40
Tab. 10: Antimikrobiální aktivita rostlinných silic diskovou difúzní metodou pro sbírkové bakterie při aplikaci 3 ul/disk.....	44
Tab. 11: Antimikrobiální aktivita rostlinných silic diskovou difúzní metodou pro izolované bakterie při aplikaci 3 ul/disk.....	45
Tab. 12: Výsledky identifikačních testů pro kvasinky.....	47
Tab. 13: Antimikrobiální aktivita rostlinných silic diskovou difúzní metodou pro kvasinky při aplikaci 3ul/disk.....	48
Tab. 14: Antimikrobiální účinek rostlinných silic na plíseň <i>Penicillium nalgiovensis</i> diskovou difúzní metodou při aplikaci 3 µl/18 ml agaru.....	49
Tab. 15: Antimikrobiální účinek rostlinných silic na plíseň <i>Penicillium roqueforti</i> diskovou difúzní metodou při aplikaci 3 µl/18 ml agaru.....	50
Tab. 16: Antimikrobiální účinek rostlinných silic na plíseň <i>Alternaria alternata</i> diskovou difúzní metodou při aplikaci 3 µl/18 ml agaru.....	50
Tab. 17: Dynamika růstu aerobních mezofilních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po aplikaci rostlinné silice <i>O. minutiflorum</i> (300 µl/13 ml H <sub>2</sub> O vyjádřené jako log CFU/g kůže.....	52



- Tab. 18: Dynamika růstu koliformních bakterií v průběhu chladírenského skladování po aplikaci rostlinné silice *O. minutiflorum* (300 µl/13 ml H<sub>2</sub>O) vyjádřené jako log CFU/g kůže.....52
- Tab. 19: Dynamika růstu psychrofilních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po aplikaci rostlinné silice *O. minutiflorum* (300 µl/13 ml H<sub>2</sub>O) vyjádřené jako log CFU/g kůže.....53
- Tab. 20: Dynamika růstu kvasinek v průběhu chladírenského skladování po aplikaci rostlinné silice *O. minutiflorum* (300 µl/13 ml H<sub>2</sub>O) vyjádřené jako log CFU/g kůže.....54

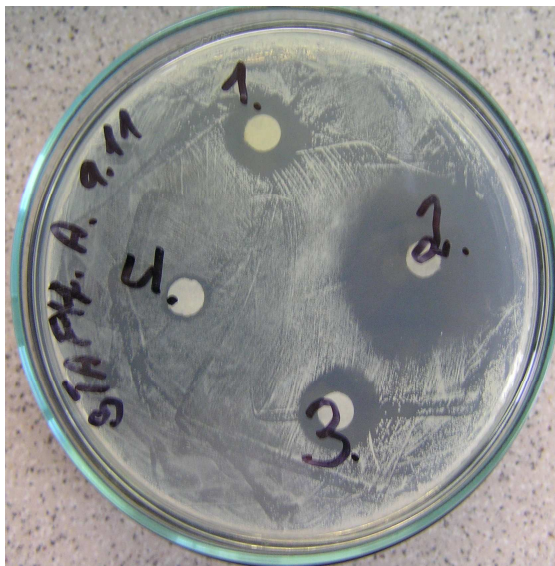
## SEZNAM PŘÍLOH

P I: Fotografická dokumentace diskové difúzní metody – bakterie

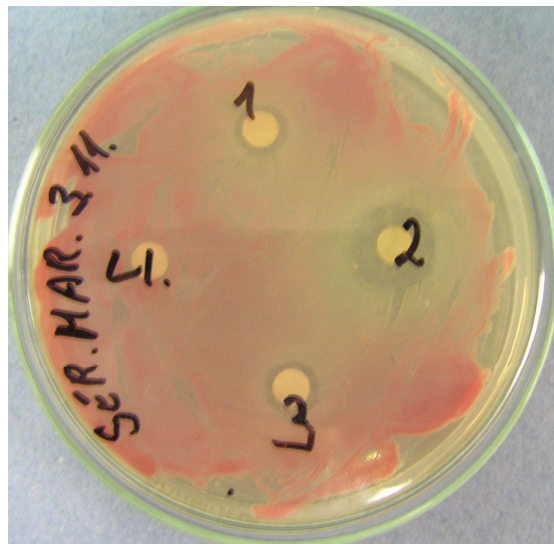
P II: Fotografická dokumentace agarové diluční metody – plísně

P III: Vliv rostlinné silice z *Origanum minutiflorum* na mikroflóru drůbeže

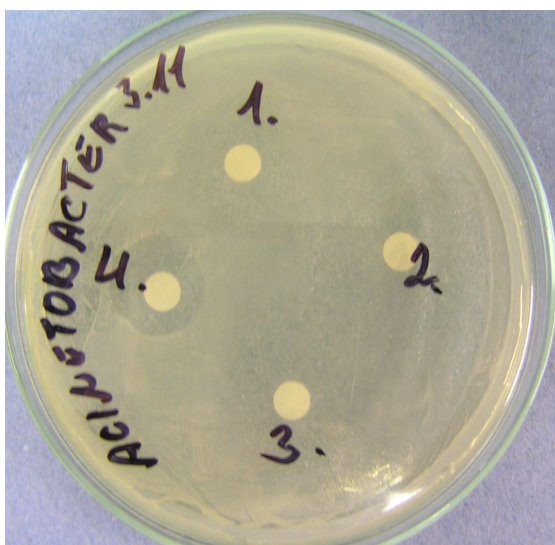
## PŘÍLOHA PI: FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE DISKOVÉ DIFÚZNÍ METODY - BAKTERIE



*Staphylococcus aureus*



*Serratia marcescens*



*Acinetobacter*



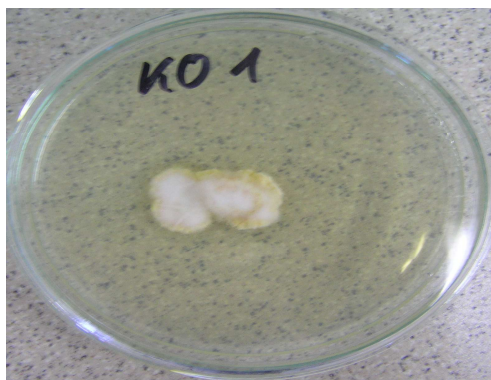
*Micrococcus luteus*

1. Hřebíček
2. *Origanum minutiflorum*

3. *Origanum dubium*
4. Bobkový list

## PŘÍLOHA P II: FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE DISKOVÉ DIFÚZNÍ METODY - PLÍSNĚ

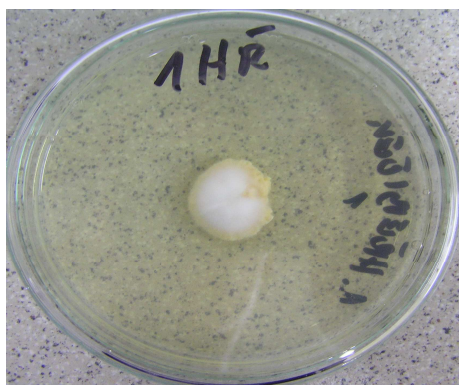
Vliv rostlinných silic na *Penicillium nalgiovensis* – 7den



Kontrola



*Origanum minutiflorum*



Hřebíček



Bobkový list

Vliv rostlinné silice z *Origanum minutiflorum* na *Alternaria alternata* – 7 den



Kontrola

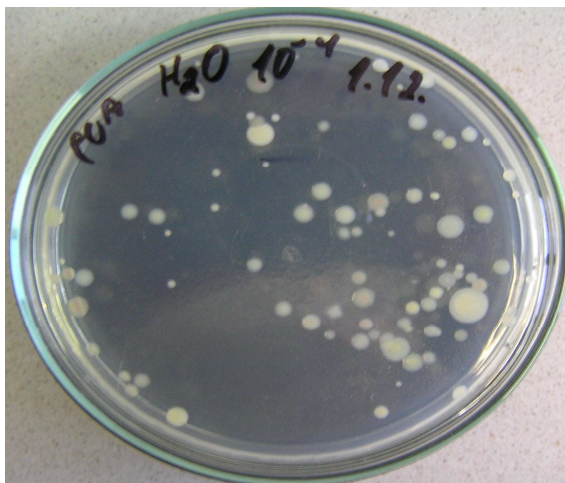


Vzorek



## PŘÍLOHA P III: VLIV ROSTLINNÉ SILICE Z *ORIGANUM MINUTIFLORUM* NA MIKROFLÓRU DRŮBEŽE

Mezofilní bakterie



Kontrola  $10^{-4}$  – po 24 hodinách skladování

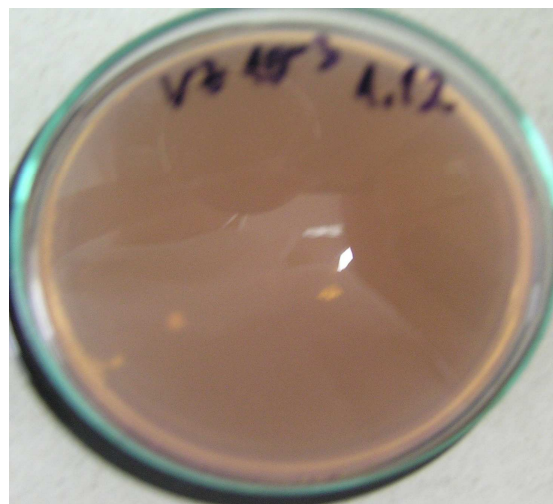


Vzorek  $10^{-4}$  – po 24 hodinách skladování

Koliformní bakterie

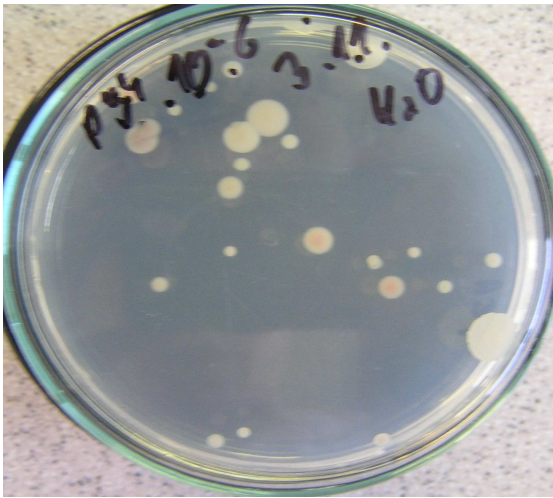


Kontrola  $10^{-3}$  – po 24 hodinách skladování

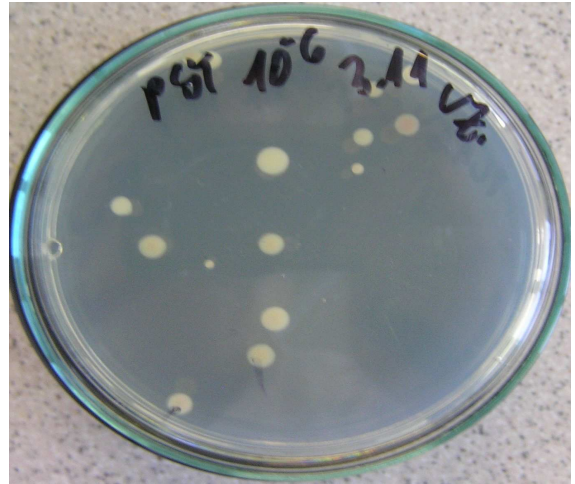


Vzorek  $10^{-3}$  – po 24 hodinách skladování

Psychrotrofní bakterie

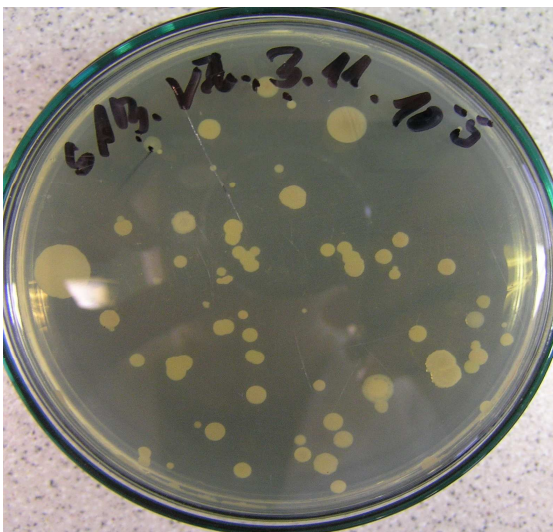


Kontrola  $10^{-6}$  – po 72 hodinách skladování

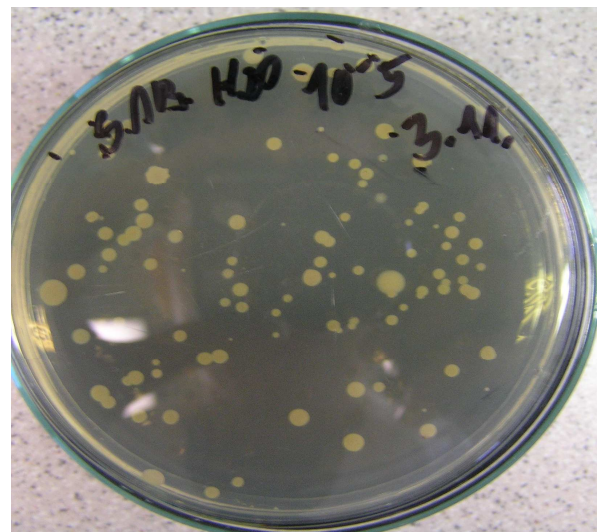


Vzorek  $10^{-6}$  – po 72 hodinách skladování

Kvasinky a plísně



Kontrola  $10^{-5}$  – po 72 hodinách skladování



Vzorek  $10^{-5}$  – po 72 hodinách skladování