

Dekontaminace povrchu drůbeže organickými kyselinami v kombinaci s lysozymem

Bc. Šárka Zavadilová

Diplomová práce
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství
akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Šárka ZAVADILOVÁ**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Dekontaminace povrchu drůbeže organickými kyselinami v kombinaci s lysozymem**

Zásady pro vypracování:

1. Charakterizovat metody dekontaminace potravin.
2. Zaměřit se na použití organických kyselin a lysozymu.
3. Zpracovat literární přehled složení mikroflóry drůbežního povrchu, legislativa.
4. Aplikace kyseliny mléčné v kombinaci se sorbanem draselným a lysozymem na povrch nebalených chlazených kuřat.
5. Srovnání dvou metod a jejich účinnost na vybrané skupiny mikroorganismů.
6. Identifikace náhodně vybraných zástupců daných skupin.
7. Srovnání mikroflóry kuřat z výroby a obchodní sítě.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

ICMSF. Microorganisms in foods 6. Kluwer Academic Plenum Publishers, New York, 2005, 763 s.

Rio, del Elena, et al. Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteries of poultry. International Journal of Food Microbiology, 2007, 268 - 280 s.

Blacburn, Cleve de W. Food spoilage microorganisms. CRC Press, New York, 2006, 712 s.

Steinhauser, Ladislav a kol. Hygiena a technologie masa, Brno, Vydavatelství potravinářské literatury LAST, 1995, 664s.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Magda Doležalová

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

20. listopadu 2007

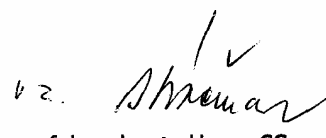
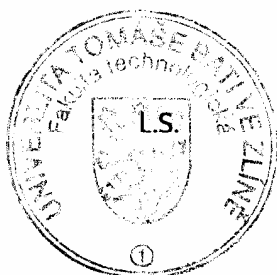
Termín odevzdání diplomové práce:

31. května 2008

Ve Zlíně dne 2. května 2008



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo zjistit účinky organických kyselin samostatně nebo v kombinaci s lysozymem na mikroflóru povrchu chlazené drůbeže. Byl testován vliv 2% kyseliny mléčné se sorbanem draselným v různých koncentracích (0,2%, 0,5%) dvěma metodami – ponorem a postřikem drůbeže. Byly sledovány celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů, psychrotrofní mikroorganismy, koliformní (na dvou typech pěstí), stafylokoky a kvasinky.

Zároveň se ukázalo, že účinný při metodě ponorem, kdy došlo k velkému úbytku mikroorganismů. Metoda postřiku se v důsledku menších úbytků nezdá být vhodná, což mohlo být způsobeno nedokonalým postřikem. Významný antimikrobiální účinek lysozymu na sledovanou přirozenou mikroflóru nebyl prokázán.

Klíčová slova: dekontaminace, kyselina mléčná, sorban draselný, lysozym, drůbež

ABSTRACT

The subject of this thesis was state the effect of organic acids in combination with lysozyme on the surface microflora of chilled poultry. The test was focused on the influence of 2% lactic acid with potassium sorbate in variety of concentration (0,2%, 0,5%) of two methods – dipping and spraying of poultry. Monitored were total viable counts of aerobic mesophiles, psychrotrophic mikroorganisms, coliform bacteria (on two types plate), staphylococcus and moulds.

The step was shown as effective at dipping application, when were a big reduced of microorganisms. The metod of sprying was ineffective probably imperfect spraying. The significant antimicrobial effect of lysozyme on microflora was not state

Keywords: deconatamination, lactic acid, potassium sorbate, lysozyme, poultry

Touto cestou bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce, Mgr. Magdě Doležalové, za odborné vedení, ochotně poskytnuté cenné rady a čas, který mi věnovala při vypracování mé diplomové práce. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D., děkuji za pomoc při statistickém vyhodnocování výsledků.

Nemohu rovněž opomenout poděkování členům Ústavu potravinářského inženýrství a chemie UTB ve Zlíně za jejich vstřícnost, pomoc a spolupráci při praktickém zpracování této diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala rodičům za všechnu podporu a trpělivost po celou dobu mého studia.

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně, 5.5. 2008

.....

podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
1.1 PRODUKCE MASA	11
1.1.1 Produkce masa ve světě.....	11
1.1.2 Produkce masa v ČR	11
1.2 SPOTŘEBA MASA V ČR	12
1.3 SLOŽENÍ A VLASTNOSTI DRŮBEŽÍHO MASA	12
1.4 HYGIENICKÁ A ZDRAVOTNÍ NEZÁVADNOST DRŮBEŽÍHO MASA	13
1.5 MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE MASA	14
1.5.1 Primární kontaminace	14
1.5.2 Sekundární kontaminace	14
1.6 ALIMENTÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ Z MASA.....	14
1.7 MIKROORGANISMY NA POVRCHU MASA	15
1.7.1 Fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinky	15
1.7.1.1 Čeď Enterobacteriaceae	15
1.7.2 Gramnegativní aerobní tyčinky	19
1.7.3 Aerobní nebo mikroaerofilní gramnegativní bakterie	19
1.7.3.1 Čeď Campylobacteraceae	19
1.7.4 Pravidelné nesporulující grampozitivní tyčinky a koky	20
1.7.5 Grampozitivní tyčinky a koky tvořící endospory	22
1.8 KONTAMINACE JATEČNÝCH TĚL DRŮBEŽE BĚHEM ZPRACOVÁNÍ.....	24
1.9 VLIV ORGANICKÝCH KYSELIN NA PROSTŘEDÍ	24
1.9.1 Organické kyseliny	25
1.9.2 Kyselina mléčná	26
1.9.3 Sorban draselný	27
1.9.4 Lysozym	28
1.10 LEGISLATIVA	29
2 CHARAKTERISTIKA PŮD POUŽÍVANÝCH V MIKROBIOLOGII	31
2.1.1 Plate count agar (PCA).....	31
2.1.2 Endo agar.....	31
2.1.3 Xylosa – lysin – deoxycholat agar (XLD agar)	33
2.1.4 Glukoso- kvasiničný chloramfenikolový agar (GKCHA).....	34
2.1.5 Mannitol Salt Agar (MSA).....	34
3 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	36
II PRAKTICKÁ ČÁST	37
4 MATERIÁL A METODIKA	38
4.1 SEZNAM POUŽITÝCH LABORATORNÍCH PŘÍSTROJŮ, ZAŘÍZENÍ A CHEMIKÁLIÍ.....	38
4.1.1 Přístroje a zařízení.....	38

4.1.2	Chemikálie a živné půdy	38
4.2	PŮVOD VZORKŮ.....	39
4.3	ÚPRAVA VZORKŮ PRO ANALÝZU	40
4.4	APLIKACE DEKONTAMINANTŮ	40
4.4.1	Aplikace metodou ponoru	40
4.4.2	Aplikace metodou postřiku	40
4.5	MĚŘENÍ PH.....	40
4.6	ODBĚR VZORKŮ PRO ANALÝZU.....	41
4.7	IDENTIFIKACE KMENŮ	42
4.7.1	Použité biochemické testy	42
4.8	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ.....	45
5	VÝSLEDKY	46
5.1	Vliv dekontaminantů na hodnoty pH	46
5.2	Vliv aplikace dekontaminantů na mikroflóru drůbeže.....	47
5.2.1	Vliv 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného metodou ponoru	48
5.2.2	Vliv 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného metodou ponoru	55
5.2.3	Vliv 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného metodou postřiku	61
5.3	Bakteriální identifikace	69
5.4	Srovnání drůbeže zakoupené v obchodní síti a přímo od výrobce firmy Raciola s.r.o.	71
6	DISKUZE	75
6.1	Vývoj hodnoty pH na době skladování.....	75
6.2	Srovnání účinku směsi s lysozymem a bez lysozymu	75
6.3	Zhodnocení a srovnání účinků dekontaminačních směsí	76
6.3.1	Zhodnocení účinku 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného metodou ponoru	76
6.3.2	Zhodnocení účinku 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného metodou ponoru	77
6.3.3	Zhodnocení účinku 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného metodou postřiku.....	77
6.3.4	Srovnání účinku směsi 2% LA + 0,2% PS a 2% LA + 0,5% PS metodou ponoru	78
6.3.5	Srovnání účinku metod ponorem a postřikem.....	80
6.4	Bakteriální identifikace	82
6.5	Srovnání drůbeže zakoupené v obchodní síti a přímo od výrobce firmy Raciola s.r.o.	83
	ZÁVĚR	85
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	87
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	94

SEZNAM OBRÁZKŮ	95
SEZNAM TABULEK.....	98
SEZNAM PŘÍLOH.....	100

ÚVOD

Aktuálním hojně diskutovaným problémem současné doby je bezpečnost potravin. Jedním z hlavních cílů Evropské unie je zajistit tuto zdravotní nezávadnost, nezávadnost výrobního procesu a distribuce potravin. Celosvětově zvýšená konzumace masa, především drůbežího, je důvodem pro tak velkou pozornost nejen v EU. Zvýšenou spotřebou drůbežího masa se kompenzuje pokles spotřeby hovězího a vepřového masa. Svůj velký podíl má i zdravotní osvěta. Drůbeží maso je zdravější, dietetické, obsahuje vyšší množství nenasycených mastných kyselin, má nízkou cenu, rychlou a snadnou kuchyňskou úpravu a velmi rozmanitou nabídku dělené drůbeže a drůbežích výrobků. Tyto faktory zesilují tlak nejen na prodloužení trvanlivosti, ale také na zdravotní a hygienickou nezávadnost potravin.

1. ledna 2006 vstoupil v platnost zákaz o používání antibiotických stimulátorů růstu. Tento dodatek je součástí nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1831/2003 ze dne 22. září 2003. Antibiotické látky podávané hospodářským zvířatům k posílení růstu se nepřímo dostávají po konzumaci do organismu spotřebitele a následně tak způsobovali rezistenci infekčních agens na antibiotika podávaná v lékařství. Na druhou stranu růstové stimulatory sloužily nejen k podpoře růstu drůbeže, ale také k profylaxi patogenních mikroorganismů v zažívacím traktu. V současnosti se tedy může zvyšovat riziko kontaminace povrchu drůbeže obsahem střev s patogenními mikroorganismy při jatečném zpracování.

V potravinářském průmyslu se pro prodloužení údržnosti a zlepšení kvality výrobků používá celá řada aditiv. Současný spotřebitel si žádá výrobky s co největší dobou trvanlivosti, ale zároveň požaduje, aby při jejich výrobě bylo použito co nejmenšího množství chemických látek a byly zachovány nutriční a organoleptické vlastnosti výrobku. Nejen tyto požadavky přispěly k orientaci na používání přirozeně se vyskytujících látek s antimikrobiálními vlastnostmi. Mezi jedny z nejvíce používaných látek jsou přirozeně se vyskytující organické kyseliny, jako je kyselina mléčná, která je přirozenou složkou masa, dále kyselina sorbová či benzoová.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

1.1 Produkce masa

1.1.1 Produkce masa ve světě

Podle odhadů FAO (Food and Agriculture Organization) dosáhla produkce masa na celém světě v roce 2006 objemu přes 272 milionů tun (mimo ryb) (*Tab.1*). Ve srovnání s rokem 2005 byl zaznamenán nárůst o 1,6 %. Lidstvo produkuje pro svoji potřebu neustále více masa, což je logické vzhledem k nárůstu počtu obyvatel i vzhledem ke zvyšující se životní úrovni.

Nemění se jen objem produkce masa, ale i poměr mezi produkcí jednotlivých druhů mas. Největší podíl připadá na maso vepřové, zaujímá téměř 40 % z celkové produkce. Na druhém místě je drůbeží maso, které odsunulo hovězí a telecí maso [23].

Tab. 1. Produkce masa ve světě v letech 2005 a 2006 (údaje FAO) [23]

	2005	2006	% 2006 k 2005
produkce masa celkem	268,1	272,5	+ 1,6
vepřové maso	103,7	107,0	+ 3,2
drůbeží maso	81,9	81,0	-1,1
hovězí maso	64,3	65,9	+ 2,5
telecí maso	13,0	13,3	+ 2,3

Největšími producenty masa ve světě jsou Čína, USA, Brazílie, Německo a Francie [23].

1.1.2 Produkce masa v ČR

Podle údajů Českého statistického úřadu bylo v ČR v roce 2006 vyprodukováno 630 794 tun masa (mimo ryb), což bylo o 2,3 % méně než v roce 2005. Výroba vepřového masa klesla o 0,8 %, hovězího a telecího o 1,6 % a snížila se i produkce drůbežího masa o 4,7%. Produkce masa je určena produkcí jatečných zvířat a v naší zemi má v posledních letech sestupnou tendenci. Ta podle údajů ČSÚ klesla od roku 1989 do roku 2005 o téměř 50 %. Nesoběstačnost a schodek domácí výroby drůbežího masa je kompenzován levnějším dovozem především z Polska, Brazílie, Německa a Holandska [23; 52].

1.2 Spotřeba masa v ČR

Stanovení množství spotřeby masa se opírá o statistická čísla produkce masa v dané zemi se zohledněním dovozů a vývozu na straně jedné a o počet obyvatel na straně druhé. V roce 2005 byla spotřeba vyčíslena na 81,4 kg na 1 obyvatele (mimo ryb) (Tab.2). V jednotlivých druzích mas u nás vede maso vepřové (51 % celkové spotřeby), druhé je maso drůbeží (32 %), a třetí hovězí a telecí maso (12,3 %). Na ostatní druhy připadne necelých 5 %. Spotřeba masa se u nás snížila jen bezvýznamně, v průběhu 10 let jen o 0,7 %. Nejvíce se propadla spotřeba hovězího masa, a to o více než 46 %. O 10 % klesla konzumace vepřového masa, naopak spotřeba drůbežího vzrostla o plných 100 % [23]. Spotřeba drůbežího masa na 1 obyvatele ČR je za rok 2007 24,5 kg, což znamenalo pokles oproti roku 2006 o 1,5 kg [52].

Tab. 2. Spotřeba masa na 1 obyvatele ČR v kg [23]

	1995	2004	2005
maso celkem	82	80,5	81,4
vepřové	46,2	41,1	41,5
drůbeží maso	13	25,3	26,1
hovězí, telecí maso	18,8	10,4	10
králíci	3,4	2,9	2,8
ryby	4,9	5,5	5,8

1.3 Složení a vlastnosti drůbežího masa

Podle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 89/2000 Sb., pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich v platném znění, se drůbežím masem rozumí maso z drůbeže, zejména kuřat, slepic, kachen, hus, krůt nebo perliček, kuřecím masem pak maso kura ve stáří nejvýše 3 měsíců [58].

Drůbeží maso je z nutričního hlediska velmi cenné. Je zdrojem plnohodnotných bílkovin, vitamínů, nenasycených mastných kyselin a minerálních látek [72]. Základními složkami masa drůbeže jsou voda, bílkoviny a lipidy, dále maso obsahuje nebílkovinné dusíkaté látky, vitamíny, sacharidy, organické kyseliny. Podíl vody závisí na obsahu tuku a bílkovin v mase. Obsah vody se v kuřecím mase pohybuje mezi 70 až 74 %. Bílkoviny jsou nejvýznamnější složkou masa. Největší význam z hlediska technologického i nutričního mají svalové bílkoviny (sarkoplazmatické a myofibrilární). Nejvýznamnější a nejvíce zastoupe-

nými svalovými bílkovinami jsou myosin (36 – 40 %), globulin X (20 %), aktin (12 – 15 %), myogen (20 %) [45; 21].

Základem lidského konzumu je svalovina kosterní – příčně pruhovaná, včetně kůže, dále droby (srdce, játra, svalnatý žaludek, krk). Hlavními masitými částmi drůbeže jsou svaly na hrudi a svaly stehna a lýtka. Bílá svalová vlákna jsou tlustší než červená, obsahují více bílkovin, více glykogenu a vyznačují se rychlou kontrakcí a anaerobním metabolismem. Kůže je požitelná, neobsahuje žlázy, je pokryta peřím, které vyrůstá z papil. Má vysokou schopnost absorbovat vodu [18; 45].

1.4 Hygienická a zdravotní nezávadnost drůbežního masa

S jakostí úzce souvisí hygienická a zdravotní nezávadnost drůbežního masa. Veškeré potravinářské provozy musí splňovat podmínky Státní veterinární správy pro výstavbu a provoz. Zákonnou povinností výrobců potravin je zabezpečit zdravotní nezávadnost výrobků, kterou ukládá Zákon o potravinách a tabákových výrobcích č.110/1997 Sb. [45].

Podle vyhlášky ministerstva zemědělství č.89/2000 Sb. zákona 110/1997, o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich, těla jatečně opracované drůbeže musí být bez zářezů, vpichů, krevních podlitin, otlaků, odřenin a pohmožděnin, nesmí obsahovat zbytky sražené krve, kostní tříšť, úlomky kostí a zlomené kosti, nesmí vykazovat známky dehydratace a žluknutí tuku. Drůbež může mít ojediněle zbytky vlasového peří, zbytky plic a vnitřní plstní sádlo. Nedělená drůbež se uvádí do oběhu kuchařská bez hlavy a běháků [58].

Chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky použití látek přídatných, pomocných a potravních doplňků stanovuje vyhláška ministerstva zdravotnictví č. 53/2002 Sb. Tato vyhláška stanoví množství a druhy látek přídatných, pomocných a potravních doplňků, které se smějí vyskytovat v potravinách a potravinových surovinách, podmínky jejich použití, potraviny a potravinové suroviny, v nichž se mohou tyto látky vyskytovat. Dále tato vyhláška stanoví přípustná množství látek kontaminujících, které smějí potraviny a potravinářské suroviny obsahovat. Nejvyšší přípustné úrovně radioaktivní kontaminace potravin stanoví zvláštní právní předpisy [55].

1.5 Mikrobiální kontaminace masa

Jedním z nejdůležitějších hygienických problémů je mikrobiální kontaminace poražené drůbeže. Riziko představují zejména patogenní mikroorganismy z nichž u drůbeže jsou nejvýznamnější *Salmonella enteritidis* a *Campylobacter jejuni*. Termofilní druhy rodu *Campylobacter* jsou příčinou bakteriálních gastrointestinálních infekcí nejčastěji v USA, Anglii a Walesu [21; 45; 46]. Ke kontaminaci může docházet primárně nebo sekundárně [45].

1.5.1 Primární kontaminace

K primární kontaminaci dochází za života zvířete infekcí virulentními patogenními mikroby, kontaminací střevní mikroflórou nebo při poranění zvířete a kontaminací otevřené rány. K primární kontaminaci masa střevní mikroflórou dochází při oslabení nebo úplném selhání obranného systému a tím i střevní bariéry u zvířat nemocných, unavených, vyčerpaných, hladovějících a stresovaných. V těle zvířete se mikroby mohou za vhodných podmínek pomnožit a vyvolat tak celkové klinické onemocnění zvířete. Nebo obranný systém zvířete infekci zvládne a zvíře neonemocní. Mikroby však mohou přežívat v mase a orgánech a při neodborném zacházení s masem se mohou pomnožit a ohrozit jeho údržnost a zdravotní nezávadnost [46].

1.5.2 Sekundární kontaminace

Sekundární kontaminace nastává po smrti zvířete, nezávadná potravina je kontaminována při výrobě, distribuci, skladování, transportu, při křížové kontaminaci, nečistým provozem, pracovní plochou, nástroji, noži. Sekundární kontaminaci je maso vystaveno od okamžiku poražení zvířete ve všech fázích jatečného opracování, v průběhu dalších operací až do spotřeby. Velký význam má také kontaminace znečištěnou vodou při chlazení drůbežích těl, kontaminace obsahem zažívacího traktu. K tomu přispívá vysoká absorpční schopnost kůže, která je požitelnou částí masa. Hlavním problémem je snížení povrchové mikrobiální kontaminace drůbeže po jatečním opracování [21; 46; 74].

1.6 Alimentární onemocnění z masa

Přítomnost některých mikroorganismů v potravinách může vyvolat onemocnění člověka. Onemocnění alimentárního původu dělíme na alimentární infekce a alimentární intoxikace.

1. alimentární infekce – pro alimentární infekce je typické, že původci onemocnění jsou přítomni v potravinách v době její konzumace a po požití potravin způsobují v lidském onemocnění. Mikroorganismy jsou přítomny v potravině a mohou se v rozmnožovat. Do této skupiny patří většina původců známých alimentárních onemocnění, například *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* [46].
2. alimentární intoxikace – intoxikace z potravin vznikají účinkem toxických metabolitů, které se tvoří činností bakterií v potravinách. Rozhodujícím faktorem je přítomnost toxinů v potravině v době její konzumace, zatímco přítomnost mikroorganismu v potravině není podmínkou vzniku onemocnění. Řadí se zde například *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* [19; 46].

1.7 Mikroorganismy na povrchu masa

Kůže chlazené drůbeže má ideální podmínky pro růst širokého spektra mikroorganismů. Má dostatek živin, vody a vhodné pH okolo 6,6 nebo vyšší [21].

Bakterie obvykle se vyskytující na drůbeži jsou zejména rody *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Aeromonas*, *Clostridium*, druhy *Shewanella putrefaciens*, *Brochothrix thermosphacta*, bakterie z čeledí *Enterobacteriaceae*, *Micrococcaceae* a bakterie mléčného kvašení rodů *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Weissella*. Nejčastěji je zaznamenáván výskyt bakterií saprofytických - gramnegativní, oxidasa pozitivní tyčinky (*Pseudomonas*) a grampozitivní katalasa pozitivní koky (*Micrococcus*). Také mohou být přítomny kvasinky (*Cryptococcus*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*) [3].

Sledování složení mikroflóry a zejména detekce patogenních bakterií je jedním z aktuálních úkolů, které řeší současný výzkum potravinářské mikrobiologie [10].

1.7.1 Fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinky

Je to největší skupina bakterií, jejichž společným znakem je zkvašování glukosy.

1.7.1.1 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Čeleď *Enterobacteriaceae* zahrnuje gramnegativní fakultativně anaerobní střevní tyčinky. Má velký význam z hygienického hlediska, proto je jí v potravinářství věnována mimořádná

ná pozornost. Jde o nespočetné mikroorganismy, peritrichální nebo bez bičků, které mají respirační i kvasný metabolismus. Stanovují se například na Endově agaru, VCŽL agaru, MacConkeyho agar [42; 46; 51]. Okyselují glukosu (někdy s produkcí plynu) i řadu jiných cukrů a cukerných alkoholů, většinou jsou oxidasa negativní a katalasa pozitivní, převážně redukují také nitráty [42].

Nalézají se v půdě, vodě, ovoci, zelenině, na kvetoucích rostlinách a stromech [2]. Dále se vyskytují v trávicím ústrojí a okolí lidí a zvířat, odkud se dostávají do prostředí a znečišťují odpadní vody a krmivo [46]. Jsou indikátory fekálního znečištění, udávají stav hygieny při výrobě nebo distribuci potravin. Pro svou termolabilitu jsou také dobrým indikátorem spolehlivosti pasterace a termizace potravin. Vedle nepatogenních a podmíněně patogenních rodů sem patří i obávané střevní patogeny (*Salmonella*, *Shigella*) [48]. Bakterie jsou převážně mezofilní, s růstovým optimem 37 °C, ale mohou růst v rozmezí 18 – 42 °C, některé druhy se množí i při chladírenských teplotách [46; 2; 51].

V čeledi *Enterobacteriaceae* je vytvořeno 28 rodů, například: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Proteus*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Yersinia*, *Morganella* a další [2].

Rod *Escherichia*

Z hygienického hlediska je nejdůležitější rod *Escherichia*, jehož některé druhy (*E.coli*, *E. ferusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. blattae*) jsou obyvateli střevního traktu různých živočichů [42; 2]. Zkvašují glukosu za tvorby plynu [51].

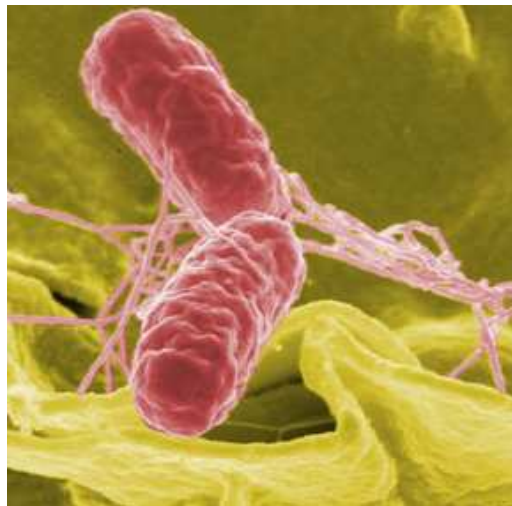
Druh *Escherichia coli*

E. coli byla objevena v roce 1885 německým pediatrem a bakteriologem Theodorem Escherichem [63]. Jedná se o nejprozkoumanější mikrobiální druh, neboť slouží jako modelový organismus pro biochemické, genetické i fyziologické studie a je také prvním bakteriálním druhem, u něhož byla pozorována a prostudována konjugace buněk a výměna genetického materiálu [48].

E. coli, zobrazena na obrázku (Obr. 1), je součástí normální mikroflóry zažívacího traktu teplokrevných zvířat i člověka. Bakterie mají velmi široké teplotní spektrum růstu 10 – 45 °C. Snáší kyselé i zásadité prostředí (pH 4,4 – 9,0) a jsou schopny růst i při 5% NaCl [46; 48; 51]. *E. coli* zkvašuje cukry za intenzivní tvorby kyselin a plynu. Této biochemické vlastnosti se využívá při průkazu v potravinách nebo vodě [48].

Infekční dávka, která může vyvolat onemocnění u zdravého dospělého člověka se pohybuje podle typu patogenity mezi 10^6 až 10^8 buněk. Nejčastější příčinou onemocnění *E. coli* člověka bývá požití masa, zvláště masa mletého kontaminovaného patogenními kmeny *E. coli*. Příčinou je obvykle sekundární kontaminace již hotových pokrmů. I když většina kmenů *E. coli* nemůže způsobit onemocnění, jejich výskyt v potravině zvyšuje pravděpodobnost výskytu toxinogenních kmenů *E. coli* nebo jiných nežádoucích mikroorganismů [46; 30].

E. coli, které způsobují onemocnění, se dělí do 4 skupin podle principu svého působení: enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), enterotoxické kmeny (ETEC), enterohemoragické, verotoxinogenní *E. coli* (EHEC/VTEC). Zvláště nebezpečný je kmen *Escherichia coli* O157:H7, který způsobuje vážné hemoragické záněty tlustého střeva a hemolyticko-uremický syndrom [14; 63].



Obr. 1. *Escherichia coli* [63]

Rod *Salmonella*

Salmonella byla poprvé izolována v roce 1885 z vepřů. Studii se zabýval americký veterinární patolog Daniel Elmer Salmon, po kterém byla později také pojmenována [73]. Salmonelózy jsou střevní infekce vyvolané různými serotypy rodu *Salmonella*. Salmonely jsou primárními střevními patogeny člověka a zvířat. Běžně rozšířené v přírodě – ve vodě, půdě, odpadcích [2]. V dnešní době je známo přes 2200 serotypů salmonel [46]. Podle genetické analýzy bylo zjištěno, že rod obsahuje jediné genospecies, označené *Salmonella ente-*

rica. 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 [2].

Salmonela se obvykle nachází v drůbežích produktech a vejcích. Je možné ji snížit například přidáním organických kyselin do krmiva [22].

Z epidemiologického hlediska lze salmonely rozdělit do 3 skupin. První skupina obsahuje *Salmonella typhi* a *Salmonella paratyphi* a jsou patogenní pouze pro člověka. Do druhé skupiny lze zahrnout serotypy, které jsou patogenní pro zvířata. Třetí největší skupina obsahuje serotypy patogenní pro člověka i zvířata. Onemocnění vzniká po požití živých mikrobů, které napadají střevní mukózu, kde se množí, produkují endotoxiny a způsobují různý stupeň enteritidy. Zdrojem nákazy mohou být kontaminované potraviny nebo voda. Mohou pronikat do krevního oběhu a být tak zaneseny do všech orgánů a masa [46; 2].

V klinické laboratoři jsou obvykle izolovány na MacConkey agaru, XLD agaru nebo DCA agaru, kde se využívá diagnostického znaku schopnosti produkovat H₂S, jehož přítomnost se projeví černým zabarvením uprostřed kolonie [73].

Salmonely mohou růst v rozmezí teplot 5 až 47 °C, s optimem 37 °C a při pH 6,5 – 7,2. Teploty nad 60 °C salmonely výrazně poškozují, teploty nad 70 – 75 °C je spolehlivě usmrccují [40; 46; 51]. Jsou citlivé vůči organickým kyselinám, toho se využívá při výrobě tepelně neopracovaných výrobků, kde vznik organických kyselin zabraňuje množení [46].

Rod *Yersinia*

Jde o kokobakterie až tyčinky zkvašující glukosu za tvorby plynu. Růstové teplotní rozmezí činí 0 – 40 °C, s optimem 28 – 30 °C. *Yersinie* se nacházejí v půdě a povrchových vodách, v trávicím ústrojí zvířat i lidí, potravinách [51; 2; 42].

Druh *Yersinia enterocolitica*

V potravinářství má význam druh *Yersinia enterocolitica*. Zdrojem *Y. enterocolitica* jsou především prasata, drůbež, skot, ptáci. Vyskytuje se v primárně infikovaném masu [46; 2; 19]. *Y. enterocolitica* patří mezi organismy, které jsou schopny se množit i při chladírenských teplotách. Roste v širokém rozmezí teplot od 1 až do 43 °C. Teplota 60 °C ji inaktivuje během 3 minut. Zdrojem onemocnění je požití syrového nebo nedostatečně tepelně opracovaného masa i mléčných výrobků [46].

1.7.2 Gramnegativní aerobní tyčinky

Rod *Pseudomonas*

Patří sem striktně aerobní rovné nebo mírně zahnuté tyčinky, pohybující se polárními bičíky na jednom nebo obou koncích. Metabolicky jsou nenáročné, tvoří katalasu a oxidasu, některé tvoří pigmenty. Rostou v teplotním rozsahu od 4 – 42 °C [2; 51].

Běžně se vyskytují ve volné přírodě, v odpadních vodách, střevním traktu zvířat i člověka, na mase. Jsou saprofytické a účastní se rozkladu organické hmoty [2; 3]. Rozkladné produkty glukosy, nacházející se v mase, slouží jako zdroje uhlíku pro činnost *Pseudomonas*. Pseudomonády štěpí aminokyseliny za vzniku nestálých, páchnoucích sulfidů, esterů a aminů. Tento rozkladný proces způsobuje kažení a hnití masa [3].

1.7.3 Aerobní nebo mikroaerofilní gramnegativní bakterie

1.7.3.1 Čeleď *Campylobacteraceae*

Bakterie rodu *Campylobacter* jsou typickými zástupci čeledi *Campylobacteraceae*. Patří sem zakřivené tyčinky až spirálky s několika závitů, velké 0,2 – 0,5 x 0,5 – 0,8 µm. Jsou mikroaerofilní s respiratorním typem metabolismu. Biochemické schopnosti jsou vyjádřeny tvorbou oxidasy, katalasy a sirovodíku. Nacházejí se v dutině ústní a střevech člověka i zvířat. Některé druhy jsou patogenní [51; 42].

Druh *Campylobacter jejuni*

Je to drobná mikroaerofilní tyčinka, která vyžaduje ke svému růstu snížené množství kyslíku a přítomnost CO₂ a dusíku. Velmi častým nositelem *C. jejuni* je především drůbež a volně žijící ptáci. Výskyt u drůbeže se dosahuje 60 až 80 %. Růstová teplota je 30 – 40 °C. *Campylobacter jejuni* není schopen se v potravinách množit, ale může zde v mikroaerobních podmínkách přežívat různě dlouhou dobu [46].

Kampylobakteriózy dříve spojované s onemocněním zvířat se staly v posledním desetiletí přibližně stejně častými původci onemocnění člověka jako salmonely. V současnosti je popsáno 14 druhů, ale patogenní pro člověka je jen *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*. Typickým zdrojem jsou živočišné potraviny (drůbež, mléko, vepřové maso) a špatně tepelně opracované nebo sekundárně kontaminované výrobky. Minimální infekční dávka je nízká (10³) a přes velkou citlivost kampylobakterů k vyschnutí, vyšší teplotě a chlorovým

dezinfekčním prostředkům, přispívá k vysoké prevalenci jimi vyvolaných gastroenteritid [30; 2].

1.7.4 Pravidelné nesporující grampozitivní tyčinky a koky

Rod *Listeria*

Listeria je grampozitivní, krátká, fakultativně anaerobní tyčinka v přírodě rozšířená v půdě, vodě, na rostlinách i ve střevním obsahu zvířat (Obr. 2) [42]. Tyčinky mají velikost 0,5 – 2 μm . V preparátech se vyskytují samostatně nebo ve dvojicích. Listerie netvoří pouzdro ani spory [51; 2].



Obr. 2. *Listeria monocytogenes* [29]

Druh *Listeria monocytogenes*

Existuje několik druhů listerií, ale z epidemiologického hlediska je pro člověka významná *Listeria monocytogenes*. Listerie rostou v širokém teplotním rozmezí od 4 – 39 °C, teplota nad 70 °C je ničící během několika minut. Dobře se pomnožují i při vysokých koncentracích soli (10 % NaCl). Nenáročnost umožňuje listeriím dlouhodobé přežití i mimo hostitelský organismus [2; 46]. Listerie, které jsou nenáročné na živiny a teplotu, se dokáží množit i v chladírenských teplotách. Díky svému rozšíření v přírodě je možné různé druhy listerií nacházet v potravinářských prostorách jako jsou porážecí linky, chladírny a bourárenské pásy. Častým zdrojem listerií bývá zejména syrové mléko a sýry vyrobené ze syrového nebo nízkopasterizovaného mléka, syrová zelenina a výrobky typu paštik. Mezi faktory, které umožňují pomnožení listerií, patří potraviny s dlouhou dobou udržitelnosti, s neutrálním pH a vysokou vodní aktivitou [46].

Rod *Lactobacillus*

Charakteristickým znakem laktobacilů je produkce kyseliny mléčné jako hlavního metabolitu při fermentaci cukrů. Řada zástupců se využívá při výrobě fermentovaných potravin (jogurtů, sýrů, másla, kefírů, kysaného zelí). Jsou to fakultativně anaerobní, občas mikroaerofilní mikroorganismy (slabě rostou na vzduchu, ale lepší růst vykazují při redukované koncentraci kyslíku). Růst laktobacilů podporuje atmosféra s 5 % CO₂. Neredukují nitráty, katalasa negativní. Optimální růstová teplota je 30 až 40 °C a pH obvykle mezi 5,5 až 6,2. Laktobacily jsou široce rozšířené v prostředí, potravinách, nápojích, také znečištěné vodě, osídlují gastrointestinální trakt ptáků a savců [42; 2; 3].

Na základě konečných produktů fermentace cukrů se dělí do tří skupin: obligátně homofermentativní, fakultativně heterofermentativní a obligátně heterofermentativní laktobacily [42].

Rod *Staphylococcus*

Stafylokoky se mohou vyskytovat jednotlivě, po dvou nebo v nepravidelných shlucích. Mají většinou fermentační i respirační typ metabolismu, produkují katalasu. Při zkvašování cukrů se tvoří kyselina, nikoliv plyn [2]. Jsou citlivé k lyzujícím účinkům lyzostafinu, ale rezistentní k enzymu lysozymu. Optimální růstová teplota je 30 – 37 °C, rostou v přítomnosti 10% NaCl. Vyskytují se na kůži, v půdě, vodě, písku, jsou izolovány z potravin živočišného původu (maso, mléko, sýry). Některé druhy jsou patogenní pro člověka i zvířata [42; 2].

*Druh *Staphylococcus aureus**

Řadí se mezi biochemicky neaktivnější bakteriální druhy. Patří mezi nejčastější původce patogenních onemocnění. Produkuje řadu enzymů a toxických látek (fosfatasy, proteasy, lipasy, penicilinasy). Lidský organismus je vůči stafylokokové infekci poměrně odolný, k onemocnění dochází při oslabení organismu. Nachází se na rukou, sliznici dýchacího a zažívacího traktu. Vyskytují se také u drůbeže, způsobují mastitidu dojníc a ovcí [2].

Stafylokoková enterotoxikosa je častým onemocněním z potravin. Je způsobena toxinem produkovaným mikroorganismem *S. aureus*. Serologicky lze rozlišit minimálně 5 typů enterotoxinů A až E, na onemocnění se nejčastěji podílí enterotoxin typu A [46].

1.7.5 Grampozitivní tyčinky a koky tvořící endospory

Rod *Clostridium*

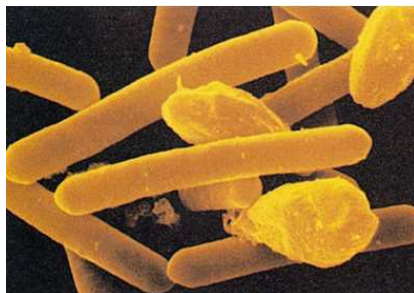
Rod *Clostridium* má buňky tvaru pleomorfních tyčinek (rovné nebo mírně zakřivené, různá délka) uspořádané po dvou nebo v krátkých řetízcích. Většinou mají peritrichální bičíky a jsou katalasa negativní. Vytváří oválné nebo kulaté spory, které jsou větší než vegetativní buňka [42]. Většina druhů se řadí k obligátním anaerobům. Některé druhy mají silné proteolytické schopnosti a uplatňují se při anaerobním rozkladu bílkovin, jiné mají sacharolytické schopnosti. Rostou v širokém teplotním rozmezí 10 až 65 °C, s optimem při 37 °C [51;42].

Druh *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens produkuje řadu látek způsobujících množství toxických efektů a na základě produkce hlavního letálního toxinu se rozděluje se do 5 skupin A až E. Pro člověka je významný typ A, který způsobuje onemocnění z potravin. *Clostridium perfringens* se běžně vyskytuje v přírodě, půdě, vodě, na rostlinách a je součástí mikroflóry tlustého střeva. Roste při teplotách 10 až 65 °C [42]. Spory přežívají teplotu 60 °C. Během tepelné úpravy pokrmů jsou zničeny pouze vegetativní buňky. Spory některých kmenů však přežívají i několikahodinový var. Nejčastější příčinou onemocnění jsou hotové pokrmy (maso, paštiky, tlačanky, drůbež) [46; 51].

Druh *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum zobrazený na obrázku (Obr. 3) je striktně anaerobní mikroorganismus. Vyvolává velmi těžké a často smrtelné onemocnění z potravin. Při svém množení produkuje neurotoxin botulin, podle jehož odlišné antigenní struktury se rozlišuje 7 subtypů označených písmeny A až G. Pro člověka je patogenní toxin typů A, B, E, F, a G [42; 2]. Botulotoxin, který se tvoří jen za anaerobních podmínek, patří mezi nejprudší jedy, které se v přírodě vyskytují. 1 mg tohoto toxinu představuje smrtící dávku pro 16 000 lidí [48].



Obr. 3. *Clostridium botulinum* [61]

Botulotoxiny jsou bílkovinné povahy, proto se inaktivují zvýšenou teplotou, světlem, zářením a vysoce alkalickým prostředím (pH pod 4,5) [2; 19]. Technické parametry při průmyslové konzervaci potravin jsou cíleně stanoveny ke spolehlivé devitalizaci klostridiových spor a proto otravy, dnes poměrně vzácné, souvisí s konzumací podomácku konzervovaných zeleninových nebo masových konzerv a uzených mas [30; 46].

Rod *Bacillus*

Rod *Bacillus* je velmi rozsáhlý a v přírodě rozšířený. Jeho druhy tvoří většinou peritrichální tyčinky, které mají bohaté enzymatické vybavení. Řada druhů produkuje antibiotika polypeptidové povahy [48]. Více než 60 zástupců rodu *Bacillus* je možno dělit do tří morfologických skupin. Nejzávažnější onemocnění způsobuje *Bacillus anthracis*, patogen zvířat i člověka. Další druhy se podílejí na kontaminaci potravin a surovin živočišného původu [51; 42].

Druh *Bacillus cereus*

Bacillus cereus se často nachází v řetězcích. V přírodě je velmi rozšířen, zejména v půdě, vodě, na rostlinách. Vyskytuje se v řadě potravin, kam se dostává především surovinami (kořením, cukrem, škrobem, moukou). V surovinách je *B. cereus* přítomen ve formě spor, které mohou díky své vysoké termorezistenci přežít tepelné opracování [2; 51]. K otravám dochází při pomnožení této bakterie v potravě na koncentraci buněk 10^7 CFU/g [48]. *B. cereus* je schopen růst při teplotách 7 – 49 °C. Intoxikaci může vyvolat požití tepelně neopracovaných nebo nedokonale zchlazených potravin. Mohou to být kromě masných výrobků a konzerv především rýže, cereálie, koření, krémy, pudinky [46].

1.8 Kontaminace jatečných těl drůbeže během zpracování

Drůbež se chová většinou ve velkochovech a poráží a zpracovává se ve speciálních závodech. Bylo zjištěno, že kuřata vstupují do zpracovatelského podniku s nezbytným minimálním počtem bakterií, pocházejících ještě z výrobního podniku [43; 21]. Kůže tvoří i po porážce bariéru bránící svalovinu před přímou kontaminací [15].

V první fázi jatečného zpracování je zdrojem kontaminace peří. Při paření se dostávají mikroorganismy do pařící vody. Voda má teplotu 60 – 63 °C a díky tomu řada mikroorganismů, např. z čeledi *Enterobacteriaceae*, hyne. Během škrubání dochází na strojích k významnému přenosu bakterií na další kusy díky bakteriím ulpívajícím na škrubacích prstech po oškubání předešlých jatečných těl [43; 21; 45]. Dalším kritickým bodem je eviscerace. Při odstraňování vnitřností vzniká možnost kontaminace drůbeže i náradí. Omývání drůbeže snižuje počty mikroorganismů [45; 21; 3].

Tři hlavní skupiny mikroorganismů představují mikrobiální populaci jatečně opracované drůbeže: přirozená mikroflóra kůže, přechodná mikroflóra, která se dostala na kůži v době porážení a kontaminující mikroby, které adherují na kůži během zpracování (z nástrojů, vody) [21]. Pro skladovatelnost drůbeže jsou důležité nejen podmínky zpracování jatečných těl, ale také podmínky chlazení. Přerušení chladicího řetězce může urychlit růst mikroorganismů a tím i kažení [44; 21]. Kažení drůbeže se projevuje pachem, pH stoupá společně s obsahem amoniaku. Příčinou bývá zejména pomnožení pseudomonád (hlavně *P. fluorescens*, *P. putida*), zástupců *Moraxella*, *Aeromonas*, *Brochothrix* a *Shewanella*, které přežívají proces zpracování a množí se při chladicí teplotě. Jsou příčinou kažení výrobků skladovaných při chladících teplotách. Senzorické změny jsou patrné, když počet těchto psychrotrofů dosahuje $10^7 - 10^8$ CFU/g [43; 2; 3].

1.9 Vliv organických kyselin na prostředí

Většina potravin včetně drůbežího masa je vhodnou živnou půdou pro mikroorganismy, a proto musí být proti jejich rozkladné činnosti během zpracování, skladování a distribuce chráněna. Potraviny nesmí být nositeli patogenních ani toxinogenních mikroorganismů, které by mohly ohrozit zdraví konzumenta [7; 4].

Vysoká spotřeba drůbeže vede ke zvýšenému zájmu o bezpečnost produktů, nízkou kontaminaci a bezpečné balení, složení a také charakteristickou barvu a chuť masa [37]. Při vý-

robě hygienicky nezávadného drůbežího masa je pozornost zaměřená hlavně na výskyt a likvidaci potenciálně patogenních mikroorganismů (*Salmonella*, *Campylobacter*). Pro výrobu bezpečných potravin živočišného původu je nejdůležitější produkce živých zvířat bez patogenů a záruka, že zpracovatelské linky jatečných provozů jsou bez mikroorganismů. V současnosti existují určitá kontrolní opatření včetně dekontaminace jatečných těl a aplikace operačního systému HACCP [44; 21].

Nařízení č. 853/2004 Evropského parlamentu a Rady dovoluje dle povolení právního základu použití antimikrobiálního ošetření k odstranění kontaminace z povrchu drůbeže [37].

Kuřecí kůže se v průmyslu často používá do drůbežích výrobků a různých pochoutek. Je ovšem často vysoce kontaminovaná [9]. Nejen proto je důležité snížit mikrobiální kontaminaci na povrchu drůbeže. Jedna z metod může být aplikace dekontaminačního ošetření během procesu výroby [13]. Dekontaminace povrchu se může rozdělit do tří skupin: chemická, fyzikální a jejich kombinace:

- a) chemické ošetření – sloučeniny chloru, organické kyseliny (kyselina mléčná, octová, glukonová, citronová, kaprylová), anorganický fosfát (fosforečnan sodný), bakteriocidní látky (nisin), peroxid vodíku, ozon,
- b) fyzikální ošetření – pasterace, sterilace, chlad, sušení, voda (oplach, sprej, pára), vysoký tlak, UV záření, ionizující záření [4; 17; 13; 21; 3].

Konzervační chemické látky se používají především tam, kde z jakýchkoliv jiných důvodů nelze použít klasické způsoby konzervace [7].

1.9.1 Organické kyseliny

Při volbě organických kyselin, jako potravinářských aditiv, je třeba vzít v úvahu jejich vliv na organoleptické vlastnosti výrobku. Některá kyselá aditiva by nežádoucím způsobem mohla ovlivnit chuť nebo barvu výrobku, takže je vhodnější je jako konzervační přípravek přidávat ve formě soli, např. místo kyseliny sorbové se přidá její draselná nebo sodná sůl [7].

Konzervujícími organickými kyselinami se rozumějí kyseliny obsažené ve značnějším množství v ovoci nebo získávané ve velkém některými biologickými procesy – tedy kyselina citronová, vinná, jablečná octová a mléčná [26; 3].

Většina bakterií nesnáší pH nižší než 4,0 až 4,3, kdežto rozvoj kvasinek, plísní a některých acidofilních bakterií zastavuje teprve silnější až velmi silné okyselení. Avšak některé mikroorganismy jsou schopny organické kyseliny využít a tak prostředí postupně odkyselit [26].

V roztoku existuje pro organické kyseliny rovnováha závislá na hodnotách pH mezi nedisociovaným a disociovaným stavem. Optimální inhibiční efekt mají organické kyseliny při nízkých hodnotách pH, které podporuje nedisociovaný stav molekuly. V tomto případě je molekula volně permeabilní přes plazmatickou membránu a je takto schopna vstupu do buňky. Následně v důsledku styku s vyšší hodnotou pH uvnitř buňky molekula disociuje. Vznikají anionty a protony, které nemohou projít plazmatickou membránou a hromadí se v buňce. Inhibice bakteriálního růstu způsobená účinkem organických kyselin je způsobena potlačením základních metabolických reakcí, zátěží na intracelulární homeostázu pH a akumulací toxických aniontů [35; 53].

Použití organických kyselin jako dekontaminačních látek je povoleno v USA. EU nemá jednotný postoj při jejich používání. Některé země aplikaci organických kyselin dovolují (např. Belgie a Německo), jiné zase jejich použití zakazují (Francie, Nizozemí a Lucembursko, Norsko) [4]. Organické kyseliny a jejich soli se aplikují na povrch masa postříkem nebo máčením do roztoku, tím dochází k zpomalení růstu bakterií a prodloužení skladovatelnosti masa a drůbeže. Největšího účinku se dosáhlo u *B. thermosphacta*, *C. piscicola*, *L. curvatus*, *L. sakei*, *P. fluorescens* and *S. liquefaciens* [3].

1.9.2 Kyselina mléčná

Kyselina mléčná je přírodní organická kyselina kyselé chuti, lehce rozpustná ve vodě. Vzniká mléčným kvašením cukrů, například v mléce, sýrech, kyselém zelí [31].

Kyselina mléčná je nejdůležitějším zástupcem monokarboxylových hydroxykyselin. Má jeden asymetrický uhlíkový atom, a může se tedy vyskytovat ve dvou opticky aktivních formách L(+) a D(-). L-mléčná kyselina je pravotočivá a bývá přítomna v masě a vnitřnostech, kde vzniká při tělesné námaze z glykogenu [7]. Je tedy přirozenou složkou masa vznikající také při posmrtné glykolýze enzymovou přeměnou v anaerobním prostředí. Z glykogenu vzniká glukoso-6-fosfát, jenž přes řadu meziprojektu přechází na kyselinu pyrohroznovou redukující se na kyselinu mléčnou. Množství kyseliny mléčné, které se tak vytvoří, závisí na koncentraci glykogenu, a tedy na fyzickém stavu jatečných zvířat těsně

před porážkou [26; 12; 27]. Přirozený obsah kyseliny mléčné v mase je asi 10 g/kg. Toto množství přispívá k chuti masa a k jeho antimikrobiálním vlastnostem [4].

V posledním desetiletí je kyselina mléčná jednou z nejčastěji používaných přísad, které mají zvýšit výrobní jistotu, prodloužit údržnost a zvýšit zdravotní nezávadnost potravin. Na údržnosti se účastní jak působení mléčnanového iontu, tak snížením hodnoty pH a aktivity vody [31]. Kyselina mléčná v nedisociované formě proniká cytoplazmatickou membránou, snižuje vnitrobuněčné pH a působí baktericidně – usmrcuje bakterie [1; 32].

Použití roztoků kyseliny mléčné v koncentracích 1 – 2% snižuje počty bakterií na drůbeži ihned po porážce a během skladování, bez ovlivnění charakteristických rysů jako je barva a chuť [4]. Ošetření povrchu kyselinou je jednoduchá, levná, rychlá a efektivní metoda [9]. Význam zákroku spočívá především v dobré údržnosti vzorků ještě po pěti dnech ošetření, která byla způsobena zejména snížením povrchové kontaminace [27; 1].

Některé bakterie mohou po aplikaci kyseliny mléčné na povrchu kůže přežít. Jejich odolnost se zvyšuje s tukovou vrstvou kuřecí kůže, přežívají ve folikulech peří a mikroskopických trhlinkách [9].

1.9.3 Sorban draselný

Další běžně užívané chemické ochranné prostředky jsou sorbany a benzoany, látky odvozené od kyseliny sorbové a kyseliny benzoové. Jsou to organické kyseliny se známým antimikrobiálním účinkem [4]. Od roku 1940 se kyselina sorbová a její soli používají jako účinné antimikrobiální látky v potravinách, zelenině, ovoci, sýru, rybích produktech, sycečných nápojích včetně vín, menší uplatnění našly také v kosmetice, lécích a tabákových výrobcích [11]. Soli kyseliny jsou v práškové nebo granulované formě, kyselina sorbová je v bezpráškovém krystalickém stavu pro potraviny nebo jako prášek do krmiv [11].

Sorban draselný se využívá mnohem více než kyselina sorbová, protože je stabilnější a má větší rozpustnost, což se využívá při ošetření potravin vodnými roztoky. Jeho antimikrobiální účinky jsou značné na mase, včetně drůbeže, kde inhibují růst patogenních mikroorganismů jako je *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* a *Lactobacillus*. Při použití účinné koncentrace nedochází ke změně sensorických vlastností drůbeže [13; 3]. Sorbany vykazují inhibiční aktivitu proti širokému spektru kvasinek a bakterií. Tyto soli se tradičně používají

ke konzervaci potravin a jsou uznány jako ochranné látky a schválená potravinářská aditiva [13; 53].

Antimikrobiální aktivita kyseliny sorbové ve vodných roztocích je závislá na pH. Největší efekt má v nízkém pH a nedisociovaném stavu ($pK = 4,76$ při 25°C) [35; 53]. Nedisociované molekuly jsou bez náboje a mají lipofilní charakter, snadno pronikají membránou do buňky. Vysoké pH podporuje disociaci molekul kyseliny na nabitě částice, které nemůžou následně difundovat zpět [35]. Nedisociovaná molekula je zhruba 10 – 600x účinnější než anion [53]. V porovnání s jinými ochrannými prostředky, jako například kyseliny benzoové a propionové, které mají omezenou aktivitu mezi pH 4,5 a 5,5, sorbany mohou být aktivní i ve vyšším pH [11].

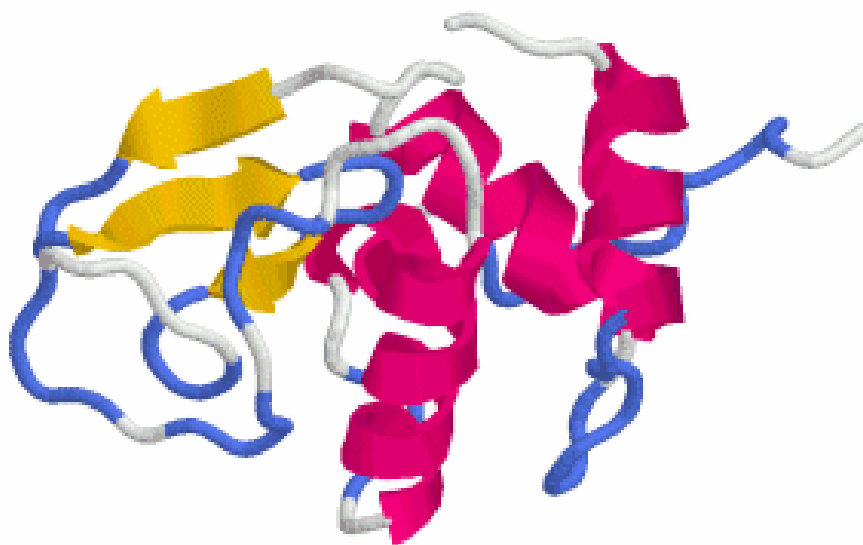
Ošetření masa sorbanem draselným brání rozmnožování patogenů (*Salmonella*, *Staphylococcus*) a prodlužuje skladovatelnost drůbeže. Účinek sorbanu draselného k salmonelám na povrchu kuřete je také ovlivněn teplotou. Ošetření masa sorbanem draselným se jeví účinnější v kombinaci s dalšími dekontaminačními prostředky [4].

Soli kyseliny jsou v práškové nebo granulované formě, kyselina sorbová je v bezpráškovém krystalickém stavu pro potraviny nebo jako prášek do krmiv [11].

1.9.4 Lysozym

Enzym lysozym je glykosidasa, která má baktericidní účinky a je schopna štěpit polysacharidové vazby mezi N-acetylglukosaminovými jednotkami a zbytky N-acetylmuramové kyseliny v buněčné stěně grampozitivních bakterií. Gramnegativní bakterie nejsou náchylné k enzymatickému působení lysozymu, protože peptidoglykanová vrstva je chráněná vnější membránou [16; 24; 41].

Lysozym (*Obr. 4*) ze slepičího bílku byl první enzym, pro který byl navrhnout detailní mechanismus činnosti založené na modelových studiích. Je široce zastoupen u všech organismů, od bakterií a bakteriofágů, přes houby, rostliny, až k obratlovcům. [16; 65].



Obr. 4. Prostorový model lysozymu [65]

Enzymy díky svým specifickým účinkům nacházejí uplatnění v nejrůznějších oblastech. Největší zájem o technické enzymové přípravky má chemický a potravinářský průmysl (masný, pekařský, mlékárenský průmysl) [47].

V současné době se zvyšuje zájem o použití přirozených antimikrobiálních prostředků v potravinářském průmyslu. Ovšem mnoho těchto má omezené spektrum aktivity a jsou účinné jen ve velmi vysokých koncentracích. Řešení tohoto problému je v použití kombinace různých látek, např. lysozymu s etylendiaminotetraoctovou kyselinou (EDTA). EDTA je chelatační činidlo, které má antimikrobiální aktivitu a je schopná zvýšit aktivitu bakteriostatik a antibiotik. Je účinné zvláště proti gramnegativním mikroorganismům z toho důvodu, že reaguje s fosfolipidy vnější buněčné stěny gramnegativních bakterií a tím zpřístupňuje buněčnou stěnu lysozymu [5; 1].

1.10 Legislativa

Používání přídatných látek je upraveno vyhláškou ministerstva zdravotnictví ČR č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných a pomocných látek při výrobě potravin [56]. Ve vyhlášce jsou zpracovány všechny směrnice EU týkající se přídatných látek. Podle této vyhlášky lze při výrobě potravin používat pouze přídatné látky uvedené v příloze 1 této vyhlášky [56; 46].

Přídavné látky mohou být povoleny pouze za předpokladu, že:

- a) je prokázána jejich technologická potřeba a účelu nelze dosáhnout jinými ekonomickými nebo technologickými prostředky,
- b) v navrhovaném množství nepředstavují žádné zdravotní riziko pro spotřebitele,
- c) nemohou uvádět spotřebitele v omyl [56].

Přídavné látky musí vyhovovat požadavkům na jejich identitu a čistotu, které jsou uvedeny ve vyhlášce ministerstva zdravotnictví č. 514/2006 Sb., kterou se stanoví zdravotní požadavky na identitu a čistotu přídavných látek. [57].

Přídavné látky se podle účelu používání a na základě jejich hlavní funkce, kterou v potravině obvykle plní, zařazují do jednotlivých kategorií. Podle tohoto zařazení spadá kyselina mléčná do kategorie c) konzervanty, kterými jsou látky, které prodlužují údržnost potravin, a které je chrání proti zkažení způsobené činností mikroorganismů [56].

Vyhláška také stanovuje limit nejvyššího povoleného množství (NPM) chemické látky v potravině. Hodnota NPM je proměnná, protože závisí na výši spotřeby dané skupiny potravin v populaci a na znalostech nebezpečí dané chemické látky [46].

2 CHARAKTERISTIKA PŮD POUŽÍVANÝCH V MIKROBIOLOGII

V potravinářském průmyslu byly vyvinuty důmyslné metody pro odhalení a identifikaci patogenů v potravinách. Využívají se k tomu selektivní média, která podporují růst požadovaných mikroorganismů a zabraňují růstu nežádoucím. Diagnostické medium je to médium, které poskytuje viditelnou identifikaci konkrétní fyziologické vlastnosti [77].

2.1.1 Plate count agar (PCA)

Pro stanovení celkového počtu aerobních mikroorganismů z mléka, mléčných výrobků, potravin, vody a dalšího materiálu, se používá nejvíce rozšířené mikrobiologické růstové médium Plate count agar (PCA) [59]. Tato univerzální půda neobsahuje žádné indikátory, obsahuje enzymový hydrolyzát kasein, kvasničný extrakt, D-glukosu a agar [62]. Kasein poskytuje aminokyseliny a další komplexní dusíkové sloučeniny a kvasničný extrakt dodává komplex vitamínu B [75]. pH půdy je $7,0 \pm 0,2$ při 25°C . Kultivace (Obr. 5) probíhá po dobu 18 - 24 hodin při $35 - 37^{\circ}\text{C}$ pro mezofilní aerobní bakterie, pro psychrotrofní 7 - 10 dní při 6°C a pro termofilní bakterie při 55°C 24 hodin [66].

Bakterie rostoucí na PCA jsou například rod *Pseudomonas*, *Comamonas* a *Acinetobacter* [28].



Obr. 5. Kolonie bakterií na PCA

2.1.2 Endo agar

Endo agar je mírně selektivní živná půda pro detekci laktosa pozitivních a laktosa negativních koliformních bakterií a dalších střevních mikroorganismů.

V 20. století většina živných půd pro stanovení střevních mikroorganismů obsahovala směsici žlučových solí, čímž se dosahovalo inhibice grampozitivních druhů. V roce 1904 pan Endo vynalezl živné médium pro rozlišení laktosy fermentujících od laktosa nefermentujících bakterií, ve kterém žlučové soli již nebyli. Inhibice grampozitivních mikroorganismů byla dosažena přítomným siřičitanem sodným a fuchsinem. Originální název agaru byl Endo Fuchsin Sulphite Infusion Agar dnes znám jako Endo agar. Endo agar je používán v mikrobiologických rozborech pitné a odpadní vody, mléčných výrobků a jídel [59].

Endo agar (*Obr. 6*) obsahuje pepton jako zdroj uhlíku, dusíku, vitamínů a minerálů. Kvasničný extrakt dodává vitaminy skupiny B, které stimulují růst bakterií. Chlorid sodný udržuje osmotický tlak, deoxycholát sodný a laurylsíran sodný jsou přidány jako inhibitory. Bazický fuchsin slouží jako pH indikátor, je karcinogenní, proto by manipulace s Endo agarem by měla být opatrná, aby nedošlo k inhalaci prášku a znečištění kůže.

Laktosa fermentující bakterie produkují acetaldehyd, který reaguje se siřičitanem sodným a fuchsinem za tvorby červených kolonií. Kovový lesk kolonií vzniká, když mikroorganismus produkuje aldehydy rychlou fermentací laktosy. Laktosu nefermentující bakterie tvoří jasné, bezbarvé kolonie (*Tab.3*) [59; 69].

Tab. 3. Přehled bakterií rostoucí na Endo agaru [62]

Mikroorganismy	Vzhled kolonií
Laktosa pozitivní	červené
<i>E. coli</i>	červené s kovovým leskem
<i>Enterobacter aerogenes, Klebsiella</i>	červené, slizovité kolonie
Laktosa negativní	bezbarvé, čisté kolonie



Obr. 6. Endo agar

2.1.3 Xylosa – lysin – deoxycholát agar (XLD agar)

XLD agar je selektivně-diagnostické médium používané pro izolaci střevních patogenů, obzvláště bakterií rodu *Salmonella* a *Shigella*. [78; 59]. XLD agar (Obr. 7) obsahuje kvasničný extrakt, substráty (lysin, laktosa, sacharosa, xylosa), fenolovou červeň (indikátor), citrát železitoamonný pro detekci produkce H₂S, deoxycholát sodný (inhibitor), thio-sulfát sodný a agar. Laktosa pozitivní mikroorganismy vyrůstají v nažloutlých koloniích, laktosa negativní v narůžovělých koloniích [59; 71]. Salmonely odštěpují karboxylovou skupinu lysinu a tím se udržuje neutrální popřípadě mírně zásadité pH (7,4). V tomto pH mohou salmonely produkovat sirovodík z indikátoru citrátu železitoamonného, což se projevuje vznikem kolonií s černým středem (Obr. 7) [71].

Typická morfologie kolonií a reakce na XLD agaru jsou:

E.coli - rozlehlé, žluté kolonie s okolní zónou

Enterobacter, Klebsiella - slizovité, žluté kolonie

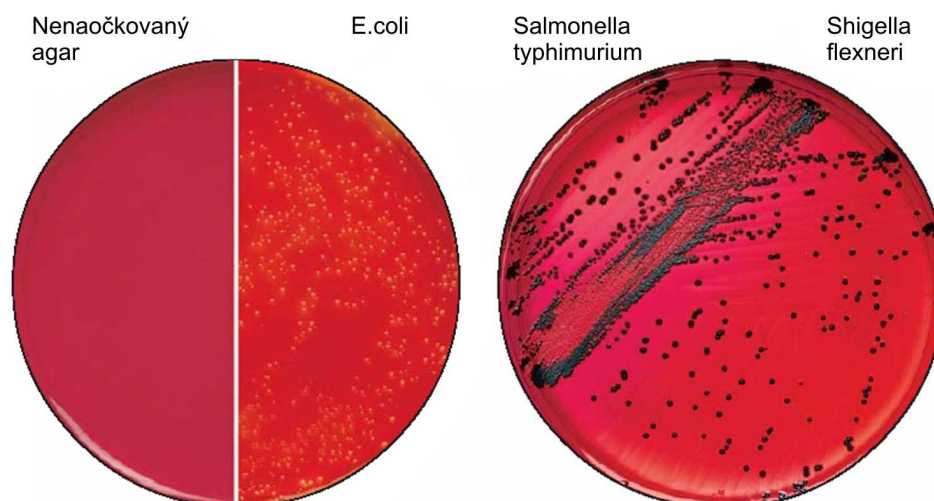
Proteus - červeno-žluté kolonie s černými středy a zápachem po rybině

Salmonella - červené kolonie s černými středy

Shigella - červené kolonie

Pseudomonas - červené kolonie

Grampozitivní bakterie - žádný růst nebo jen nepatrný [59; 71].



Obr. 7. XLD agar [59]

2.1.4 Glukoso-krasiničný chloramfenikolový agar (GKCHA)

Glukoso-krasiničný chloramfenikolový agar se používá pro selektivní izolaci a stanovení počtu kvasinek a plísni v mléce a mléčných výrobcích. Je to živné médium, které potlačuje doprovodnou bakteriální mikroflóru.

Půda (Obr. 8) se skládá z kvasničného extraktu, chloramfenikolu, dextrosy a agaru. Dextrosa je zdroj uhlíku a chloramfenikol inhibuje růst bakterií [59].



Obr. 8. GKCHA

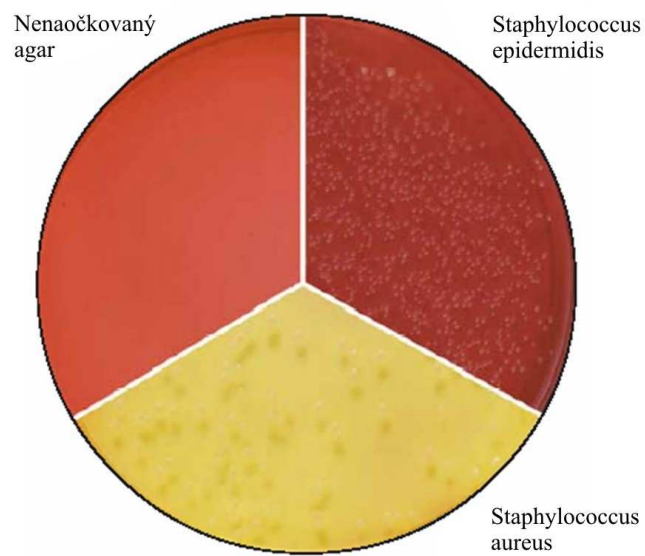
2.1.5 Mannitol Salt Agar (MSA)

Manit Salt Agar neboli MSA je běžně užívané médium pro selektivní izolaci a stanovení stafylokoků z klinických a neklinických materiálů. Agar je specifický tím, že obsahuje vysokou koncentraci soli NaCl (7,5 %) [70].

MSA (Obr. 9) obsahuje pepton a hovězí extrakt, jenž zahrnují základní růstové faktory jako je dusík, uhlík, síru a další látky [59]. Některé mikroorganismy, např. *Staphylococcus aureus*, zkvašují přítomný manitol za vzniku kyseliny a tím dochází ke snížení pH. To vede ke změně přítomného indikátoru fenolové červeně, na žluté zbarvení agar. Manitol negativní mikroorganismy vyrůstají v červených koloniích (Tab.4) [76].

Tab.4. růst bakterií na MSA médiu [59]

Mikroorganismy	Růst	Barva média okolo kolonie
<i>Enterobacter aerogenes</i>	úplná inhibice	---
<i>E. coli</i>	částečná inhibice	---
<i>Proteus mirabilis</i>	částečná inhibice	---
<i>Staphylococcus aureus</i>	dobrý	žlutá
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	dobrý	červená



Obr. 9. MSA [59]

3 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo testování a zhodnocení účinků kyseliny mléčné v kombinaci s různými koncentracemi sorbanu draselného a enzymu lysozymu na mikroflóru nebalené chlazené drůbeže.

V praktické části bylo sledováno:

1. vliv 2% kyseliny mléčné v kombinaci s 0,2% sorbanem draselným metodou ponoru
2. vliv 2% kyseliny mléčné v kombinaci s 0,2% sorbanem draselným a lysozymem metodou ponoru
3. vliv 2% kyseliny mléčné v kombinaci s 0,5% sorbanem draselným metodou ponoru
4. vliv 2% kyseliny mléčné v kombinaci s 0,5% sorbanem draselným a lysozymem metodou ponoru
5. vliv 2% kyseliny mléčné v kombinaci s 0,5% sorbanem draselným metodou postřiku
6. vliv 2% kyseliny mléčné v kombinaci s 0,5% sorbanem draselným s lysozymem metodou postřiku

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Seznam použitých laboratorních přístrojů, zařízení a chemikálií

4.1.1 Přístroje a zařízení

Autokláv 135 S, H+P VARIOKLAV /H+P Labortechnik AG, Německo/

Biologický termostat BT 120 /Laboratorní přístroje Praha/

Laboratorní sušárna MEMMERT UNB 400 /Fischer Scientific, spol. s r.o., Pardubice/

Chladnička Electrolux ERC 2521 /Electrolux s.r.o., Praha/

Třepačka LT2 /Sklárny Kavalier, a.s., Sázava/

Digitální váha KB 800-2 /KERN&Sohn GmbH, Německo/

pH metr HANNA pH 211 /Fisher Scientific, spol. s r.o., Pardubice/

Mikroskop LABORLUX S /LEITZ, Německo/

Vodní lázeň MEMMERT WB 22 /Fischer Scientific, spol. s r.o., Pardubice/

Automatická mikropipeta 100 – 1 000 µl /BIOHIT Plc., Finsko/

Anaerostat

Běžné laboratorní sklo

4.1.2 Chemikálie a živné půdy

Chemikálie:

KYSELINA MLÉČNÁ L(+)

Výrobce: PENTA – farmaceut. Divize Praha

Expirace: 02/2008

SORBAN DRASELNÝ (E 202)

Výrobce: AROMA Praha, a.s.

Expirace: 10/2008

CHLORID SODNÝ

Výrobce: Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod

Expirace: 11/2009

FYZIOLOGICKÝ ROZTOK

Složení: 8 g NaCl na 1000 ml destilované vody

HYDROXID DRASELNÝ p.a.

Výrobce: Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod

Expirace: 5/2009

PEROXID VODÍKU 30% extra čistý

Výrobce: Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod

Expirace: 6/2008

Lysozym (Lysozyme from chicken egg white 28262, 112500 U/mg)

Výrobce: Serva

Veškeré použité univerzální a selektivně-diagnostické půdy (tj. Plate Count Agar, Endo agar, XLD agar, glukoso-krasničný chloramfenikolový agar, *Lactobacillus* MRS agar, mannitol salt agar, anaerobic agar), byly vyrobené HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Indie a dodány firmou Čaderský – Envitek, spol.s.r.o.

Z biochemických testů Lachema Mikro-LA-Test byla použita souprava ENTEROtestu. Identifikace byla doplněna testy od stejného výrobce, dodávanými ve formě detekčních proužků: OXItest, VPtest a ONPtest. Z pomocných přípravků k mikrotestům byla použita činidla k identifikačním soupravám Mikro-LA-Test (Fosfatáza, Nitráty, VPT I, VPT II, Indol, Fenylalanin a parafinový olej sterilizovaný) a činidla k detekčním proužkům (činidlo VPT I, VPT II, Oxidáza, Acetoin).

4.2 Původ vzorků

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

4.3 Úprava vzorků pro analýzu

Jatečně opracovaná těla kuřat byla pro analýzu sterilně rozpůlena. Jedna půlka sloužila jako vzorek, na kterou se aplikovaly dané směsi roztoků a na druhou polovinu se aplikovala sterilní destilovaná voda, tato půlka sloužila jako kontrola.

4.4 Aplikace dekontaminantů

K dekontaminaci byla použita koncentrace 2% kyseliny mléčné, různé koncentrace sorbanu draselného (0,2%, 0,5%) a 100 mg enzymu lysozymu na 1 l. Množství lysozymu bylo použito dle literatury [20].

Byly použity dvě metody aplikace – ponor vzorků do směsi roztoků a postřik vzorků.

4.4.1 Aplikace metodou ponoru

Kuřecí půlka sloužící jako vzorek byla ponořena na 1 minutu do směsi roztoků (250 ml 2% kyseliny mléčné a 250 ml sorbanu draselného příslušné koncentrace s lysozymem), poté byla vyjmuta pomocí sterilní pinzety, položena na sterilní alobal, kde probíhalo schnutí, a ve kterém byla dále uchovávána. Druhá polovina kuřete byla ponořena do 500 ml sterilní destilované vody po dobu 1 minuty, vyjmuta a vložena na sterilní alobal. Stejný postup se opakoval i u vzorku bez ošetření lysozymem.

4.4.2 Aplikace metodou postřiku

Na kuřecí půlku sloužící jako vzorek bylo ze vzdálenosti 30 – 50 cm aplikováno pomocí rozprašovače 5 ± 1 ml směsi roztoků (25 ml 2% kyseliny mléčné a 25 ml 0,5% sorbanu draselného s lysozymem). Vzorek se nechal oschnout a byl uchováván ve sterilním alobalu. Na druhou půlku kuřete bylo aplikováno cca 5 ± 1 ml destilované vody. Kontrola se nechala uschnout na sterilním alobalu, ve kterém byla po celou dobu uchovávána. Stejný postup se opakoval i u vzorku bez ošetření lysozymem.

4.5 Měření pH

Hodnota pH byla zjišťována vpichovým pH metrem na povrchu kůže chlazené drůbeže. U vzorků určených pro aplikaci dekontaminantů bylo pH měřeno poprvé okamžitě po aplikaci směsi a poté každých 24 hodin před odebráním vzorků kůže. U každého vzorku a kon-

troly bylo provedeno měření povrchu kůže na pěti různých místech, abychom získaly průměrnou hodnotu.

4.6 Odběr vzorků pro analýzu

Při odběru vzorků byly dodrženy aseptické podmínky a používány sterilní nástroje. Pomocí pinzety a nůžek se odebralo cca 10 g vzorku kůže, který se dal do sterilní lahve se 100 ml fyziologického roztoku. Stejně se postupovalo u všech vzorků i kontrol. Lahve se vzorky kůže se umístily na třepačku, kde po dobu 15 minut proběhla homogenizace.

Ze získané suspenze bylo vytvořeno desítkové ředění do takového stupně, aby bylo možné stanovit počet mikroorganismů v 1 g daného vzorku. Bylo pipetováno 100 µl vzorku souběžně na dvě Petriho misky s příslušnou živnou půdou. Inokulum bylo rozetřeno sterilní hokejkou a následovala kultivace v podmínkách pro sledovanou skupinu mikroorganismů.

Počty kolonií byly přepočteny na CFU/ml a poté CFU/gram kůže a zlogaritmovány.

Při testování byly použity následující typy půd (podrobný popis viz. kapitola 2):

Plate Count Agar (PCA) - pro stanovení mezofilních aerobních mikroorganismů, kultivace 24 hodin při teplotě 37 °C

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

Endo agar – pro detekci a rozlišení laktosa pozitivních a laktosa negativních koliformních, kultivace 24 hodin při teplotě 37 °C

Xylosa-lysin-deoxycholat agar (XLD agar) - pro selektivní izolaci a stanovení počtu *Salmonella* sp., kultivace 24 hodin při teplotě 37 °C

Glukoso-kvasničný chloramfenikolový agar - pro selektivní izolaci a stanovení počtu kvasinek a plísní v mléce a mléčných výrobcích, kultivace 4 dny při teplotě 20 °C

Mannitol salt agar (MSA) - selektivní médium pro izolaci stafylokoků, kultivace 24 hodin při 37 °C

Lactobacillus MRS agar - pro kultivaci druhů rodu *Lactobacillus*, kultivace 24 hodin při 37 °C

Anaerobic agar - selektivní médium pro izolaci fakultativně a obligátně anaerobních mikroorganismů, kultivace 2 dny při teplotě 30 °C [60].

4.7 Identifikace kmenů

Úkolem identifikace bakteriální kultury je stanovení příslušnosti studovaného kmene k určité taxonomické skupině. Při identifikaci se sleduje několik skupin vlastností: morfologické, fyziologické a biochemické.

- Morfologické vlastnosti – tvar a zbarvení kolonií, charakter růstu, tvorba spor, přítomnost pouzdra, bičíků atd.
- Fyziologické vlastnosti – teplotní rozmezí růstu, vztah ke kyslíku, vztah k NaCl, typ metabolismu (aerobně nebo anaerobně respirační, fermentativní)
- Biochemické vlastnosti – využití zdroje uhlíku, redukce nitrátů, tvorba indolu, acetoinu.

Z povrchu kůže chlazené drůbeže bylo izolováno 28 kolonií v čisté kultuře. Následně byly provedeny biochemické identifikační testy.

U všech získaných kmenů se provedlo barvení podle Grama, pro ověření byl proveden KOH test. Dále byl proveden test pro důkaz produkce katalasy a u gramnegativních bakterií OXI test. Další biochemické testy byly voleny podle výsledků předchozích testů.

4.7.1 Použité biochemické testy

Barvení podle Grama

Jde o barvení fixovaného preparátu krystalovou violetí a následující moření buněk jódem v roztoku KI. Vzniká komplex barvivo, jód a složky buněčné stěny. Tento komplex se tvoří v grampozitivních i v gramnegativních bakteriích. Rozdíl vzniká při promývání preparátu organickým rozpouštědlem (acetonem nebo alkoholem). Z gramnegativních bakterií se komplex vymývá a odbarvují se, grampozitivních bakterie si zbarvení ponechávají.

KOH test

Na čisté podložní sklíčko byla kápnuta kapka 2% roztoku KOH do níž pomocí sterilní kličky byla rozmíchána část dané kultury. Při pomalém odtahování kličky směrem nahoru, bylo sledováno zda se tvoří táhnoucí viskózní hmota ve formě tenké nitky či nikoliv. Viskózní hmota se tvoří u gramnegativních bakterií, grampozitivní mají silnou peptidoglykanovou vrstvu v buněčné stěně, která způsobuje odolnost vůči účinkům louhu.

Stanovení aktivity cytochromoxidasy (OXI test)

OXI test je individuální test pro detekci cytochromoxidasy. Cytochromoxidasa je enzym, který se podílí na oxidačních procesech v buňce. Je přítomen u všech aerobních bakterií s respiračním metabolismem. Podstata testu je reakce derivátů p-fenylendiaminu se železem obsaženým v cytochromových respiračních komplexech.

Sterilní očkovací kličkou se odebrala dobře izolovaná kolonie testovaného kmene a vetřela se do impregnované zóny proužku testu. Přítomnost cytochromoxidasy je detekována zmodráním testovací zóny.

Důkaz produkce katalasy

Některé bakterie tvoří enzym katalasu, který rozkládá peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík. Katalázu tvoří především aerobní bakterie.

Na sterilní podložní sklíčko se nanasla kapka 2% roztoku peroxidu vodíku, do které se asepticky přenesla očkovací kličkou testovaná kultura bakterií. Přítomnost katalasy se projevila unikáním plynu - tvorba bublinek.

Oxidačně fermentační test (OFT)

Pomocí testu bylo zjišťováno jakým způsobem mikroorganismy využívají glukosu, zda fermentací nebo jen aerobní oxidací za přístupu vzduchu. Zkumavky byly současně zaočkovány zkoumanou kulturou. Povrch jedné ze zkumavek se přelil parafinovým olejem pro zajištění anaerobního prostředí a obě zkumavky se inkubovaly při teplotě 22 °C po dobu 24 hodin.

Bakterie oxidující glukosu aerobně způsobily změnu barvy indikátoru v půdě, vzniklo žluté zbarvení postupující od hladiny ke dnu zkumavky. Ve zkumavce s parafinem půda nezežloutla. Bakterie fermentující glukosu způsobily zežloutnutí v celém objemu půdy najednou v obou zkumavkách. Bakterie nerozkládající glukosu nezpůsobily změnu barvy v žádné zkumavce.

VP test

Test je určen pro detekci produkce acetoinu. Někteří příslušníci čeledi *Enterobacteriaceae* popřípadě i jinými bakteriemi může dojít při fermentaci glukosy ke vzniku acetoinu. Je to neutrální látka vznikající dekarboxylací a kondenzací dvou molekul kyseliny pyrohroznové. Oxidací acetoinu vzdušným kyslíkem se tvoří diacetyl, který se prokáže barevnou reakcí s α -naftolem v alkalickém prostředí.

Z čisté kultury se ve zkumavce s fyziologickým roztokem připravila suspenze. Do zkumavky byl vložen proužek tak, aby obě zóny proužku byly ponořené. Zkumavky byly umístěny do termostatu a inkubovány při 37 °C. Poté bylo přikápnuto činidlo pro VPT I ,II a byla zhodnocena výsledná barevná reakce.

Stanovení aktivity β -galaktosidasy (ONP test)

Test je určen pro detekci β -galaktosidasy. Proužek testu se vloží do suspenze testovaného kmene ve fyziologickém roztoku a inkubuje se v termostatu. V případě pozitivní reakce je β -galaktosidasou hydrolyzován o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid, reakce je detekována žlutým zbarvením uvolněného o-nitrofenolu.

ENTERO test

Souprava ENTERO testů je určena pro identifikaci významných druhů střevních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. Test je tvořen dehydratovanými diagnostickými médii, která jsou na destičce. Z čisté 24 hodinové kultury byla připravena ve fyziologickém roztoku suspenze. Do každé jamky se odpipetovalo 0,1 ml suspenze. K určeným testům se přidaly 2 kapky parafinového oleje a inkubovalo se 18 – 24 hodin při 37 °C. Po inkubaci se k určeným testům přidalo po jedné kapce činidla. Při hodnocení testu byly výsledky porov-

nány s barevnou srovnávací stupnicí a výsledky byly vyhodnoceny softwarovým programem TNW-Lite.

4.8 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí statistického systému UNISTAT[®], verze 5.5.05. (Unistat Ltd., London, UK) [50].

Pro srovnání úrovní zjištěných hodnot mikroorganismů mezi kontrolním vzorkem a ošetřeným vzorkem pomocí dekontaminantů, pro srovnání účinků jednotlivých látek mezi sebou a srovnání dvou odlišných metod ošetření vzorků byl použit Duncanův test. Test byl proveden na 5% hladině významnosti (tj. s 95% spolehlivostí), což znamená, že maximální pravděpodobnost chyby prvního druhu (zamítnutí správné hypotézy) je 5 %.

5 VÝSLEDKY

V experimentální části byl zkoumán vliv organických kyselin samostatně nebo v kombinaci s lysozymem na vybranou mikroflóru povrchu chlazené drůbeže pomocí metod ponoru a postřiku.

Získané a zpracované výsledky všech skupin mikroflóry a statistická vyhodnocení jsou zpracovány v tabulce umístěné v příloze P I. Jsou zde vyjádřeny počty mikroorganismů rozdělených dle sledovaných skupin během chladírenského skladování drůbeže (po dobu použitelnosti). Výsledky byly získány odečtením log CFU/g kůže od kontroly v prvním dnu skladování a doplněny směrodatnou odchylkou.

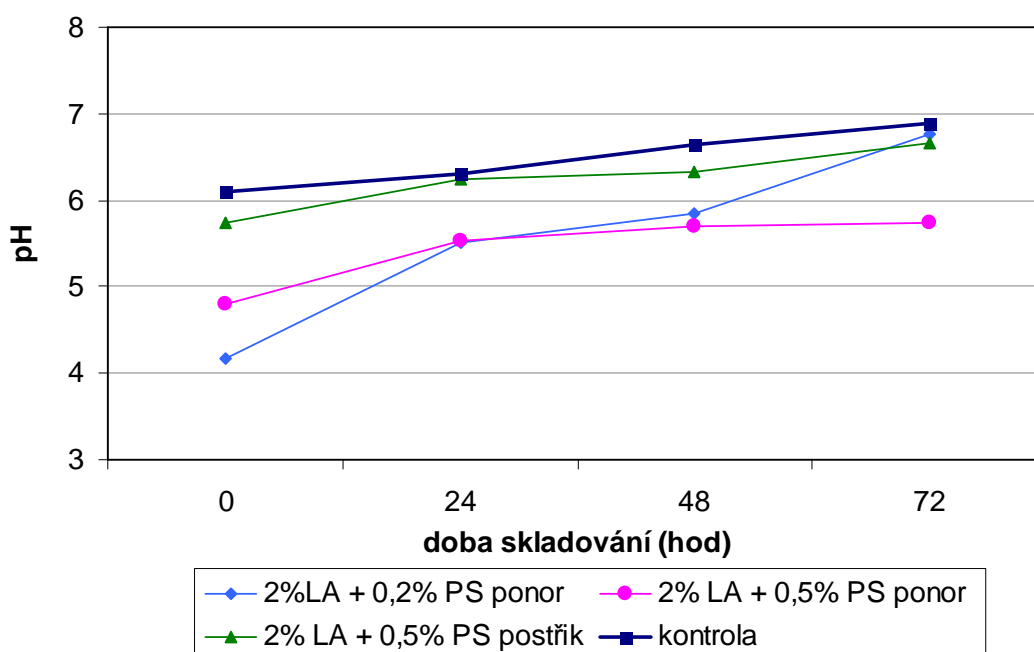
5.1 Vliv dekontaminantů na hodnoty pH

Hodnoty pH byly měřeny v odstupu 24 hodin po celou dobu chladírenského skladování drůbeže. Po ošetření povrchu směsí s kyselinou mléčnou a sorbanem draselným došlo u vzorků ke snížení pH oproti kontrole. Během chladírenského skladování se rozdíl v hodnotách pH pozvolna snižoval. Nejvýznamnější rozdíl mezi hodnotou vzorku a kontroly byl ihned po aplikaci dekontaminačního roztoku (v hodině 0). Tehdy průměrná hodnota pH neošetřeného vzorku dosáhla 6,09, zatímco hodnoty ošetřených vzorků se pohybovaly v průměru o jednu a půl jednotky níže, vyjma metody postřiku, kde rozdíl byl méně než půl jednotky. Podle statistického vyhodnocení významný rozdíl mezi kontrolou a ošetřeným vzorkem byl u metody ponoru, kdy došlo k výraznému snížení pH. Srovnání neošetřeného vzorku s ošetřeným metodou postřiku byl sledován rozdíl pouze ihned po aplikaci směsi v hodině 0, poté se hodnoty pH vzorku zvyšovaly. Rozdíly v pH mezi srovnávanými metodami byly vyhodnoceny jako statisticky významné po celou dobu chladírenského skladování (0 až 72 hodin).

Naměřené hodnoty pH byly zpracovány do tabulky (Tab.5) a z ní je sestaven graf (Obr. 10) znázorňující průběh vlivu jednotlivých dekontaminačních směsí.

Tab. 5. Vliv jednotlivých dekontaminačních směsí na hodnoty pH kůže drůbeže během chladírenského skladování

doba skladování drůbeže	pH							
	ponor				postřik		kontrola	
	2% LA + 0,2% PS		2% LA + 0,5% PS		2% LA + 0,5% PS			
	pH	δ	pH	δ	pH	δ	pH	δ
0	4,18	0,25	4,79	0,12	5,75	0,22	6,09	0,24
24	5,52	0,31	5,53	0,21	6,24	0,13	6,30	0,21
48	5,85	0,25	6,09	0,23	6,32	0,14	6,65	0,19
72	6,76	0,25	6,74	0,33	6,66	0,23	6,89	0,22



Obr. 10. Vývoj pH po aplikaci jednotlivých směsí během chladírenského skladování

5.2 Vliv aplikace dekontaminantů na mikroflóru drůbeže

V první části experimentu byl sledován vliv 2% kyseliny mléčné s 0,2% sorbanem draselným bez přídavku a s přídavkem lysozymu metodou ponoru. Po statistickém vyhodnocení nebyly shledány významné rozdíly mezi vzorkem ošetřeným směsí s lysozymem a bez jeho přítomnosti.

Dále byl zkoumán vliv 2% kyseliny mléčné s 0,5% sorbanem draselným bez přídavku a s přídavkem lysozymu metodou ponoru. Po statistickém vyhodnocení taktéž nebyly žádné rozdíly mezi vzorkem ošetřeným lysozymem a bez vzorku bez něj.

V poslední části experimentu byl zkoumán vliv 2% kyseliny mléčné s 0,5% sorbanem draselným bez přítomnosti a s přítomností lysozymu metodou postřiku. Po statistickém vyhodnocení nebyly zaznamenány ani zde žádné rozdíly.

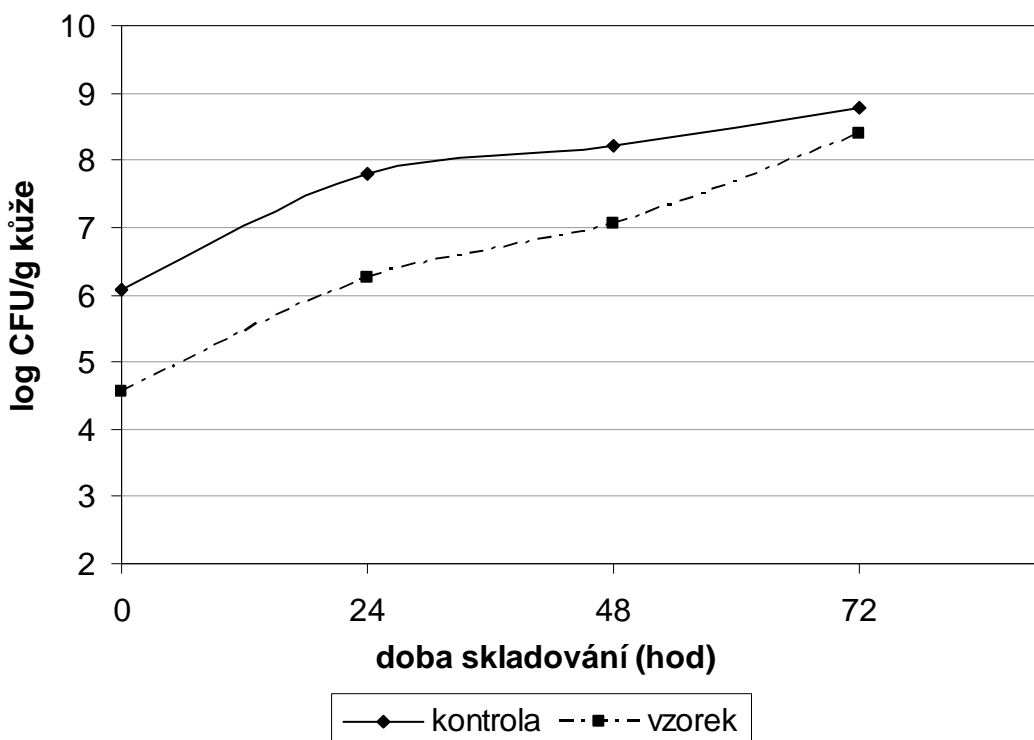
Ve všech částech experimentu byly sledovány celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů, koliformní bakterie na dvou typech půd (Endo agaru a XLD agaru), psychrotrofní mikroorganismy a kvasinky.

5.2.1 Vliv 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného metodou ponoru

Dekontaminační směs je složena z 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného a byla aplikována metodou ponoru. V tabulce (Tab. 6) jsou vyjádřeny hodnoty celkových počtů aerobních mezofilních mikroorganismů v log CFU/g kůže. Graf (Obr. 11) znázorňuje průběh růstu těchto mikroorganismů po aplikaci 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného. Antibakteriální účinek směsi je zřejmý po celou dobu skladování. První dva dny po ošetření je patrný rozdíl v účinnosti směsi aplikované na vzorek. Úbytek mikroorganismů mezi ošetřeným vzorkem a kontrolou po aplikaci (0 hodin) dosahoval 1,5 řádu log CFU/g kůže. S delší dobou skladování docházelo ke snižování rozdílu. V průběhu doby skladování se začíná účinek dekontaminantů snižovat a blížit k neošetřené kontrole. Dle statistického vyhodnocení je statisticky významný rozdíl účinnosti směsi pouze do 24 hodin od aplikace. Podle statistického vyhodnocení u kontroly i u vzorku došlo k významnému nárůstu počtu aerobních mezofilních mikroorganismů po celou dobu skladování.

Tab. 6. Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,2% PS
0	6,0865	4,5655
24	7,7852	6,2628
48	8,2304	7,0669
72	8,7797	8,3793



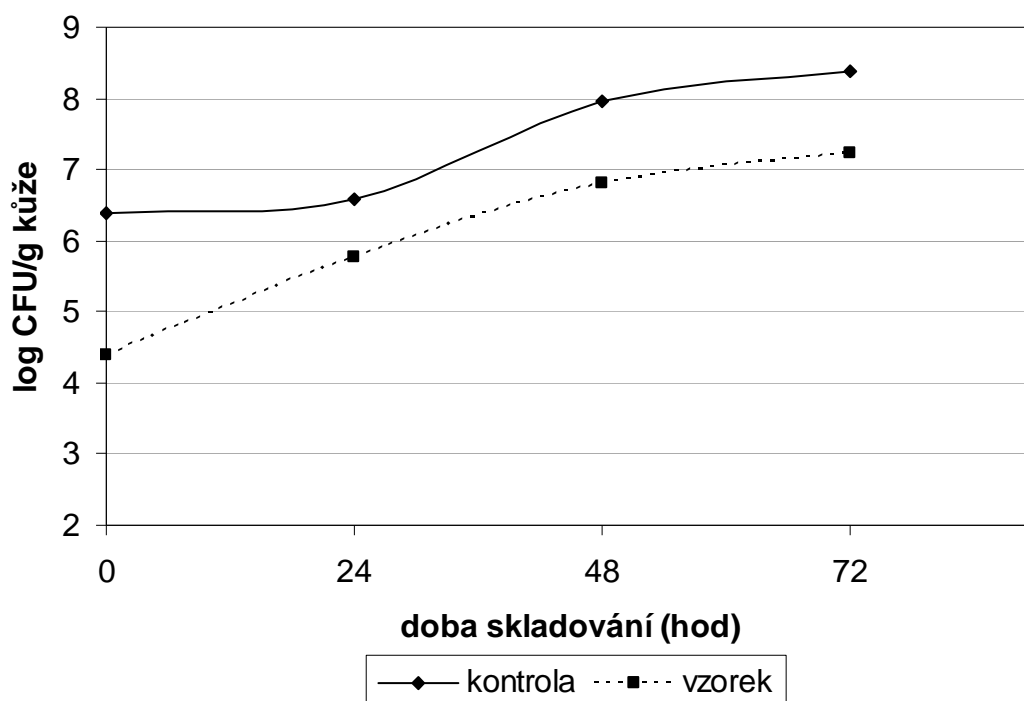
Obr.11. Dynamika růstu aerobních mezofilních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného

Na obrázku (Obr. 12, Tab. 7) je znázorněn průběh růstu koliformních mikroorganismů z Endo agaru po aplikaci směsi. Z grafu je patrné, že antimikrobiální účinek 2% kyseliny a 0,2% sorbanu je významný po celou dobu chladírenského skladování, což také dokazují výsledky statistického vyhodnocení pomocí programu. Mezi kontrolním vzorkem a vzorkem ošetřeným směsí byly statisticky prokazatelné rozdíly. Ihned po ošetření (0 hodin) dochází na vzorku k úbytku koliformních bakterií o více jak dva řády log CFU/g. Poté se účinnost směsi pomalu snižuje na rozdíl jednoho řádu log CFU/g kůže až do konce doby skladování.

K významnému nárůstu koliformních mikroorganismů na ošetřeném vzorku podle statistického vyhodnocení po celou dobu chladírenského skladování nedocházelo. Významný nárůst mikroorganismů byl prokázán pouze u kontroly.

Tab. 7. Celkové počty koliformních mikroorganismů kultivovaných na Endo agaru vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,2% PS
0	6,3788	4,3809
24	6,5900	5,7531
48	7,9542	6,8054
72	8,3739	7,2424



Obr. 12. Dynamika růstu koliformních mikroorganismů na Endo agaru v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného

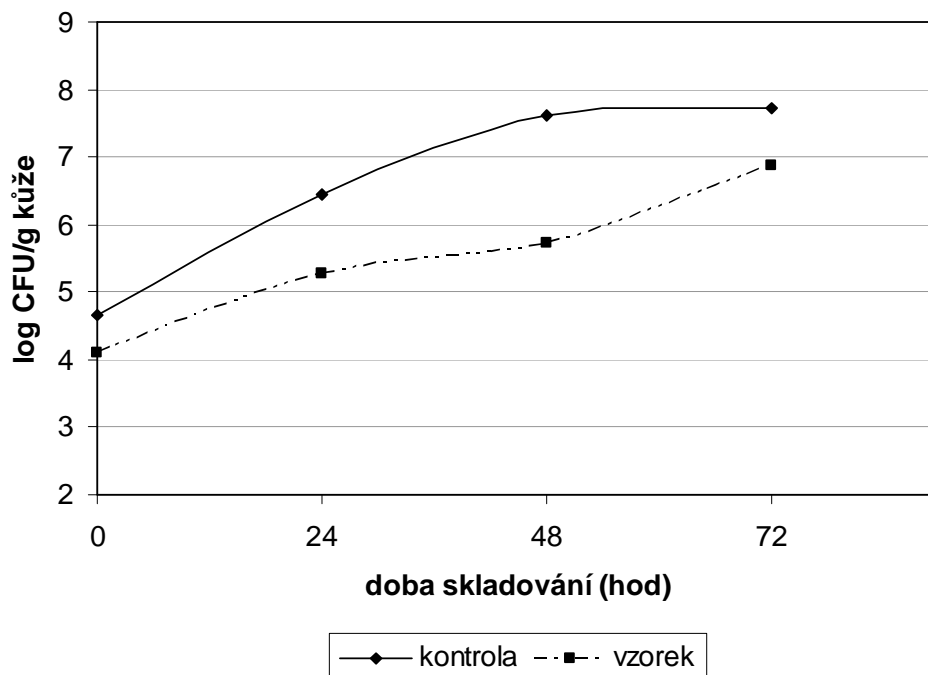
Obrázek (Obr. 13, Tab. 8) znázorňuje růst koliformních mikroorganismů na XLD agaru. Podle grafu vyplývá, že účinek směsi na danou mikroflóru chlazené drůbeže byl znatelný po celou dobu skladování. Úbytek mikroorganismů mezi kontrolou a vzorkem byl od necelých dvou řádu log CFU/g k 0,5 řádu log CFU/g. Podle statistického vyhodnocení vyplynu-

lo, že účinek této směsi nebyl statisticky významný na daný okruh mikroorganismů vyskytujících se na kůži chlazené drůbeže.

K významnému statistickému nárůstu během skladování došlo u vzorku v hodinách 0 a 24 po aplikaci. Poté již nárůst nebyl takový aby byl vyhodnocen jako významný. K statisticky významnému nárůstu docházelo u kontroly.

Tab. 8. Celkové počty koliformních mikroorganismů kultivovaných na XLD agaru vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,2% PS
0	4,6568	4,0925
24	6,4554	5,2759
48	7,6063	5,7360
72	7,7348	6,8735



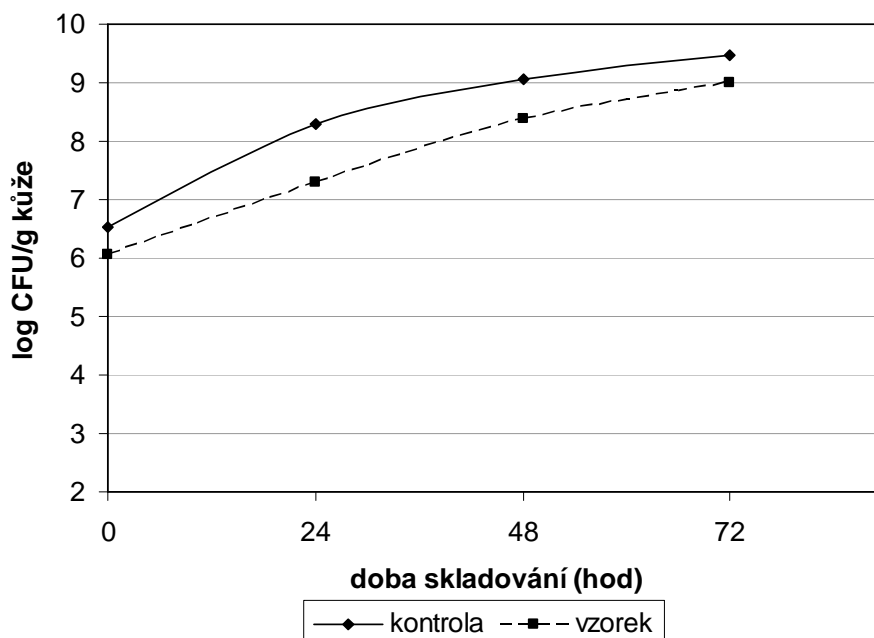
Obr. 13. Dynamika růstu koliformních mikroorganismů na XLD agaru v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného

Obrázek (Obr. 14, Tab. 9.) znázorňuje průběh růstu psychrotrofních mikroorganismů. Jak je z grafu patrné, mezi vzorkem a kontrolou je vidět rozdíl v účinnosti aplikované směsi po celou dobu skladování. Toto potvrzuje i statistické vyhodnocení, které ovšem uvádí, že v 48 hodině skladování nedošlo k významnému rozdílu. Množství psychrotrofních mikroorganismů na vzorku je v průměru o půl až jeden řád log CFU/g kůže nižší než oproti kontrole.

Nárůst psychrotrofních mikroorganismů během chladírenského skladování byl na ošetřeném vzorku byl po celou dobu statisticky významný. K statisticky významnému nárůstu psychrotrofních mikroorganismů docházelo i u kontroly.

Tab. 9. Celkové počty psychrotrofních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,2% PS
0	6,5243	6,0458
24	8,2876	7,2999
48	9,0607	8,3782
72	9,4708	8,9858



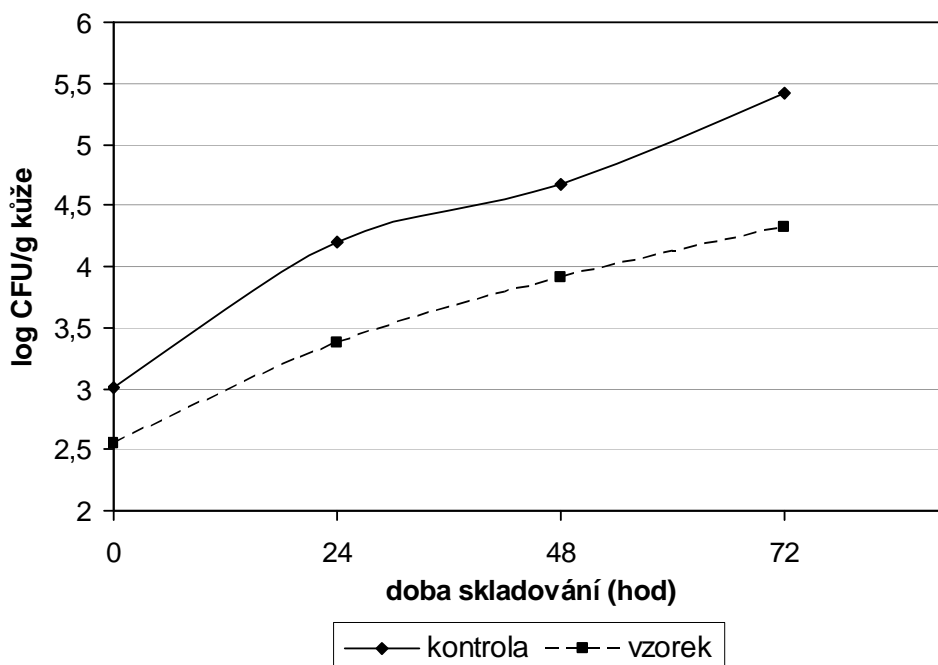
Obr. 14. Dynamika růstu psychrotrofních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného

Na obrázku (Obr. 15, Tab. 10) je znázorněn průběh růstu stafylokoků. Z grafu je zřejmé, že úbytek mikroorganismů z povrchu drůbeže je patrný v průběhu celé doby chladírenského skladování. Ovšem statistický významný rozdíl je pouze v 24 hodině skladování vzorku. Rozdíly se pohybují v rozmezí necelého jednoho řádu log CFU/g, s výjimkou hodnoty v posledním dnu skladování.

U vzorku nebyl po celou dobu chladírenského uložení prokázán statisticky významný nárůst stafylokoků obsažených na povrchu chlazené drůbeže. U kontroly byl rozdíl v nárůstu daného mikroorganismu první dva dny (0 – 48 hodin).

Tab. 10. Celkové počty stafylokoků vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,2% PS
0	3,0092	2,5484
24	4,1968	3,3798
48	4,6741	3,9150
72	5,4260	4,3282



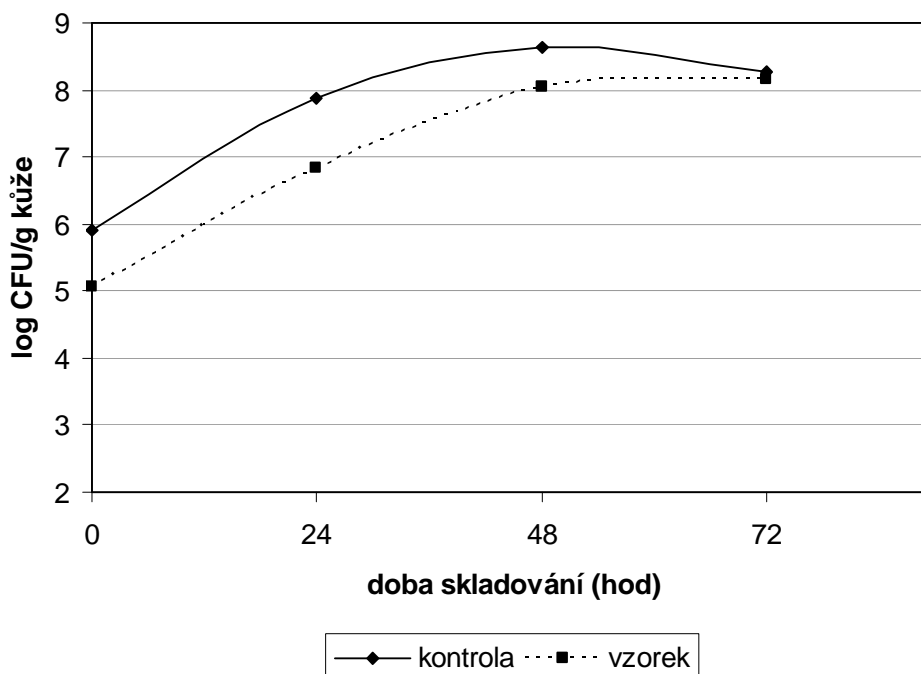
Obr. 15. Dynamika růstu stafylokoků v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného

Na obrázku (Obr. 16, Tab. 11) je vyjádřen průběh růstu kvasinek. Z grafu vyplývá, že účinek směsi na povrch drůbeže je znát. Nejvíce ihned po aplikaci (0 hodina) a následující dny dochází ke zmírnění účinnosti. Poslední den se ošetřený vzorek zcela přiblížil kontrole, která měla klesající tendenci. Podle statistické analýzy byl rozdíl mezi kontrolou a vzorkem ihned po aplikaci (0 hodina), poté během skladování již rozdíl nebyl shledán jako významný. Počty mikroorganismů byly redukovány okolo jednoho řádu log CFU/g.

Nárůst kvasinek byl podle statistické analýzy významný po celou dobu skladování jak u kontroly tak i u vzorku.

Tab. 11. Celkové počty kvasinek vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,2% PS
0	5,9095	5,0555
24	7,8751	6,8316
48	8,6424	8,0303
72	8,2620	8,1570



Obr. 16. Dynamika růstu kvasinek v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného

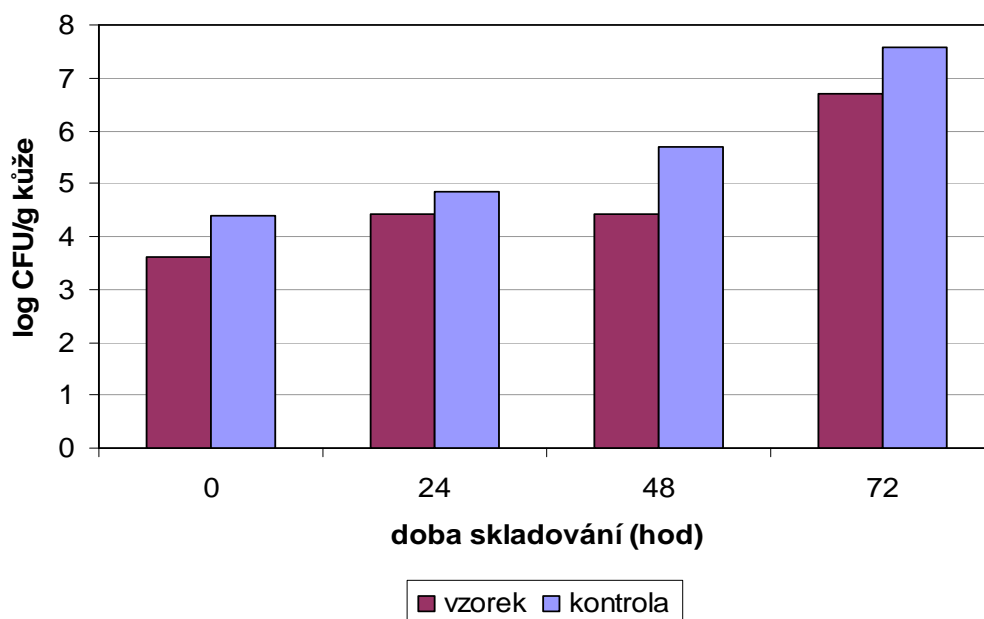
5.2.2 Vliv 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného metodou ponoru

Dekontaminační směs je složena z 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného a byla aplikována metodou ponoru. Obrázek (*Obr. 17, Tab. 12*) znázorňuje průběh růstu celkových počtů aerobních mezofilních mikroorganismů. Z grafu je zřejmé, že vzorek, který byl ošetřený dekontaminovanou směsí se výrazně liší od kontroly. Což dokazuje i statistická analýza, která vykazuje statisticky významný rozdíl mezi vzorkem a kontrolou po celou dobu chladírenského skladování. Úbytek mezofilních mikroorganismů byl okolo jednoho řádu log CFU/g.

Podle statistického vyhodnocení nárůst mikroorganismů u ošetřeného vzorku byl statisticky významný, kromě 48 hodiny, kdy počet narostlých mikrobů nedosahoval významnějšího množství. U kontroly byl nárůst mezofilů významný po celou dobu chladírenského uchování.

Tab. 12. Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,5% PS
0	4,3793	3,6228
24	4,8523	4,4189
48	5,7012	4,4145
72	7,5838	6,6834



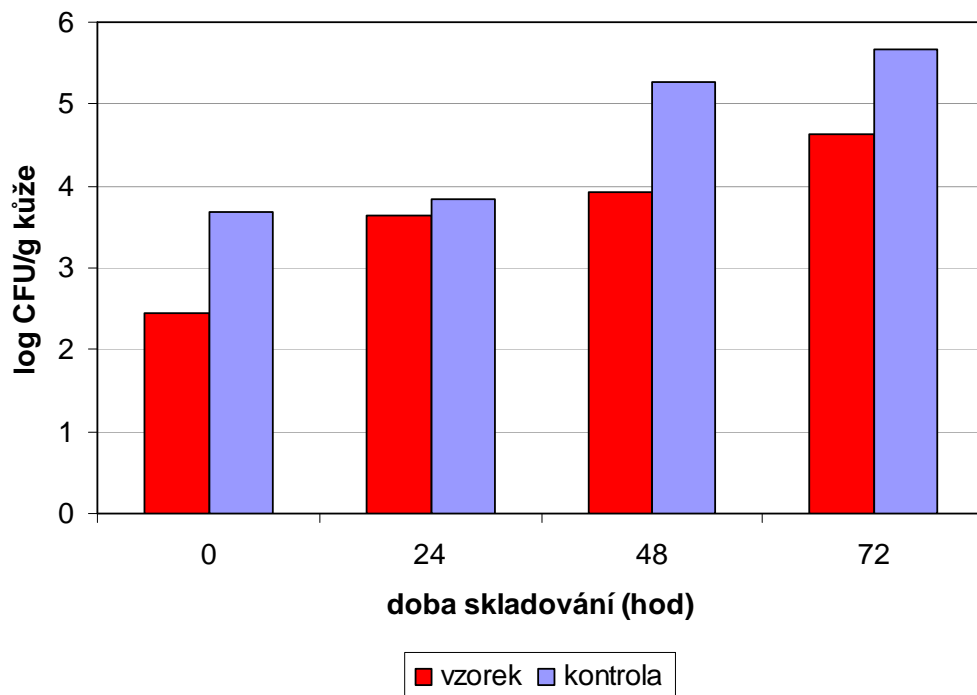
Obr. 17. Dynamika růstu aerobních mezofilních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného

Na obrázku (Obr. 18, Tab. 13) je vyjádřen průběh růstu koliformních bakterií na Endo agaru. Z grafu vyplývá, že směs, kterou byl ošetřen, vzorek má viditelné účinky na danou mikroflóru vyskytující se na chlazené drůbeži. V hodině 24 se tento účinek mírně zmenšil. Statistika vyhodnocuje významnou celou dobu chladírenského skladování, i 24 hodinu. Rozdíl po aplikaci směsi na vzorek vykazuje 1,2 řádu log CFU/g a tento rozdíl, vyjma 24 hodin, se drží po celou dobu skladování.

Nárůst mikroorganismů byl u vzorku statisticky významný jen v prvních den skladování. Kontrola vykazuje významný nárůst po celou dobu chladírenského skladování.

Tab. 13. Celkové počty koliformních mikroorganismů kultivovaných na Endo agaru vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,5% PS
0	4,3793	3,6228
24	4,8523	4,4189
48	5,7012	4,4145
72	7,5838	6,6834



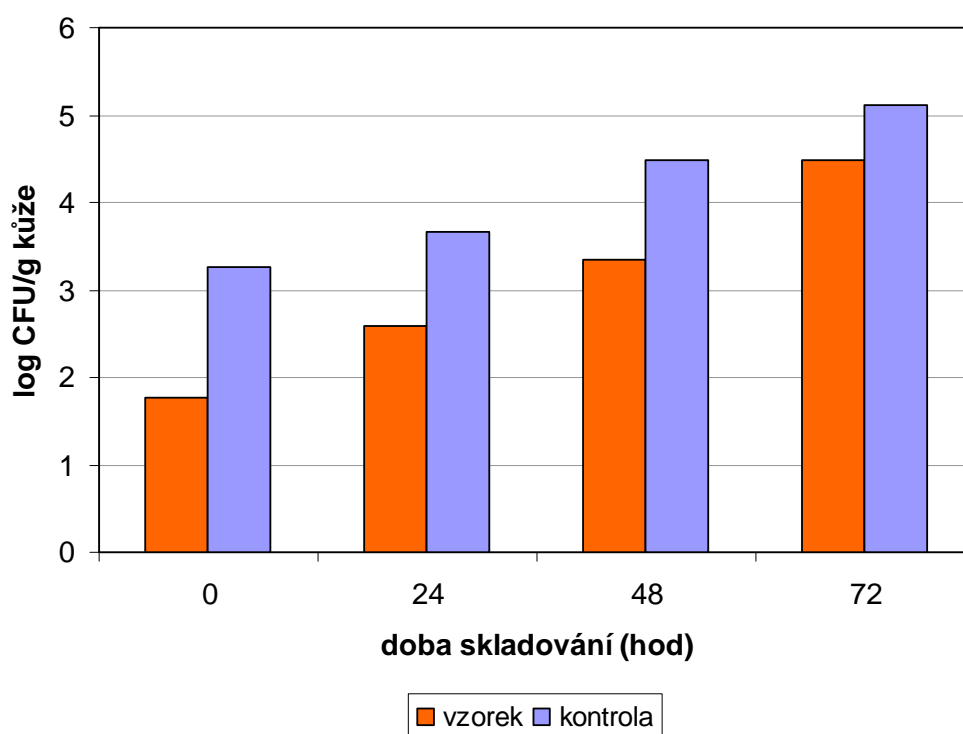
Obr. 18. Dynamika růstu koliformních mikroorganismů na Endově agaru v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného

Na obrázku (Obr. 19, Tab. 14) je znázorněn průběh růstu koliformních mikroorganismů na XLD agaru. Již z grafu je patrné, že účinek této směsi snížil mikrobiální zamořenost povrchu drůbeže. Počty mikroorganismů byly redukovány o 1,5 řádu log CFU/g, poté docházelo ke snižování. Zákrok byl vyhodnocen jako statisticky významný v průběhu celého chladírenského skladování.

Nárůst koliformních mikroorganismů u ošetřeného vzorku, po celou dobu skladování, nebyl podle analýzy významný. U kontroly byl rozdíl v nárůstu koliformních mikroorganismů celou dobu uchování.

Tab. 14. Celkové počty koliformních mikroorganismů kultivovaných na XLD agaru vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,5% PS
0	3,2676	1,7595
24	3,6672	2,5947
48	4,4875	3,3565
72	5,1211	4,4897



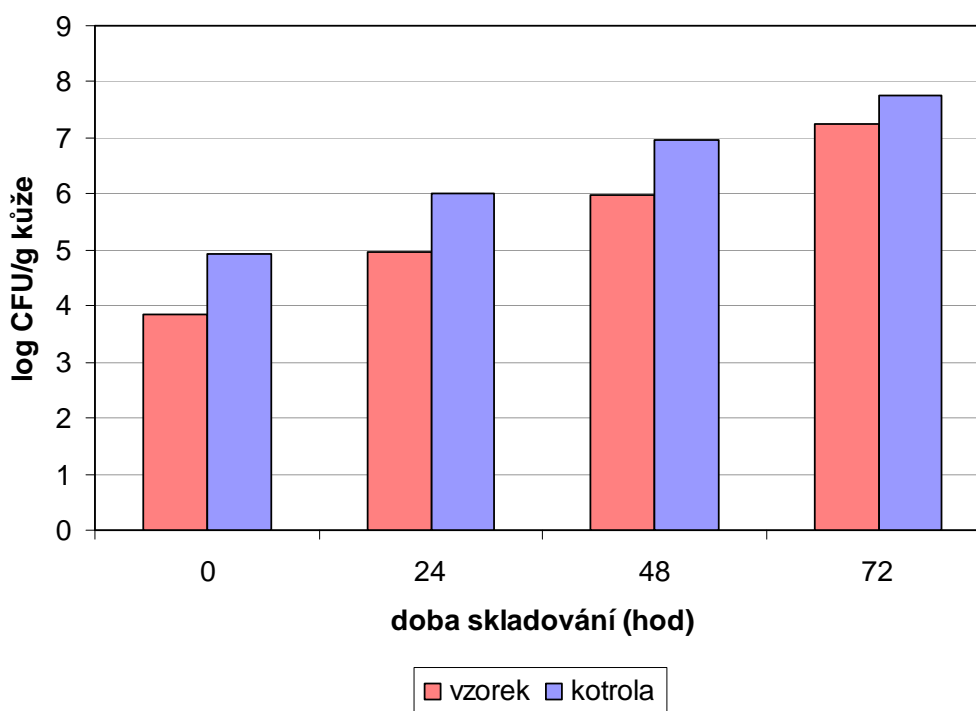
Obr. 19. Dynamika růstu koliformních mikroorganismů na XLD agaru v průběhu skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného

Obrázek (Obr. 20, Tab. 15) uvádí vliv přidavku dekontaminační směsi na růstu psychrotrofních bakterií. Z grafu je patrné, že po aplikaci směsi nastal úbytek dané mikroflóry. Podle statistické analýzy byl účinek, po celou dobu chladírenského uchování, významný. Úbytek mikroorganismů mezi ošetřeným a kontrolním vzorkem byl okolo 1 řádu log CFU/g, vyjma posledního dne skladování, kdy hodnota byla nižší.

Nárůst psychrotrofních mikroorganismů na době skladování byl statisticky významný po celou dobu skladování jak u kontroly, tak i u vzorku.

Tab. 15. Celkové počty psychrotrofních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,5% PS
0	4,9397	3,8386
24	6,0126	4,9591
48	6,9507	5,9648
72	7,7698	7,2562



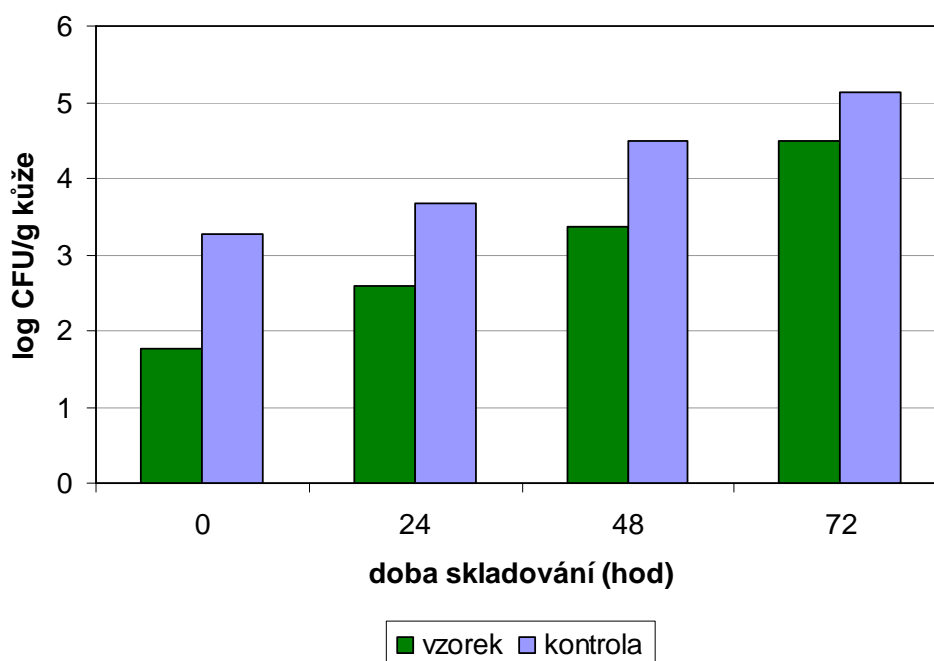
Obr. 20. Dynamika růstu psychrotrofních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného

Obrázek (Obr. 21, Tab. 16) uvádí vliv přídavku dekontaminační směsi na růst stafykoků. Tento účinek je znázorněn na obrázku 11, kde rozdíl mezi ošetřeným vzorkem a kontrolou je znatelný po celou dobu chladírenského skladování. Počty mikroorganismů byly redukovány o 1 řád log CFU/g, s výjimkou doby skladování v čase 24 hodin, kde hodnota řádu je o něco nižší.

Nárůst stafylokoků na ošetřeném vzorku během celého chladírenského skladování nebyl podle statistické analýzy významný.

Tab. 16. Celkové počty stafylokoků vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,5% PS
0	3,7817	2,2366
24	3,9897	3,3406
48	4,6500	3,4357
72	4,8766	3,8427



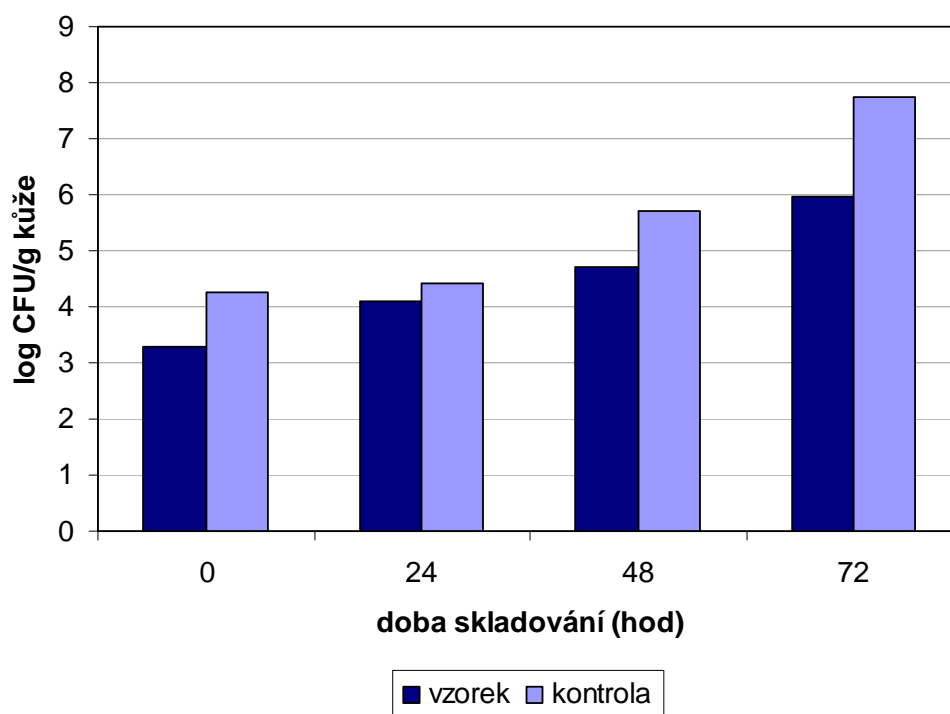
Obr. 21. Dynamika růstu stafylokoků v průběhu skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného

Obrázek (Obr. 22, Tab. 17) uvádí vliv přidavku dekontaminační směsi na růst kvasinek. Z grafu je patrné, že po aplikaci směsi došlo k úbytku mikroorganismů. Účinek se mírně snížil v 24. hodině. Statistická analýza vyhodnotila účinek směsi jako významný. Úbytek mikroorganismů se pohybuje okolo 1 log CFU/g, vyjma 24 hodiny, kde hodnota byla nižší.

Nárůst mikroorganismů během chladírenského skladování byl u ošetřeného vzorku významný pouze první a poslední den. U kontroly byl nárůst kvasinek významný po celou dobu uchování.

Tab. 17. Celkové počty kvasinek vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,5% PS
0	4,2559	3,2909
24	4,4323	4,1037
48	5,7103	4,7101
72	7,7428	5,9737



Obr. 22. Dynamika růstu kvasinek v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného

5.2.3 Vliv 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného metodou postřiku

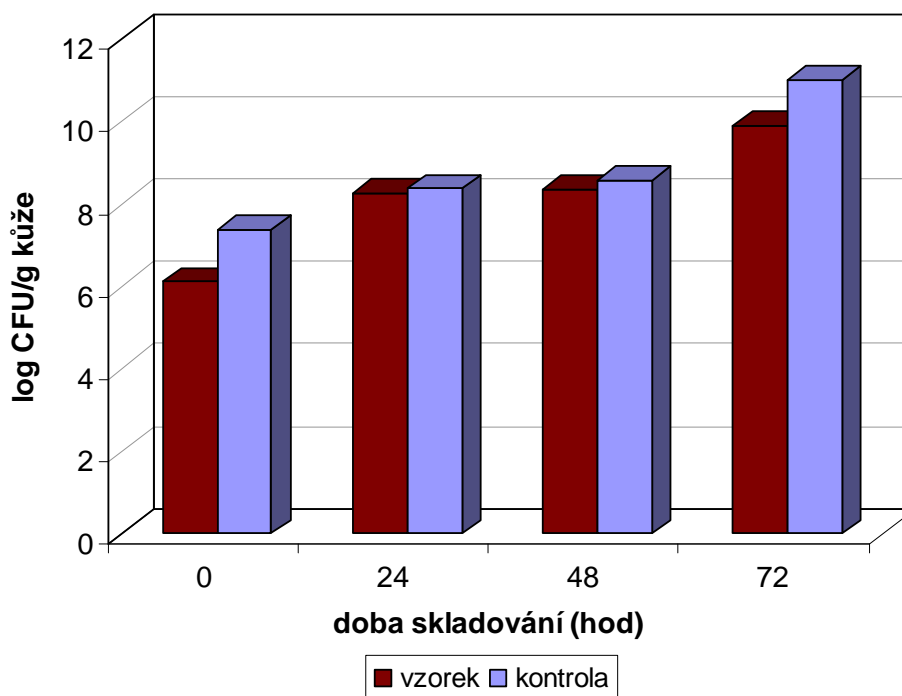
Složení směsi je stejné jako u předešlé analýzy, pouze s tím rozdílem, že byla aplikována metodou postřiku nikoliv ponoru. Obrázek (Obr. 23, Tab. 18) znázorňuje průběh růstu celkových počtů aerobních mezofilních mikroorganismů po aplikaci 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného postřikem. Bylo aplikováno 5 ± 1 ml směsi. Z grafu je zřejmé, že daná směs byla účinná, i když po určité době skladování počty mikroorganismů ošetře-

ného vzorku dosahují stejných hodnot jako kontrolního vzorku. Podle statistické analýzy nastává rozdíl po delší době skladování (24, 48 a 72 hodin).

V prvních dvou dnech (0, 24 hodin) u vzorku nedocházelo k výraznému pomnožení mikrobu na kůži chlazené drůbeže. Kontrola vykazovala významný nárůst celou dobu chladírenského skladování.

Tab. 18. Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,5% PS
0	7,3770	6,1151
24	8,3647	8,2517
48	8,5824	8,3422
72	11,0098	9,8898

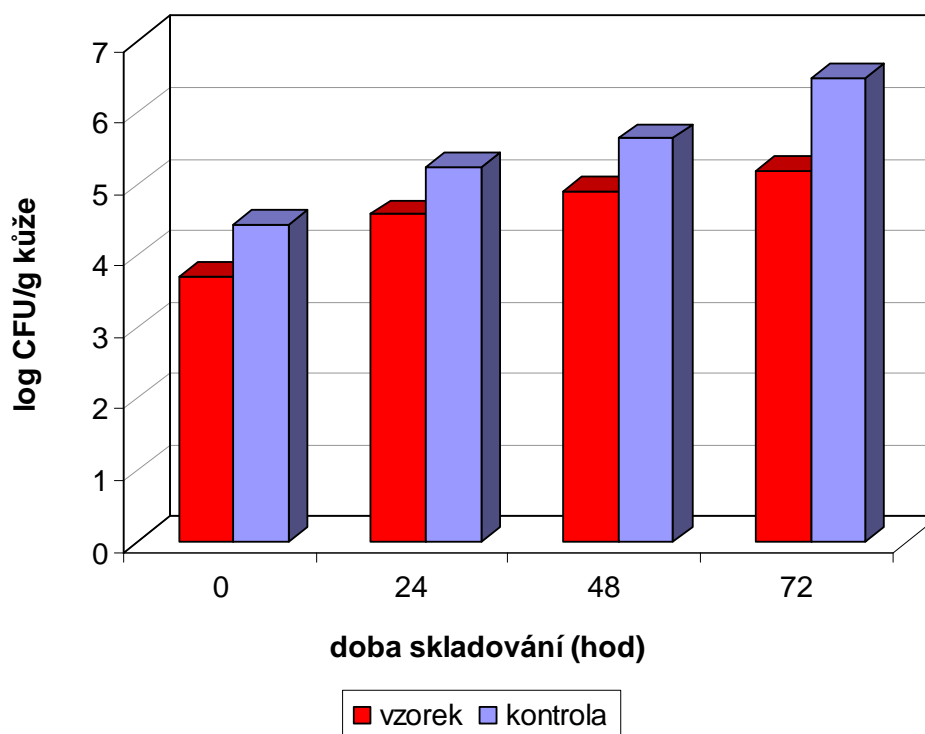


Obr. 23. Dynamika růstu aerobních mezofilních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného postřikem

Na obrázku (Obr. 24, Tab. 19) je znázorněn průběh růstu koliformních mikroorganismů na Endově agaru. Podle grafu je patrné, že úbytek koliformních mikroorganismů je oproti kontrole výrazný. Statistická analýza vyhodnotila významný účinek směsi jen v prvním dnu chladírenského skladování. V dalších následujících dnech tak velký rozdíl nenastal. Úbytek mikroorganismů se pohyboval v prvních třech dnech v hodnotách řádu 0,7 log CFU/g.

Tab. 19. Celkové počty koliformních mikroorganismů kultivovaných na Endo agaru vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,5% PS
0	4,4342	3,7041
24	5,2386	4,5723
48	5,6414	4,9012
72	6,4853	5,1876



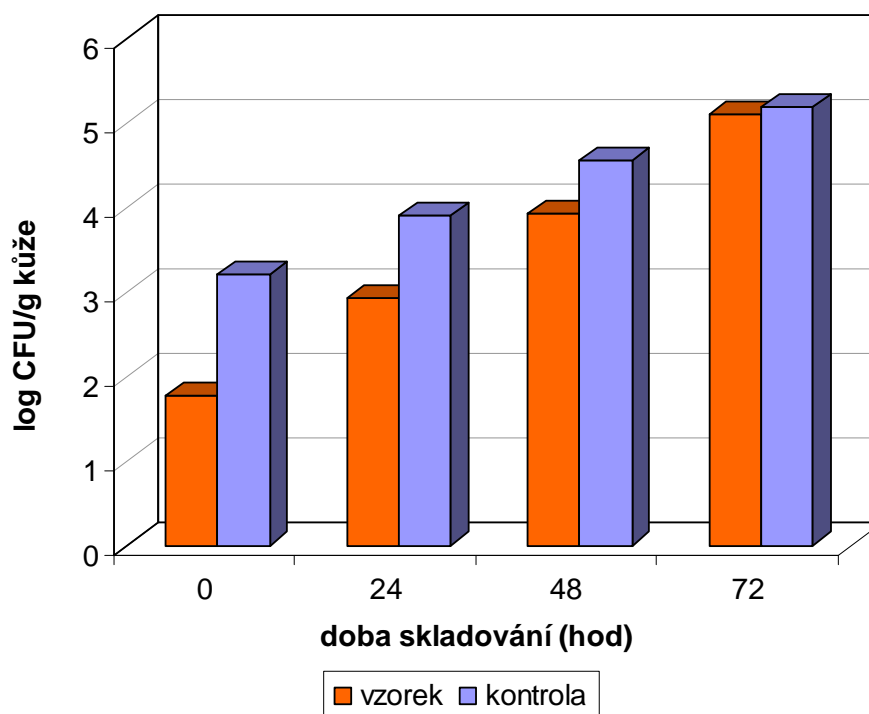
Obr. 24. Dynamika růstu koliformních mikroorganismů na Endově agaru v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného postřikem

Na obrázku (*Obr. 25, Tab. 20*) je znázorněn průběh růstu koliformních mikroorganismů na XLD agaru. Z grafu vyplývá, že směs, která byla aplikována na povrch chlazené drůbeže byla účinná. Její účinek se postupem skladování snižoval. Podle statistického vyhodnocení byl po celou dobu chladírenského skladování účinek významný, což je patrné i z grafu. V prvních dvou dnech skladování počty mikroorganismů byly redukovány o 1 řád log CFU/g, poté se pomalu snižovaly.

Růst mikroorganismů u ošetřeného vzorku byl na době skladování statisticky významný. Kontrolní vzorek také vykazoval rozdíly v průběhu celého chladírenského skladování.

Tab. 20. Celkové počty koliformních mikroorganismů na XLD agaru vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,5% PS
0	3,2009	1,7747
24	3,9050	2,9260
48	4,5515	3,9288
72	5,1826	5,0919

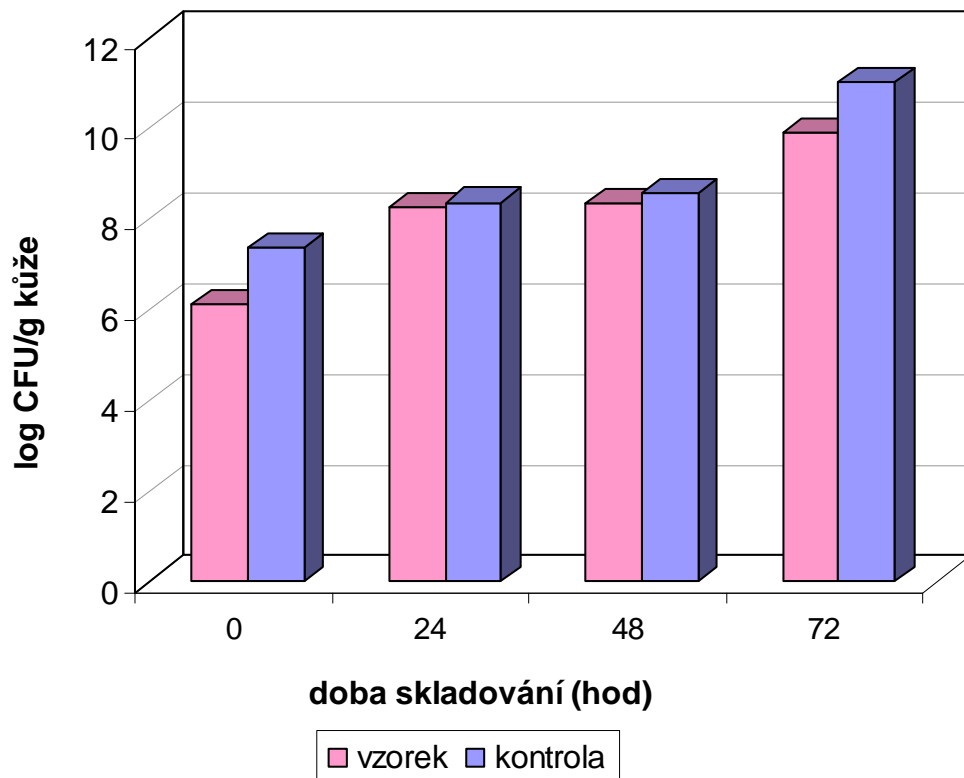


Obr. 25. Dynamika růstu koliformních mikroorganismů na XLD agaru v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného postříkem

Obrázek (Obr. 26, Tab. 21) znázorňuje průběh růstu psychrotrofních mikroorganismů. Z grafu je zřejmé, že aplikované dekontaminanty na povrch drůbeže, snižují počet výskytu psychrotrofních mikroorganismů po celou dobu chladírenského skladování. Uprostřed skladování dochází ke snížení účinků, což ovšem nemělo vliv na statistické vyhodnocení, které vyhodnotilo statisticky významný účinek po celou dobu skladování. Největší úbytek mikroorganismů byl ihned po aplikaci a v 72. hodině skladování.

Tab. 21. Celkové počty psychrotrofních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,5% PS
0	7,3770	6,1151
24	8,3647	8,2517
48	8,5824	8,3422
72	11,0098	9,8898

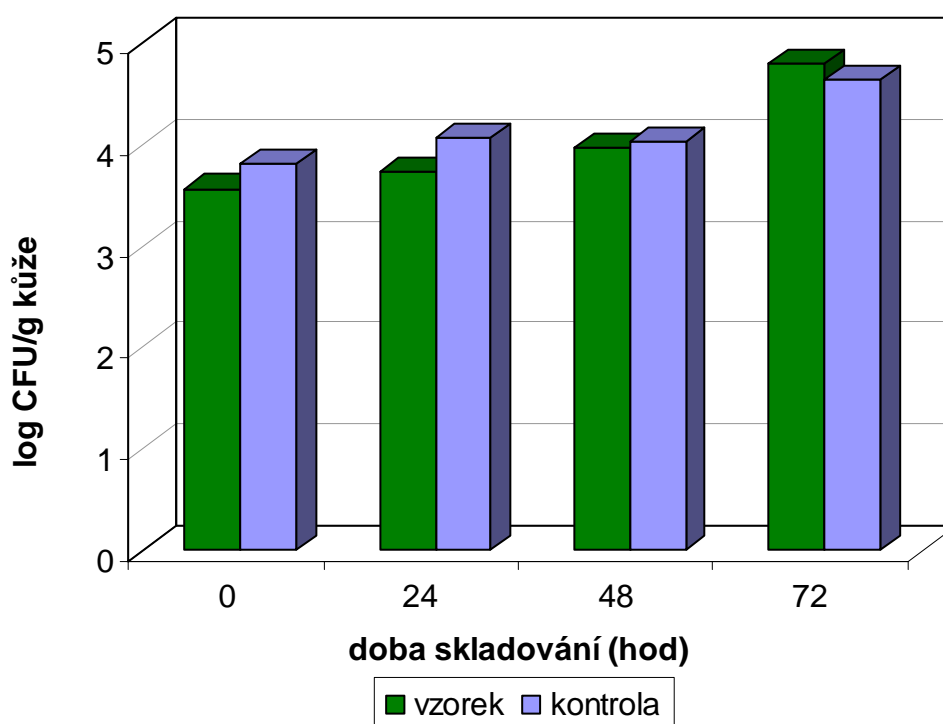


Obr. 26. Dynamika růstu psychrotrofních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného postřikem

Obrázek (Obr. 27, Tab. 22) znázorňuje průběh růstu stafylokoků po aplikaci dekontaminční směsi. Po aplikaci směsi se počet stafylokoků na drůbeži snížil a poté během dalších dnů skladování docházelo k jejich navýšení. V posledním dnu počet mikroorganismů dokonce přerostl kontrolu. Statisticky významný rozdíl byl pouze uprostřed skladování v hodinách 24 a 48. Počty mikroorganismů byly redukovány pouze o půl řádu log CFU/g. Nárůst mikroorganismů byl statisticky významný druhý až čtvrtý den (24, 48 a 72 hodin) chladírenského skladování.

Tab. 22. Celkové počty stafylokoků vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,5% PS
0	3,8188	3,5671
24	4,0692	3,7341
48	4,0376	3,9740
72	4,6476	4,8008



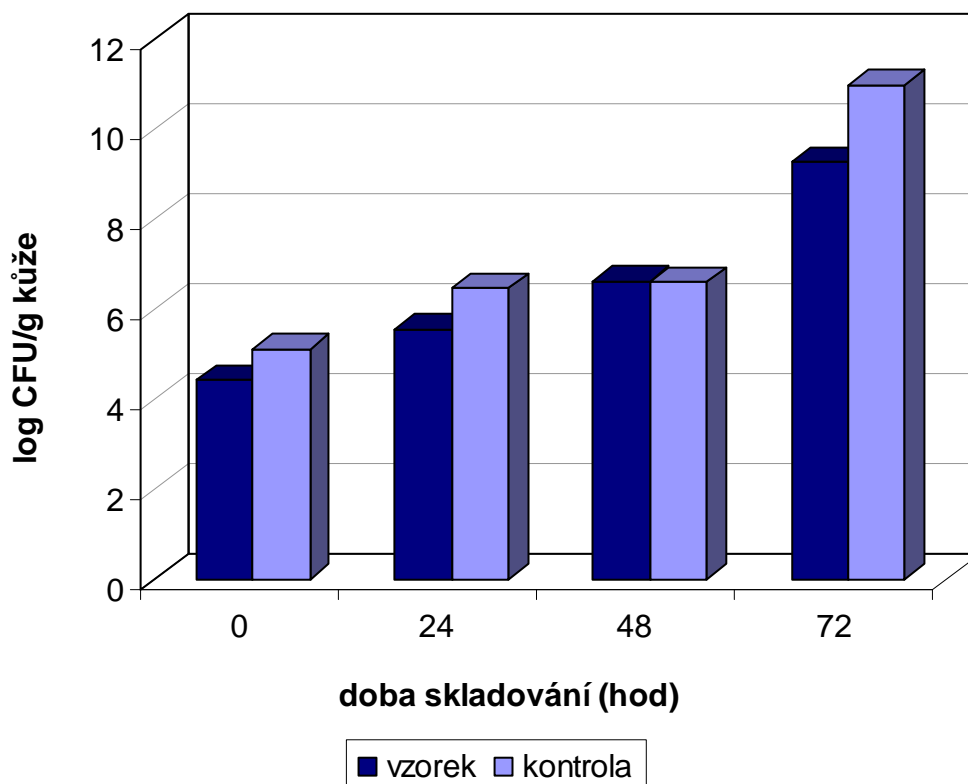
Obr. 27. Dynamika růstu stafylokoků v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného postříkem

Na obrázku (Obr. 28, Tab. 23) je znázorněn průběh růstu kvasinek nacházející se na chlazené drůbeži. Graf vykazuje účinnost této směsi, po ošetření vzorku nastal úbytek kvasinek na kůži oproti kontrole. Podle statistického vyhodnocení je účinek statisticky významný pouze ihned po aplikaci dekontaminační směsi (0 hodin), kde rozdíl byl 0,7 řádu log CFU/g a poté již nebyl prokázán.

U ošetřeného vzorku došlo k významnému porostu mikrobů po celou dobu skladování.

Tab. 23. Celkové počty kvasinek vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Doba skladování (hod)	log CFU/g kůže	
	kontrola	2% LA + 0,5% PS
0	5,1139	4,4082
24	6,4771	5,5507
48	6,5861	6,6218
72	10,9824	9,2793



Obr. 28. Dynamika růstu kvasinek v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného postříkem

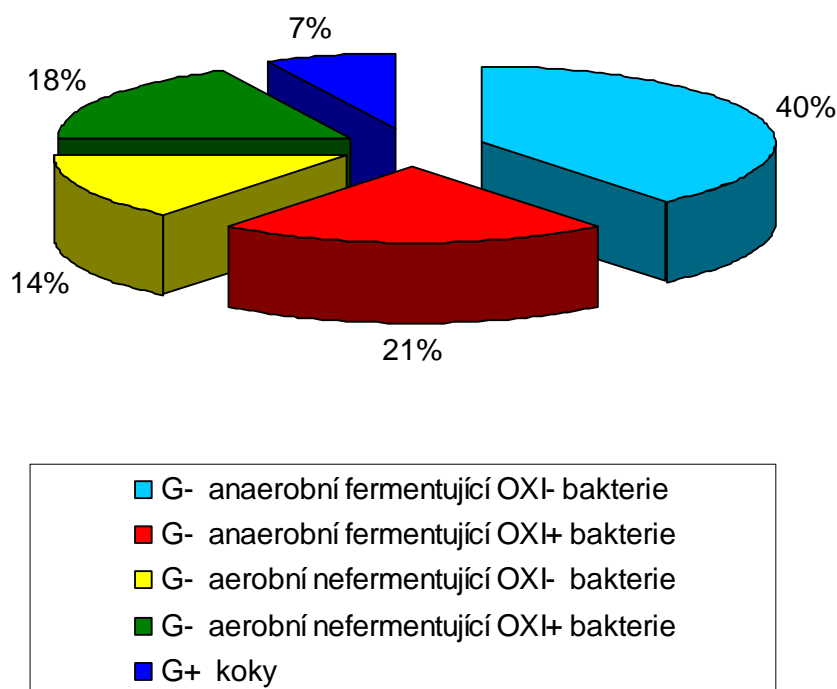
U této metody byla sledována i skupina anaerobních mikroorganismů. První den po ošetření se rozdíl v počtech mikroorganismů pohybují v rozmezí půl až jednoho řádu log CFU/g. V dalším průběhu skladování se tento rozdíl snižuje a ošetřený vzorek se vyrovnal kontrole.

Zjišťovala se i přítomnost mléčných bakterií na povrchu mikroflóry chlazených kuřat. Poslední den skladování množství bakterií nepřerostlo hranici 5 řádu log CFU/g.

5.3 Bakteriální identifikace

Identifikace byla provedena u bakteriálních izolátů získaných z kůže chlazené drůbeže. Získané bakteriální kmeny byly zařazeny do taxonomických skupin a eventuálně rodově či druhově zařazeny. U všech 28 izolovaných kmenů byly provedeny zvolené biochemické testy. Výsledky těchto testů jsou vypracovány do tabulky, která je uvedena v příloze P II

Graf (Obr. 29) znázorňuje procentuální zastoupení izolovaných kmenů, které jsou rozděleny na základě barvitelnosti buněčné stěny podle Grama, dále fermentace glukosy z výsledků OF testu a výsledku OXI testu.



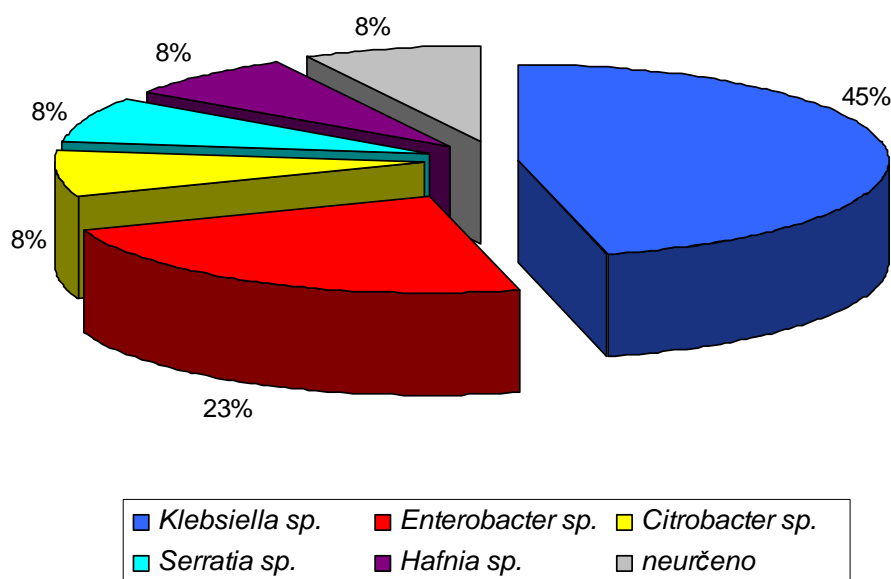
Obr. 29. Rozdělení izolovaných kmenů na gramnegativní a grampozitivní s podrozdělením na fermentující, nefermentující, oxidasa negativní, oxidasa pozitivní bakterie

Biochemické testy byly u vybraných 13 izolátů patřící do čeledi *Enterobacteriaceae* doplněny ENTEROtestem. Výsledky tohoto testu byly vyhodnoceny identifikačním programem TNW-Lite [49] a jsou shrnuty ve formě tabulky (Tab. 24) a na obrázku (Obr. 30) je graficky znázorněno jejich procentuální zastoupení. V tabulce je uvedeno, kromě názvu identifi-

kovaného kmene, také procento identifikace a T-index. Procento identifikace (% id) udává pravděpodobnost, s jakou daný výsledek odpovídá danému taxonu (nebo pravděpodobnost výskytu daného výsledku pro daný taxon, vztaženo k pravděpodobnosti výskytu daného výsledku pro všechny ostatní taxony). T-index (Tin) je hodnota, udávající, do jaké míry daný výsledek odpovídá nejtypičtějším výsledku pro daný taxon. Zcela typickému výsledku odpovídá hodnota Tin rovna jedné. Tin může ležet v intervalu 0 do 1.

Tab. 24. Výsledky identifikace pomocí soupravy EN-TEROtestu16

číslo kmene	identifikace	% id.	Tin
6	neidentifikováno	-	-
9	<i>Klebsiella oxytoca</i>	80,52	1,000
11	<i>Enterobacter aerogenes</i>	83,62	0,663
12	<i>Enterobacter sp.</i>	83,62	0,674
13	<i>Enterobacter sp.</i>	83,62	0,674
14	<i>Klebsiella oxytoca</i>	92,78	0,810
15	<i>Klebsiella sp.</i>	70,53	0,49
16	<i>Citrobacter freundii</i>	92,97	0,969
17	<i>Klebsiella oxytoca</i>	92,78	0,810
18	<i>Serratia odorifera bv.1</i>	99,55	0,745
19	<i>Klebsiella sp.</i>	61,36	0,357
20	<i>Klebsiella oxytoca</i>	97,60	0,841
25	<i>Hafnia alvei</i>	96,26	0,983



Obr. 30. Procentuální zastoupení jednotlivých identifikovaných bakteriálních kmenů

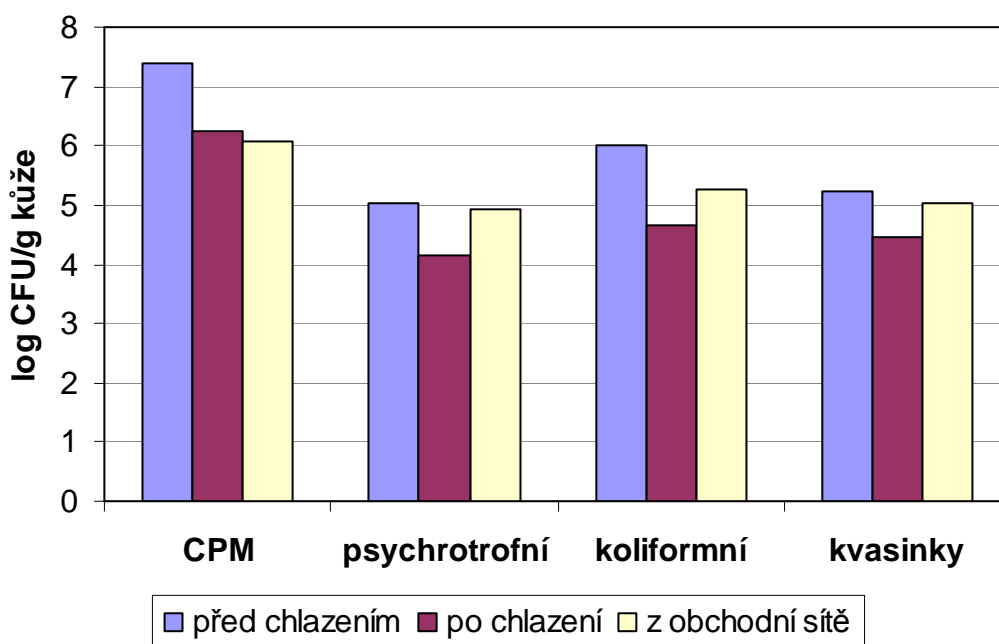
5.4 Srovnání drůbeže zakoupené v obchodní síti a přímo od výrobce firmy Raciola s.r.o.

Byla porovnáována mikrobiální četnost na třech typech vzorků kuřat. První vzorek byl odebrán z výrobní linky před chlazením, druhý na výstupu výrobní linky po chlazení a třetí byl zakoupen v obchodní síti - podniková prodejna firmy Raciola s.r.o.

Tabulka (Tab. 25) udává počty sledovaných skupin mikroorganismů první den skladování. Na obrázku (Obr. 31) je znázorněn rozdíl v počtu mikroorganismů před chlazením, po chlazení a z obchodní sítě u aerobních mezofilních, psychrotrofních, koliformních bakterií a kvasinek.

Tab. 25. Sledované skupiny mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže první den skladování

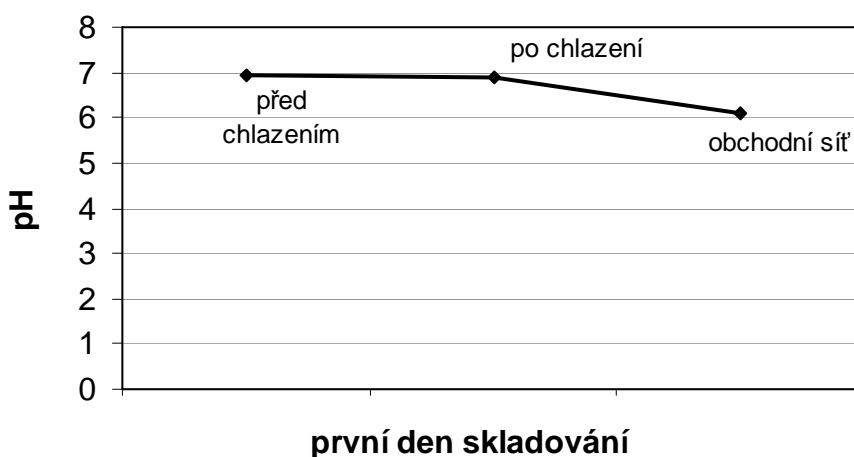
Mikroorganismy	log CFU/g kůže ± δ		
	před chlazením	po chlazení	z obchodní sítě
CPM	7,38 ± 0,35	6,23 ± 0,16	6,09 ± 0,23
psychrotrofní	5,03 ± 0,12	4,16 ± 0,89	4,92 ± 0,17
koliformní	5,99 ± 0,18	4,66 ± 0,25	5,27 ± 0,19
kvasinky	5,22 ± 0,11	4,46 ± 0,67	5,05 ± 0,21



Obr. 31. Porovnání počtu mikroorganismů na kuřecí kůži před chlazením a po chlazení z výrobní linky a z obchodní sítě

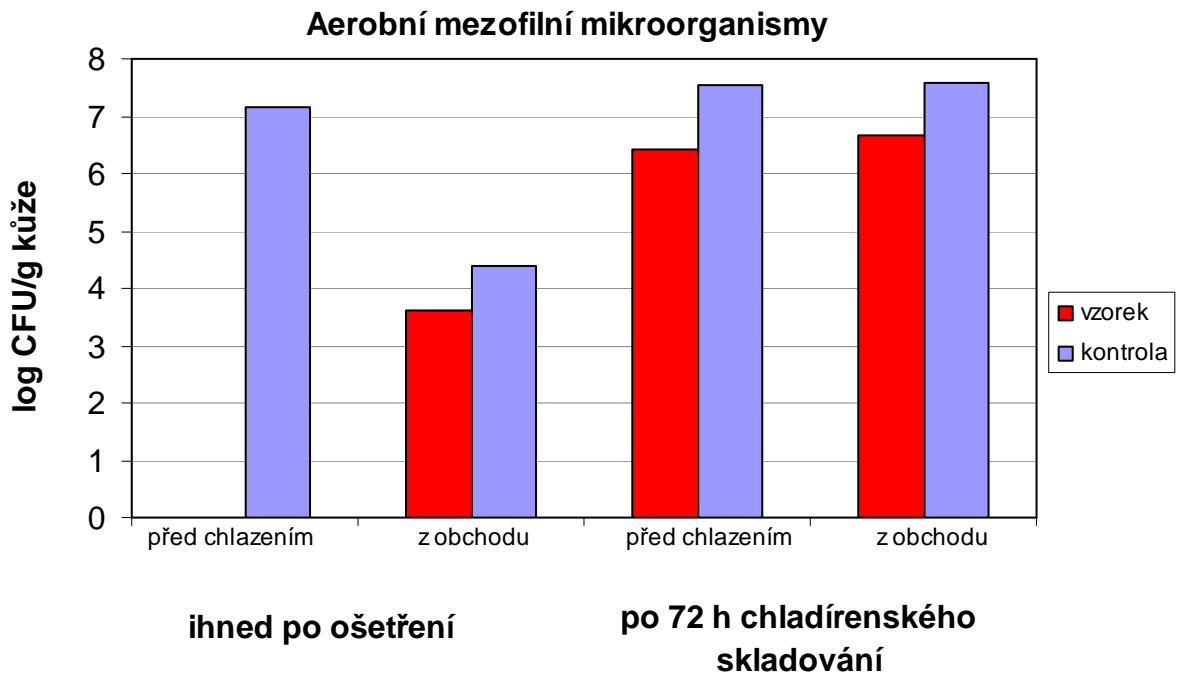
Z grafu je patrné, že nejčetnější mikroflóra byla u drůbeže před chlazením. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u celkových počtů mezofilních mikroorganismů. Chlazení je zákrok, který výrazně snižuje počty všech sledovaných skupin mikroorganismů. Vzorky odebrané z obchodní sítě vykazují hodnoty vyšší než vzorky, které byly odebrány také po chlazení přímo z výrobní linky. U mezofilních mikroorganismů zůstal počet téměř shodný. Rozdíl mezi vzorkem po chlazení z výrobní linky a vzorkem z obchodu se pohyboval mezi 0,6 a 0,8 řády log CFU/g u téměř všech sledovaných skupin, vyjma celkových počtů aerobních mikroorganismů.

Graf (Obr. 32) ukazuje pH jednotlivých vzorků drůbeže před chlazením, po chlazení a vzorků z obchodní sítě.



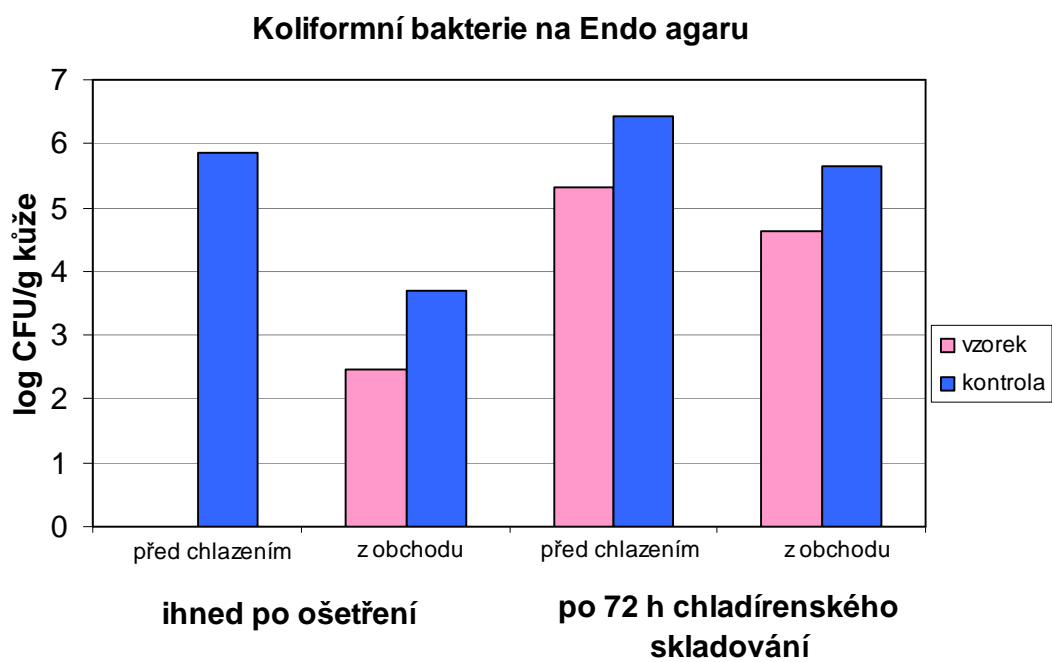
Obr. 32. Průměrné hodnoty pH kuřecí kůže před chlazením, po chlazení a z obchodní sítě

Byl zkoumán rozdíl v počtu aerobních mezofilních mikroorganismů po aplikaci dekontamináční směsi 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného na vzorek z výrobní linky odebraný před chlazením a na vzorek zakoupený v obchodní síti (Obr. 33). Po aplikaci nebyl na vzorku z výrobní linky zaznamenán žádný nárůst mikroorganismů. Po 72 hodinách skladování dosáhl počet mikroorganismů hodnot přes 6 jednotek řádu log CFU/g. Vzorek zakoupený v obchodní síti ihned po aplikaci směsi vykazoval 3,6 řádu log CFU/g. Během chladírenského skladování se tato hodnota zvýšila o 3 řády log CFU/g a odpovídala druhému vzorku, který byl odebrán z výrobní linky.



Obr. 33. Porovnání počtu mezofilních mikroorganismů ihned po ošetření 2% LA a 0,5% PS a po 72 hodině chladírenského skladování na PCA agaru

Graf (Obr. 34) znázorňuje počet koliformních bakterií na vzorku z výrobní linky a z obchodní sítě po aplikaci směsi. Na vzorku z výrobní linky nebyl po aplikaci směsi zaznamenán nárůst dané mikroflóry. Po čtyřech dnech skladování došlo k nárůstu mikroorganismů na 5,5 řádu log CFU/g. U vzorku z obchodní sítě byl zaznamenán rozdíl řádu mezi prvním a posledním dnem skladování okolo 2 jednotek log CFU/g.



Obr. 34. Porovnání počtu koliformních bakterií ihned po ošetření 2% LA a 0,5% PS a po 72 hodině chladírenského skladování na Endo agaru

6 DISKUZE

6.1 Vývoj hodnoty pH na době skladování

Hodnota pH je považována za významný indikátor průběhu postmortálních změn masa a je tedy i ukazatelem aktuálního biochemického stavu kuřecího masa se vztahem k jeho hygienickým, sensorickým a technologickým vlastnostem. Hodnoty pH byly měřeny ve 24 hodinových intervalech.

Naměřené hodnoty pH neošetřeného vzorku se pohybovaly během celého chladírenského skladování v rozmezí 5,95 až 7,31. Vlastní vývoj pH u neošetřených vzorků byl charakteristický mírným vzestupem hodnot.

Po aplikaci roztoku dekontaminační směsi došlo ke snížení hodnoty pH. Tento jev způsobila kyselina mléčná, sorban draselný nemá vliv na hodnoty pH na povrchu drůbeže [13; 25]. V průběhu chladírenského skladování docházelo k postupnému zvyšování pH k hodnotám blízkým kontrolním vzorků. Opětovný růst pH byl způsoben difúzí kyseliny mléčné do hlubších vrstev masa a také jejím rozkladem [32].

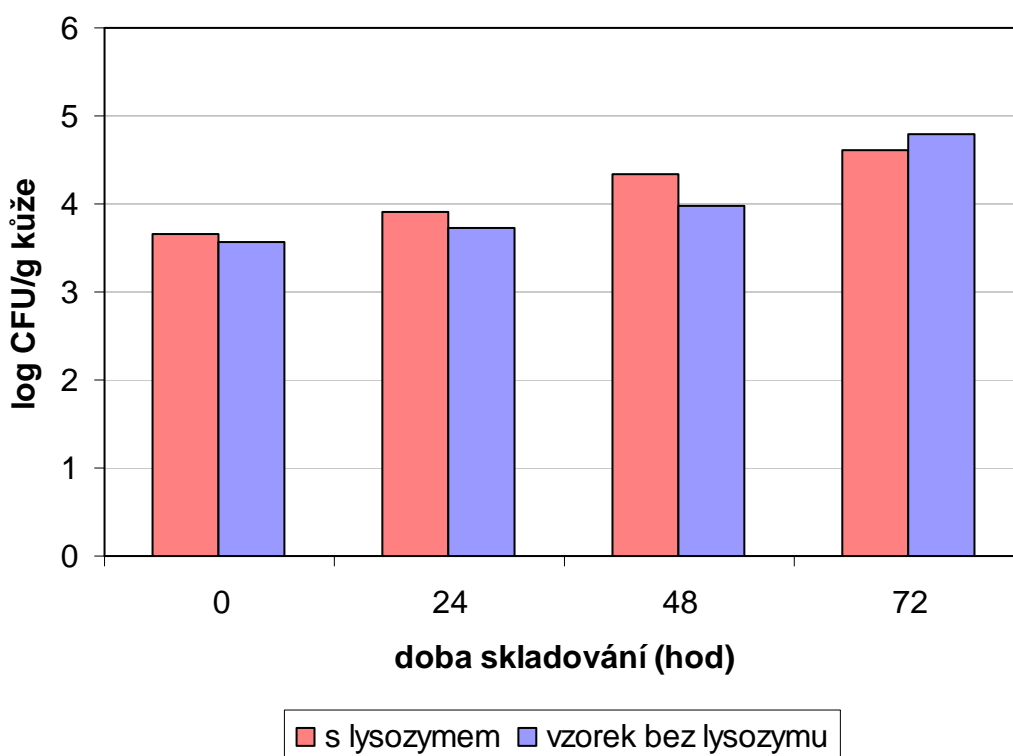
U vzorků, které byly ošetřeny ponorem do roztoku dekontaminační směsi, se pH v hodině 0 snížilo na průměrnou hodnotu 4,49. Rozdíl mezi touto hodnotou a průměrnou hodnotou neošetřeného vzorku byl 1,61 jednotky. Vzorek ošetřený postřikem měl pH vyšší, a to 5,75 a rozdíl oproti kontrole byl pouhých 0,34. Metoda ponoru měla tedy větší vliv na snížení hodnoty pH než metoda postřiku.

Během skladování došlo k vyrovnání pH u obou metod na průměrnou hodnotu 6,72. Tato hodnota se v průběhu čtyř skladovacích dnů velmi přiblížila k pH neošetřeného vzorku, který měl poslední den skladování hodnotu 6,89.

6.2 Srovnání účinku směsi s lysozymem a bez lysozymu

Součástí práce bylo zjistit, zda enzym lysozym v kombinaci s organickými kyselinami má vliv na mikroflóru chlazené drůbeže. Lysozym má baktericidní účinky a je schopen štěpit polysacharidové vazby v buněčné stěně grampozitivních bakterií. Po statistickém vyhodnocení pomocí regresních křivek bylo na 5% hladině významnosti zjištěno, že množství, které bylo aplikováno na vzorek, nemá žádný vliv na mikroorganismy nacházející se na chlazené drůbeži. Jeho neúčinnost mohla být způsobena nízkou aplikační dávkou, která byla zvolena

dle literatury [20] a také tím, že grampozitivní bakterie se na drůbeži vyskytují ve velmi malém počtu (*Obr. 29*) a tudíž nedošlo k ovlivnění mikroflóry na povrchu kůže. Na obrázku (*Obr. 35*) je znázorněna dynamika růstu stafylokoků v závislosti na době skladování po aplikaci lysozymu. Z grafu je zřejmé, že přítomnost lysozymu nemá žádný vliv na jejich růst. Vzorek ošetřený lysozymem by měl vykazovat menší počty CFU/g, než vzorek bez jeho přídavku. Téměř po celou dobu skladování je tomu přesně naopak, ale rozdíly nebyly statisticky významné. Dá se tedy usoudit, že aplikace lysozymu v dávce 100 mg/l na kuřecí kůži nemá žádný inhibiční efekt na přítomnou grampozitivní mikroflóru.



Obr. 35. Dynamika růstu stafylokoků v průběhu chladírenského skladování po aplikaci lysozymu

6.3 Zhodnocení a srovnání účinků dekontaminačních směsí

6.3.1 Zhodnocení účinku 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného metodou ponoru

Použití dekontaminační směsi 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného na kůži chlazené drůbeže se ukázal jako účinný zákrok. Došlo ke snížení mikrobiální četnosti

ihned po ošetření (0 hodin) a taky v průběhu skladování byl růst mikroorganismů omezen. V průběhu skladování postupně docházelo k nárůstu mikrobů na vzorku, ovšem tento nárůst byl oproti kontrole zpomalen. Přestože úbytek koliformních mikroorganismů na XLD agaru a stafylokoků je dle grafu (*Obr.13 a 15*) značný, nebyl vyhodnocen jako statisticky významný zřejmě z důvodu velké směrodatné odchylky. Největší rozdíl mezi kontrolou a vzorkem byl u koliformních mikroorganismů na Endově agaru, kde účinek směsi dokonale zpomalil růst mikroorganismů [33].

6.3.2 Zhodnocení účinku 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného metodou ponoru

Po vyhodnocení daného zákroku je zjevné, že směs skládající se z 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného je významně účinná na všechny sledované skupiny mikroorganismů. Aplikace kyseliny mléčné na povrch chlazené drůbeže snižuje mikrobiální četnosti a zpožďuje okamžik nástupu fáze logaritmického nárůstu mikroorganismů. Příčinou je snížení pH povrchové tkáně a tím ovlivnění růstu mikroorganismů [33].

Počet mikroorganismů se významně snížil ihned po aplikaci dekontaminantů (0 hodin) a tento trend se držel po celou dobu chladírenského zpracování. V průběhu skladování docházelo k mírnému zvýšení mikrobiálních počtů, ovšem v porovnání s kontrolou to bylo zanedbatelné. Koncentrace směsi se ukázala jako vyhovující pro ošetření povrchu chlazené drůbeže a její účinek byl statisticky významný u všech sledovaných skupin. Malou odchylku tvořili kvasinky, u kterých byl vliv směsi poslední den skladování vyhodnocen jako neúčinný. Je důležité, že mezi kontrolním a dekontaminovaným vzorkem je významný rozdíl v počtu psychrotrofních mikrobů na konci skladování, což je důležité vzhledem k teplotě skladování masa a psychrotrofním vlastnostem bakterií způsobujících kažení [34].

6.3.3 Zhodnocení účinku 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného metodou postřiku

Ukázalo se, že daná směs 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného aplikovaná postřikem je účinná na mikroflóru nacházející se na kůži chlazené drůbeže. Dochází ke snížení mikrobiální zamořenosti po ošetření a také v průběhu skladování u většiny skupin. Během chladírenského skladování dochází k nárůstu mikroorganismů, ovšem tento nárůst je oproti kontrole zpomalen. Nejmenší účinnost měla tato směs u kvasinek, což nejspíše bylo

způsobené metodou postřiku, kdy vzorek nebyl dostatečně ošetřen. Pro kvasinky je optimální kyselé prostředí (pH 4,8 až 5,5).

V ostatních skupinách byl účinek směsi pozorovatelný, i když nebyl třeba po celou dobu skladování statisticky významný. Největší účinek měla směs na psychrotrofních mikroorganismy, koliformní bakterie na XLD agaru a také na aerobní mezofilní mikroorganismy, kde došlo k dobrému zpomalení jejich růstu.

U metody postřiku bylo také sledováno, zda se na povrchu chlazené drůbeže vyskytují anaerobní mikroorganismy, jak uvádí literatura [12]. Jejich výskyt ovšem nebyl tak četný jako u ostatních skupin. Bylo zjištěno, že tato směs dekontaminantů nemá vliv na anaerobní bakterie. U vzorku bylo také zjišťováno, zda kuřecí mikroflóra zahrnuje i mléčné bakterie, jak uvádí příslušná literatura [37]. Výskyt bakterií mléčného kvašení se potvrdil i u tohoto pokusu.

6.3.4 Srovnání účinku směsi 2% LA + 0,2% PS a 2% LA + 0,5% PS metodou ponoření

Statisticky nevýznamný účinek měly tyto směsi na koliformní mikroorganismy z Endo agaru. Větší účinek 0,5% než 0,2% sorbanu draselného byl na koliformní mikroorganismy z XLD agaru [13; 32]. XLD agar je více selektivní půda než Endo agar, na kterém roste širší spektrum gramnegativních bakterií. Rozdíl v aplikované dekontaminační směsi byl v prvních dvou dnech po aplikaci. Poté se účinek různých koncentrací vyrovnal.

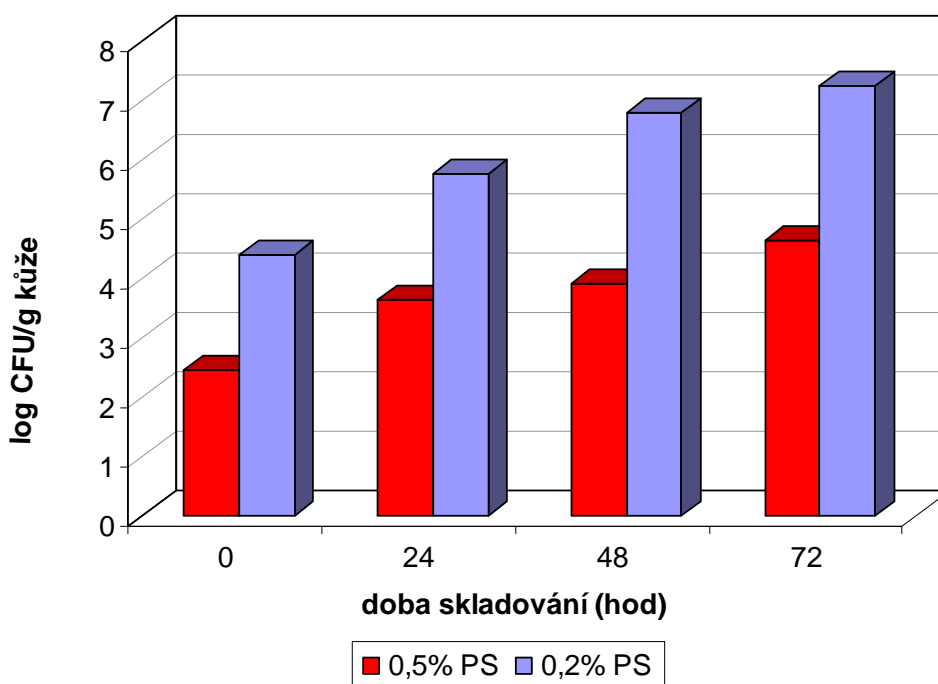
Vliv působení na celkové počty aerobní mezofilní mikroorganismy a na stafylokoky byl rozdílný ihned po aplikaci dekontaminační směsi na povrch drůbeže v hodině 0. Během dalšího chladírenského skladování drůbeže se počet mikrobů vyrovnával a rozdíl tudíž nebyl v dalších hodinách shledán statisticky významným.

U psychrotrofních mikroorganismů byl vliv 0,5% sorbanu draselného oproti 0,2% sorbanu nejvíce účinný [25]. Podle statistiky byl účinek jako statisticky významný vyhodnocen po aplikaci, v hodině 0, také v hodině 24 a 48. V posledním dnu tento vliv zeslábnul na úroveň nižší koncentrace sorbanu draselného.

Velká účinnost vyšší koncentrace sorbanu byla zjevná též na kvasinky [3]. Rozdíl se neprojevil ihned po aplikaci v hodině 0, ale dalším chladírenským skladováním docházelo ke

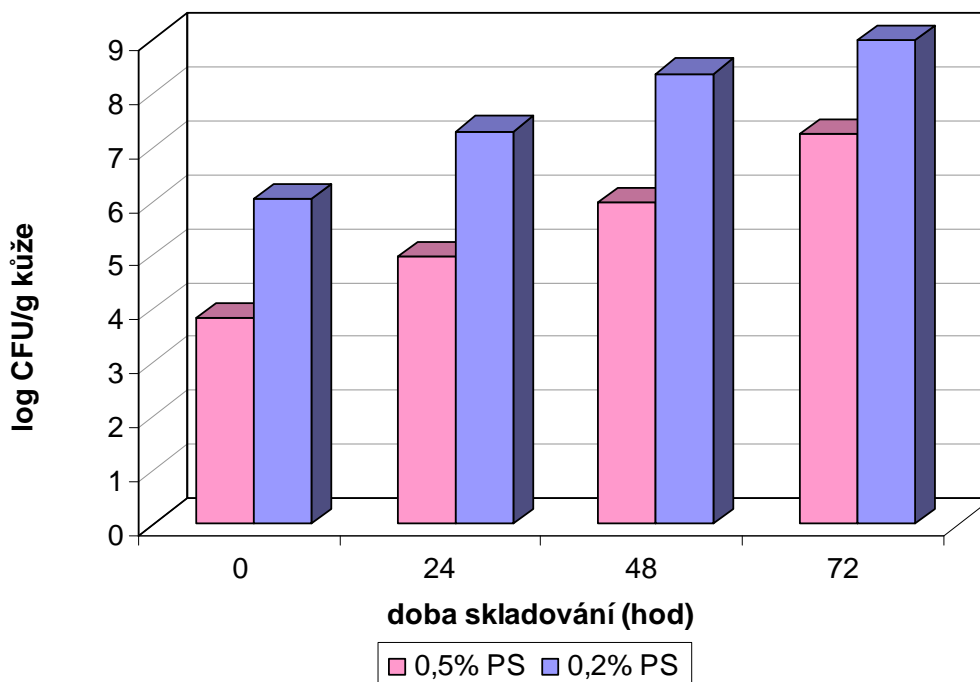
zvyšování účinku a v hodinách 24, 48 a 72 byl vyhodnocen statisticky významný rozdíl mezi dvěma sledovanými koncentracemi sorbanu draselného.

Na obrázku (*Obr. 36*) je znázorněn graf se statisticky nevýznamným rozdílem v účinku 0,2% a 0,5% sorbanu draselného na koliformní bakterie z Endo agaru. Přestože jsou rozdíly větší než 2 řády log CFU/g, statisticky byly vyhodnoceny jako nevýznamné zřejmě z důvodu velké směrodatné odchylky.



Obr. 36. Graf účinků 0,2% a 0,5% sorbanu draselného na koliformní bakterie kultivované na Endově agaru

Obrázek (*Obr. 37*) zase znázorňuje největší rozdíl na psychrotrofní mikroorganismy v účinnosti použitých koncentrací sorbanu draselného. Jak je již z grafu patrné, rozdíl v použití koncentrací je výrazný, totéž potvrzuje i vyhodnocení statistické analýzy [25].



Obr. 37. Graf účinků 0,2% a 0,5% sorbanu draselného na psychrotrofní mikroorganismy

6.3.5 Srovnání účinku metod ponorem a postřikem

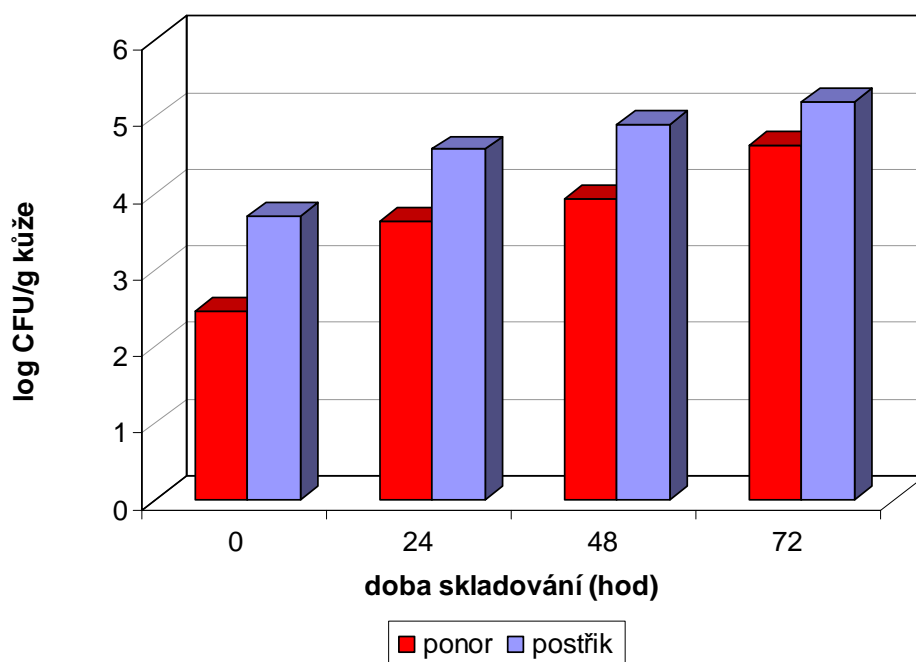
Daný pokus se prováděl dvěma metodami, aplikaci směsi ponorem a postřikem, kdy se použila směs o stejné koncentraci na mikroflóru drůbeže a sledoval se rozdíl mezi těmito dvěma metodami.

Vůbec žádný rozdíl mezi ponorem a postřikem se neprojevil u celkových počtů aerobních mezofilních mikroorganismů. U psychrotrofních mikroorganismů byl velmi podobný průběh, jen s malou výjimkou v 24 hodině, kdy byl podle statistické analýzy vyhodnocen rozdíl. Na růst stafylokoků různé metody taktéž neměly velký účinek, rozdílnost se projevila pouze ihned po aplikaci první den. Další dny byly v případě obou metod stejné. Zajímavý průběh byl vysledován u kvasinek, kdy rozdíl mezi ponorem a postřikem byl shledán po aplikaci v čase 0 a poslední den chladírenského skladování, v hodině 72. Uprostřed skladování v hodinách 24 a 48 došlo k vyrovnání účinku metod. Rozdílný účinek byl shledán na koliformních bakteriích z Endo agarů a XLD agarů. U koliformních bakteriích na XLD agarů nebyl na počátku aplikace žádný rozdíl a to v časech 0 a 24 hodin. Avšak po delší době skladování se rozdílnost metod projevila a nastal rozdíl mezi těmito dvěma metodami. Rozdílnost v účinku těchto metod byl po celou dobu chladírenského skladování u koli-

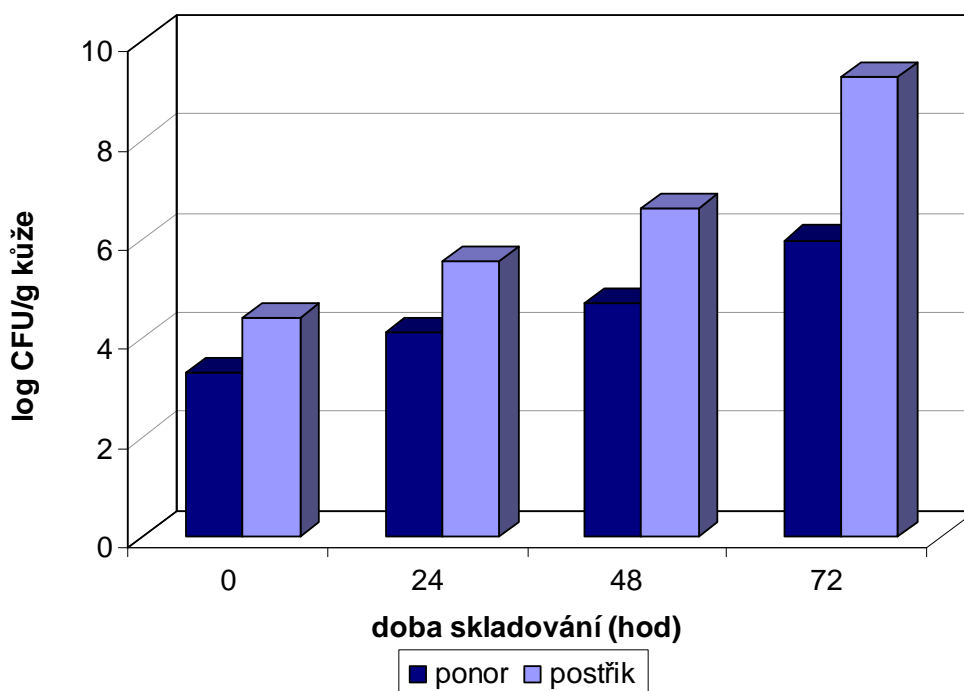
formních bakterií z Endo agaru. Metoda ponorem byla neúčinnější u těchto koliformních bakterií. U ostatních skupin docházelo k vyrovnání s metodou postřiku.

Celkově byla metoda ponoru shledána účinnější než metoda postřiku (viz *Obr. 38 a 39*). Vzorek ošetřený ponorem do směsi byl dokonaleji dekontaminován, než-li vzorek, který byl ošetřen postřikem [33]. Bylo to nejspíše způsobené nedostačujícím množstvím, které bylo aplikováno rozprašovačem. Nicméně, v praxi se spíše využívá ošetření postřikem kvůli vyšší hygieně a nižšího stupně kontaminace. Ponorem drůbeže do roztoku dochází ke kontaktu těl, k hromadění mikrobiální zamořenosti z drůbeže a tím ke kontaminaci.

Mikrobiální limity pro množství mikroorganismů v potravinách jsou dané vyhláškou Mze č.375/2003 Sb., ze dne 30. října 2003, kterou se provádějí některá ustanovení zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon), ve znění pozdějších předpisů, a o veterinárních požadavcích na živočišné produkty.



*Obr. 38. Dynamika růstu koliformních mikroorganismů kultivovaných na Endo-
vě agaru v průběhu chladírenského skladování metodami ponorem a postřikem*



Obr. 39. Dynamika růstu kvasinek v průběhu chladírenského skladování metodami ponorem a postřikem

6.4 Bakteriální identifikace

Literatura se obecně shoduje, že mikroflóra chlazené drůbeže může být kontaminovaná zejména těmito podmíněně patogenními zástupci rodů *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Listeria*, *Staphylococcus* a *Yersinia*. Přítomné bývají i psychrofilní bakterie rodu *Pseudomonas* a bakterie mléčného kvašení [3; 19; 8; 21].

Kažení masa způsobují především aerobní kmeny rodu *Pseudomonas*. Pseudomonády nemají specifické požadavky na růst a proto není jejich růst ničím omezen. Gramnegativní aerobní nefermentující OXI negativní bakterie byly nalezeny též na vzorcích použitých k analýze. V menší míře kažení způsobují i rody *Acinetobacter* a *Moraxella*, jejichž výskyt byl taktéž zaznamenán [39; 3].

Z celkového náhodně vybraného počtu 28 izolovaných kmenů z povrchu drůbeže bylo 92,9 % gramnegativních bakterií a 7,1 % grampozitivních. Přítomné grampozitivní bakterie byly kokovitého tvaru, test na tvorbu katalasy byl pozitivní a oxidasový test negativní. Podle této charakteristiky by se mohlo jednat o zástupce rodu *Staphylococcus*. Vzhledem

k velkému procentuálnímu rozdílu lze vyvodit závěr, že gramnegativní bakterie jsou na povrchu chlazené drůbeže zastoupeny v hojnějším počtu než grampozitivní.

Největší procentuální zastoupení z kmenů, u nichž byl proveden ENTEROtest, měla bakterie rodu *Klebsiella* s 46,1 %, následoval jí rod *Enterobacter* s 23,1 %. Ostatní identifikované bakteriální kmeny byly zastoupeny se 7,7 %. Kromě typických bakterií vyskytujících se na drůbeži byl identifikován i druh *Hafnia alvei*. Je to gramnegativní fakultativně anaerobní bakterie, která se řadí do čeledi *Enterobacteriaceae*. Způsobuje řadu střevních poruch, včetně gastroenteritidy, také zánět žlučových cest, žlučníku a slepého střeva. Byla izolována ze savců, ryb, ptáků, půdy, vody i jídla [38; 36; 3]

Bakteriální identifikace pomocí ENTEROtestu nebyla dokonalá. Některé kmeny se podařilo zařadit pouze do rodové příslušnosti. Důvodů, proč se některé izolované bakteriální kmeny nepodařilo zařadit do taxonomických skupin, může být několik. Některé z možných příčin neúspěšné identifikace mohly být použité vysoké nebo naopak nízké hustoty suspenze nebo netypické reakce vybraných izolátů.

Identifikační testy nebyly provedeny u kvasinek. Ovšem výskyt kvasinek na drůbežím mase je poměrně běžný. Odborná literatura uvádí mezi nejčastější druhy kvasinek, které byly izolovány z drůbežího masa, následující rody: *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, přičemž většina kvasinek se vyskytuje na povrchu drůbeže [39; 3].

6.5 Srovnání drůbeže zakoupené v obchodní síti a přímo od výrobce firmy Raciola s.r.o.

Firma Raciola Jehlička s.r.o. poskytla vzorky kuřat přímo z výrobní linky před chlazením a po chlazení. Tyto vzorky byly porovnávány se vzorky zakoupenými v obchodní síti. U vzorků byly sledovány celkové počty aerobních mezofilních a psychrotrofních mikroorganismů, koliformní bakterie a kvasinky.

Vzorky před chlazením vykazovaly největší hodnoty u všech sledovaných skupin mikroorganismů. Bylo to z toho důvodu, že drůbež byla odebrána ihned po jatečném upravení a evisceraci. Vzorky jatečně upravených těl byly ještě teplé a povrchová mikroflóra byla složena z přirozené mikroflóry živých kuřat. Je možné, že povrch jatečně upravených těl byl kontaminován stykem s peřím či obsahem střev při zpracování. Po chladírenském ošet-

ření nastal úbytek mikroorganismů na kůži drůbeže u všech sledovaných skupin okolo 1 řádu log CFU/g.

Toto mikrobiální zamoření mohlo být způsobeno manipulací jatečně upravených těl během dopravy do obchodní sítě a další manipulací v obchodě, kde dochází ke kontaktu s nástroji či zaměstnanci.

Dále byl zkoumán vzorek odebraný před chlazením a ošetřený 2% kyselinou mléčnou a 0,5% sorbanem draselným metodou ponoru se vzorkem z obchodní sítě ošetřeným stejnou dekontaminační směsí. Ihned po aplikaci nebyl na ošetřeném vzorku z výrobní linky zaznamenán nárůst aerobních mezofilních mikroorganismů. Ovšem na vzorku z obchodní sítě byl ihned po aplikaci nárůst sledované skupiny okolo 3 řádů log CFU/g. Dále byl sledován růst koliformních bakterií. Na vzorku z výrobní linky po aplikaci nebyl opět shledán žádný nárůst dané mikroflóry. Po 72 hodinách došlo k nárůstu četnosti. Vzorek z obchodu vykazoval podobný růst jako u mezofilních mikroorganismů, ale hodnoty řádu log CFU/g byly nižší. Účinek dekontaminační směsi měl vliv na sledovanou mikroflóru jak je patrné i grafů (*Obr. 33, 34*).

Vzorek, který byl odebrán před chladírenským ošetřením vykazoval menší nárůst mikroflóry než vzorek ošetřený chlazením. Po chlazení nastává úbytek mikroorganismů, ale během transportu a také manipulací dochází ke snížení hygieny a zvýšení mikrobiální zamořenosti produktů.

ZÁVĚR

V diplomové práci byl zkoumán antimikrobiální účinek organických kyselin na kůži chlazené drůbeže. Bakteriální mikroflóra vyskytující se na drůbeží kůži může obsahovat salmonely, *Pseudomonas*, koliformní bakterie, stafylokoky, kvasinky, plísně a další aerobní a anaerobní bakterie. Některé z těchto bakterií mohou v průběhu jatečného zpracování drůbeže infikovat kuřecí kůži a tím se dostat až ke spotřebiteli. Řada z nich může být pro člověka patogenní a způsobovat závažná onemocnění.

V dnešní době je kvalita a zdravotní nezávadnost prioritou potravinářských podniků. Je nutné, aby se ke konečnému spotřebiteli dostaly bezpečné, kvalitní a hlavně zdravotně nezávadné potraviny. Proto se hledají různé alternativy zajištění bezpečnosti potravin. Jednou z mnoha alternativ je použití organických kyseliny a jejich solí.

Cílem práce bylo prokázat antimikrobní účinek směsi kyseliny mléčné se sorbanem draselným v kombinaci s lysozymem na mikroflóru kuřecí kůže. Kyselina mléčná je přirozenou součástí masa a se sorbanem draselným se v potravinářství používají jako aditiva. Sledoval se účinek na aerobní mezofilní mikroorganismy, koliformní a psychrotrofní bakterie, stafylokoky a kvasinky v průběhu tří dnů skladování. Aplikace směsi kyseliny mléčné se sorbanem draselným snižuje mikrobiální četnost a zpožďuje okamžik nástupu fáze logaritmického nárůstu mikroorganismů. Pravděpodobnou příčinou je snížení hodnoty pH povrchové tkáně a následné ovlivnění růstu mikroorganismů. Ošetření povrchu kůže směsí vedlo ke snížení hodnoty pH a tím k redukci mikroorganismů na povrchu.

Byly použity stejné roztoky směsi kyseliny mléčné a sorbanu draselného, které se aplikovaly dvěma různými metodami. Při aplikaci ponorem do roztoku došlo až k několikanásobnému zvýšení antimikrobiálního účinku oproti postřiku. Lze to vysvětlit tím, že při postřiku dekontaminantů na povrch drůbeže se nevytvořil rovnoměrný nános roztoku na všech místech jatečně upraveného těla. Při ponoru do dekontaminačního roztoku dochází k rovnoměrnému nánosu po celém povrchu těla drůbeže.

Nejnižší inhibiční efekt na sledované skupiny mikroorganismů měla směs aplikovaná metodou postřiku. U koliformních mikroorganismů byla mikrobiální četnost na konci chladiřského skladování až o dvojnásobek vyšší než u aplikace ponorem. Stejná směs aplikovaná ponorem na jatečně upravené tělo drůbeže do roztoku vykazovala největší inhibiční efekt na všechny sledované skupiny. Složení této směsi bylo podle statistické analýzy do-

stačující po celou dobu chladírenského skladování drůbeže. Směs složená ze sorbanu s nižší koncentrací aplikována ponorem, tak velké dekontaminační účinky neměla, ale byla, až na malé výjimky, taktéž dostačující. Nejmenší účinek této směsi se ukázal být na aerobní mezofilní bakterie a stafylokoky.

Lze říci, že ošetření povrchu chlazené drůbeže roztokem směsi kyseliny a sorbanu vedlo k okamžitému snížení povrchové kontaminace, během chladírenského skladování dochází k pozvolnému nárůstu mikroorganismů, ovšem tento růst je oproti kontrole zpomalen.

Součástí práce bylo zjistit zda lysozym v kombinaci s organickými kyselinami má vliv na mikroflóru chlazené drůbeže. Po vyhodnocení bylo zjištěno, že lysozym v množství, které bylo aplikováno, nemá vliv na mikroorganismy nacházející se na chlazené drůbeži. Bylo zjištěno, že na povrchu drůbeže se vyskytují ve větším počtu gramnegativní bakterie. Lysozym má baktericidní účinky a je schopen štěpit vazby v buněčné stěně grampozitivních bakterií, které jsou zastoupeny pouze v malém množství. Proto zřejmě nedošlo k významnějšímu ovlivnění mikrobiální četnosti.

Ukazuje se tedy, že testovaný způsob ošetření povrchu drůbeže roztokem kyseliny se sorbanem draselným zpomaluje mikrobiální nárůst, což v konečném důsledku znamená zvýšení údržnosti a bezpečnosti chlazené drůbeže. Je ovšem důležité připomenout, že žádná technologická překážka nemůže nahradit vstupní jakost suroviny stejně jako vysokou hygienu výroby a provozu v potravinářských závodech.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ALAKOMI, H.-L. et al. Lactic acid permeabilizes gram-negative by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol. 66, 2001-2005 s.
- [2] BEDNÁŘ, M. et al. *Lékařská mikrobiologie*. 1.vyd. Marvill Praha, 1996, 558 s.
- [3] BLACBURN, C. *Food spoilage microorganisms*. New York, CRC Press, 2006, 712 s.
- [4] BOLDER, N. M. Decontamination of meat and poultry carcasses. *Trends in Food Science and Technology*, 1997, vol. 8, 221 – 227 s.
- [5] BRANEN, J. K., DAVIDSON, P.M. Enhancement of nisin, lysozyme and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 421 – 433 s.
- [6] ČECHOVÁ, L., JANALÍKOVÁ, M. *Obecná mikrobiologie*. 1. vyd. Univerzita T. Bati ve Zlíně, 2007, 190 s.
- [7] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*. 1. vyd. Praha, SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1983, 632 s.
- [8] DAVIES, A., BOARD, R. *The Microbiology of meat and poultry*. 1st edition. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 327 s.
- [9] DEUMIER, F. Decontamination of deboned chicken legs by vacuum-tumbling in lactic acid solution. *International Journal of Food Science and Technology*, 2006, vol. 41, 23 – 32 s.
- [10] DOLEŽALOVÁ, M., MAROUNEK, M., BŘEZINA, P., SEDLÁČEK, I., ŠMAJS, D. Charakteristika mikroflóry povrchu chlazené drůbeže. In Sborník 24. Kongres Československé společnosti mikrobiologické, Liberec, 2007, 185 - 185 s.
- [11] DORKO, C., FORD, T.G. Sorbic acid. *InterScience*, 2000
- [12] GILL, C. O., NEWTON, K.G. Effect of lactic acid concentration on growth on meat of gramnegative psychrotrophs from a meatworks. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, vol. 43, 284 – 288 s.

- [13] GONZÁLES-FANDOS, E., DOMINGUEZ, J. L. Effect of potassium sorbate washing on the growth of *Listeria monocytogenes* on fresh poultry. *Science Direct*, 2007, vol.18, 842 – 846 s.
- [14] GÖPFERTO VÁ, D., JANO VSKÁ, D., DOHNAL, K. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena*. 3. vyd. Praha: Nakladatelství TRITON, 2002. 148 s.
- [15] GROSSMANN, M. *Mikrobiologie v hygieně*. 1. vyd. VVŠ PV Vyškov, 1999, 175s.
- [16] RAU A. The crystal structure of a bacterial lysozyme at atomic resolution: Dissertation. Chemisch – Geowissenschaftlichen Fakultät der Friedrich – Schiller – Universität Jena. 2005, 131 s.
- [17] HINTON, A., INGRAM, K.D. Use of oleic acid To Reduce the Population of the Bacterial Flora of Poultry Skin. *Journal of Food Protection*, March 2000, vol. 63, 1282-1286 s.
- [18] HRABĚ, J. *Technologie výroby potravin živočišného původu*. 1. vyd. Univerzita T. Bati ve Zlíně, 2006, 180 s.
- [19] HRUBÝ, S., TUREK, B. *Mikrobiologická problematika ve výživě*. 1. vyd. VVŠ PV Vyškov, 1996, 145 s.
- [20] HUGHEY, V.L., JOHSON, E.A. Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Applied and Environment Microbiology*, 1987, vol. 53, 2165 – 2170 s.
- [21] ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for food): *Microorganisms of foods 6*. Microbial ecology of food commodities, New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005, 763 s.
- [22] IMMERSEEL, F., RUSSELL, J. B., FLYTHE, M. D., GANTOIS, I., TIMBERMONTA, L., PASMANS, F., HAESBROUCK, F., DUCATELLE, R. The use of organic acids to combat Salmonella in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathology*, 2006, vol. 35, 182 – 188 s.
- [23] KAMENÍK, J. Produkce a spotřeba masa. *Potravinářská revue*, 2007, č. 2, 55 – 58 s.

- [24] KAPRÁLEK, F. *Základy bakteriologie*. Univerzita Karlova v Praze - nakladatelství Karolinum, 2000, 241 s.
- [25] KOLSARICI, N., CANDOGAN, K., The effects of potassium sorbate and lactic acid on the shelf-life of vacuum-packed chicken meats. *Poultry science*, 1995, vol. 74, 1884 – 1893 s.
- [26] KYZLINK, V. *Teoretické základy konzervace potravin*. Praha, SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1998, 512 s.
- [27] MACHÁČKOVÁ, M. Dekontaminace povrchu jatečně upravených těl. *Maso*, 2004, článek 24274
- [28] MASSA, S. Comparison of plate count agar and R2A medium for enumeration of heterotrophic bacteria in natural mineral water. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1998, vol. 14, 727 – 730 s.
- [29] BIRMINGHAM, C.L., CANADIEN, V., KANIUK, N. A., STEINBERG, B. E., HIGGINS, J., BRUMELL, H. *Microbiology Bytes*. Listeriosis in the UK up 80%, 2007
- [30] *Mikrobiologické kontaminanty v potravinách*. Brno: Státní zdravotní ústav - Vědecký výbor pro potraviny, 2004. 29 s., kód publikace MIKRO/2003/2/deklas
- [31] PIPEK, P. *Technologie masa II*. 2. vyd. Praha, VŠCHT, 1994, 303 s.
- [32] PIPEK, P., BOUCHNER P., KADAŇOVÁ, V., BAČO, B., Použití kyseliny mléčné k dekontaminaci povrchu masa. *Maso*, 1996, č. 5, 40 – 44 s.
- [33] PIPEK, P., BŘEZINA, P., JELENÍKOVÁ, J., BRYCHTA, J., Aditiva a údržnost. *Maso*, 1997, č. 6, 45 – 48 s.
- [34] PIPEK, P., JELENÍKOVÁ, J., ŠIKULOVÁ, M., HOUŠKA, M., HOKE, K., Dekontaminace jatečně upravených těl kombinací páry a kyseliny mléčné. *Potravinářská revue*, 2004, č. 2, 20 – 23 s.
- [35] PLUMRIDGE, A., HESSE, S. J, WATSON, A. J., LOWE, K. C., STRATFORD, M., ARCHER. D. B. The weak acid preservative sorbic acid inhibits conidial germination and mycelial growth of *Aspergillus niger* through intercellular acidification. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004 vol. 70, 3506 – 3511 s.

- [36] REAL, F., FERNANDEZ, ACOSTA, F., CASTRO, P., DÉNIZ, S., ORÓS, J. Septicemia associated with *Hafnia alvei* in laying hens. *Avion Diseases*, 1997, vol. 41, 741 – 747 s.
- [37] RÍO, del E., PANIZO-MORÁN, M. PRIETO, M., ALONSO-CALLEJA, C., CAPITA, R. Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, vol. 115, 268 – 280 s.
- [38] RODRIGUEZ, L. A., VIVAS, J., GALLARDO, C. S., ACOSTA, F., BARBEYTO, L., REAL, F. Identification of *Hafnia alvei* with the MicroScan WalkAway System. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, vol. 37, 4186 – 4188s.
- [39] ROSA, A. H., HARRISON, J. S. *The yeasts*. 2nd edition, London: Academic press, 1993, 620 s.
- [40] ROSICKÝ, B., SIXL, W. a kol. *Salmonelózy: aktuální informace pro lékaře, veterinární lékaře a potravinářskou praxi*. 1. vyd. Praha, Scientia Medica, 1994, 208s.
- [41] ROSYPAL, S. a kol. *Nový přehled biologie*. Praha, Scientia, pedagogické nakladatelství, 2003, 797 s.
- [42] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno, Masarykova univerzita, 2007, 270 s.
- [43] SCHNEIDEROVÁ, P. Kontaminace jatečných těl drůbeže při zpracování. *Bezpečnost potravin*, 2004, 48 – 49 s.
- [44] SCHNEIDEROVÁ, P. Nebezpečí mikrobiální kontaminace při výrobě drůbežního masa. *Bezpečnost potravin*, 2007, 401 - 411 s.
- [45] SIMEONOVÁ, J. a kol. *Technologie drůbeže, vajec a minoritních živočišných produktů*. 1. vyd. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1999, 247 s.
- [46] STEINHAUSER L. a kol. *Hygiena a technologie masa*. 1.vyd. Brno, Vydavatelství potravinářské literatury LAST, 1995, 664 s.

- [47] ŠÍCHO, V., VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ, B. *Potravinářská biochemie*. Praha, SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1998, 360 s.
- [48] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2 vyd. Victoria Publishing, Praha, 1995, 361 s.
- [49] TNW-lite [program na CD-ROM]. Ver. 4.0., PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o., Počítačový program určený pro identifikaci mikroorganismů. Pracuje pod OS Windows/9x/ME/NT/2000/XP
- [50] UNISTAT[®], verze 5.5.05. Ltd. London, UK.
- [51] VAŘEJKA, F., MRÁZ, O., SMOLA, J. *Speciální veterinární mikrobiologie*. 1. vyd. Praha, Státní zemědělské nakladatelství, 1989, 264 s.
- [52] VELEBA, J. Hospodářské a geografické předpoklady produkce konzumních vajec, drůbežího a vepřového masa v ČR. *Poultry – Techagro 2008. Možnosti zvyšování kvality vajec a drůbežího masa*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2008, 168 s.
- [53] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. Tábor, OSSIS, 1999, 368 s.
- [54] Vyhláška MZd ČR č. 4/2008 Sb., ze dne 3. ledna 2008, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin.
- [55] Vyhláška MZd ČR č. 53/2002 Sb., ze dne 29. ledna 2002, kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky použití látek přídatných, pomocných a potravních doplňků.
- [56] Vyhláška MZd ČR č. 304/2004 Sb., ze dne 6. května 2004, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných a pomocných látek při výrobě potravin.
- [57] Vyhláška MZd ČR č. 514/2006 Sb., ze dne 10. listopadu 2006, kterou se mění vyhláška č. 54/2002 Sb., kterou se stanoví zdravotní požadavky na identitu a čistotu přídatných látek
- [58] Vyhláška MZe ČR č. 89/2000 Sb., ze dne 30. března 2000, kterou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 327/1997 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o

změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich

[59] Becton, Dickenson and Company [online]. [cit. 2008-03-15]. Dostupný z www:

<<http://www.bd.com>>

[60] Čaderský – Envitek. [online]. [cit. 2008-03-03]. Dostupný z www:

<<http://www.himedia.cz/pouziti.php?no=3>>

[61] El cuarto Blanco - Biblioteca Web. [online]. [cit. 2008-03-15]. Dostupný z www:

<<http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.educa.aragob.es/>>

[62] EMD Chemicals. [online]. [cit. 2008-03-15]. Dostupný z www:

<http://www.emdchemicals.com/corporate/emd_corporate.asp>

[63] Escherichia coli. [online]. [cit. 2008-03-24]. Dostupný z www:

<http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli>

[64] Escherichia coli. [online]. [cit. 2008-03-28]. Dostupný z www:

<<http://www.eadgene.info/NewsandEvents/EADGENEEvents/EcoliandSalmonellaWorkshop/tabid/225/Default.aspx>>

[65] Chemistry at the University of Ulm. [online]. [cit. 2008-03-24]. Dostupný z www:

<<http://www.chemie.uni-ulm.de/experiment/lysozym.gif>>

[66] Keul. [online]. [cit. 2008-03-15]. Dostupný z www:

<http://www.keul.de/english/products/microbiology_-_labm/media_range/plate_count_agar.html>

[67] Merck. [online]. [cit. 2008-03-15]. Dostupný z www:

<http://www.merck.cz/data/navodypdf_micro/110660.pdf>

[68] MicroEd Service. [online]. [cit. 2008-03-15]. Dostupný z www:

<<http://www.microedservices.com/ASCatViewer/ProdInserts/LMRS%20Agar%20Insert.pdf>>

[69] MicroTrade UK. [online]. [cit. 2008-03-15]. Dostupný z www:

<<http://www.microtradeuk.com/>>

- [70] MSA agar [online]. [cit. 2008-03-15]. Dostupný z www:
<http://en.wikipedia.org/wiki/Mannitol_Salt_Agar>
- [71] National Standard Methods. [online]. [cit. 2008-03-15]. Dostupný z www:
<<http://www.hpa-standardmethods.org.uk/index.asp>>
- [72] Produkce masa – Česká zemědělská univerzita v Praze. [online]. [cit. 2008-02-19]. Dostupný z www: <<http://kchpd.af.czu.cz/drubez/maso>>
- [73] Salmonela. [online]. [cit. 2008-03-05]. Dostupný z www:
<<http://en.wikipedia.org/wiki/Salmonella>>
- [74] Hygienická stanice hlavního města Prahy. [online]. [cit. 2008-03-05]. Dostupný z www: <<http://hygp Praha.cz/files/salmoneloza.pdf>>
- [75] Sigma – Aldrich. [online]. [cit. 2008-03-15]. Dostupný z www:
<<http://www.sigmaaldrich.com/>>
- [76] Snow Kris. [online]. [cit. 2008-03-15]. Dostupný z www:
<http://www.wisc-online.com/objects/index_tj.asp?objID=MBY4207>
- [77] Waksman foundation for microbiology. [online]. [cit. 2008-03-15]. Dostupný z www: <<http://www.waksmanfoundation.org/labs/lsu/mannitol.html>>
- [78] XLD agar.[online]. [cit. 2008-03-05]. Dostupný z www:
<http://en.wikipedia.org/wiki/XLD_agar>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CCP	Critical Control Points
CFU	Colony Forming Units
ČSÚ	Český statistický úřad
DCA agar	Deoxycholate Citrate Agar
FAO	Food and Agriculture Organization
G ⁻	Gramnegativní
G ⁺	Grampozitivní
GKCHA	Glukoso-kvasničný chloramfenikolový agar
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
KOH	KOH test
LA	Kyselina mléčná
MSA	Mannitol Salt Agar
OFT	Oxidačně fermentační test
ONPT	Stanovení aktivity β -D-galaktosidasy
OXI	Stanovení aktivity cytochromoxydasy
PCA	Plate count agar
PS	Sorban draselný
VPT	Voges-Proskauerův test
XLD	Xylosa-lysin-deoxycholát agar

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1. Escherichia coli
- Obr. 2. Listeria monocytogenes
- Obr. 3. Clostridium botulinum
- Obr. 4. Prostorový model lysozymu
- Obr. 5. Kolonie bakterií na PCA
- Obr. 6. Endo agar
- Obr. 7. XLD agar
- Obr. 8. GKCHA
- Obr. 9. MSA
- Obr. 10. Vývoj pH po aplikaci jednotlivých směsí během chladírenského skladování
- Obr.11. Dynamika růstu aerobních mezofilních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného
- Obr. 12. Dynamika růstu koliformních mikroorganismů na Endo agaru v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného
- Obr. 13. Dynamika růstu koliformních mikroorganismů na XLD agaru v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného
- Obr. 14. Dynamika růstu psychrotrofních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného
- Obr. 15. Dynamika růstu stafylokoků v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného
- Obr. 16. Dynamika růstu kvasinek v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného
- Obr. 17. Dynamika růstu aerobních mezofilních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného
- Obr. 18. Dynamika růstu koliformních mikroorganismů na Endově agaru v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného

- Obr. 19. Dynamika růstu koliformních mikroorganismů na XLD agaru v průběhu skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného
- Obr. 20. Dynamika růstu psychrotrofních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného
- Obr. 21. Dynamika růstu stafylokoků v průběhu skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného
- Obr. 22. Dynamika růstu kvasinek v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného
- Obr. 23. Dynamika růstu aerobních mezofilních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného postřikem
- Obr. 24. Dynamika růstu koliformních mikroorganismů na Endově agaru v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného postřikem
- Obr. 25. Dynamika růstu koliformních mikroorganismů na XLD agaru v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného postřikem
- Obr. 26. Dynamika růstu psychrotrofních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného postřikem
- Obr. 27. Dynamika růstu stafylokoků v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného postřikem
- Obr. 28. Dynamika růstu kvasinek v průběhu chladírenského skladování po ošetření 2% kyseliny mléčné a 0,5% sorbanu draselného postřikem
- Obr. 29. Rozdělení izolovaných kmenů na gramnegativní a grampozitivní s podrozdělením na fermentující, nefermentující, oxidasa negativní, oxidasa pozitivní bakterie
- Obr. 30. Procentuální zastoupení jednotlivých identifikovaných bakteriálních kmenů
- Obr. 31. Dynamika růstu mikroorganismů před chlazením, po chlazení a z obchodní sítě první den skladování
- Obr. 32. pH jednotlivých vzorků v první den skladování

- Obr. 33. Porovnání počtu mezofilních mikroorganismů ihned po ošetření 2% LA a 0,5% PS a po 72 hodině chladírenského skladování na PCA agaru
- Obr. 34. Porovnání počtu koliformních bakterií ihned po ošetření 2% LA a 0,5% PS a po 72 hodině chladírenského skladování na Endo agaru
- Obr. 35. Dynamika růstu stafylokoků v průběhu chladírenského skladování po aplikaci lysozymu
- Obr. 36. Graf účinků 0,2% a 0,5% sorbanu draselného na koliformní bakterie kultivované na Endově agaru
- Obr. 37. Graf účinků 0,2% a 0,5% sorbanu draselného na psychrotrofní mikroorganismy
- Obr. 38. Dynamika růstu koliformních mikroorganismů kultivovaných na Endově agaru v průběhu chladírenského skladování metodami ponorem a postříkem
- Obr. 39. Dynamika růstu kvasinek v průběhu chladírenského skladování metodami ponorem a postříkem
- Obr. 40. Srovnání mezofilních mikroorganismů u kontroly a ošetřeného vzorku po aplikaci 2% LA a 0,2% PS ponorem ve 48 hodině, ředění 10^{-4} (foceno na tmavém podkladu)
- Obr. 41. Srovnání kontroly a ošetřeného vzorku po aplikaci 2% LA a 0,5% PS ponorem ve 48 hodině kultivované na Endo agaru (ředění 10^0)
- Obr. 42. Srovnání koliformních mikroorganismů kultivovaných na XLD agaru u kontroly a ošetřeného vzorku po aplikaci 2% LA a 0,5% PS ponorem ve 48 hodině (ředění 10^0)
- Obr. 43. Srovnání růstu kvasinek u kontroly a ošetřeného vzorku po aplikaci 2% LA a 0,5% PS ponorem v 0 hodině (ředění 10^{-2})

SEZNAM TABULEK

- Tab. 1. Produkce masa ve světě v letech 2005 a 2006
- Tab. 2. Spotřeba masa na 1 obyvatele ČR v kg
- Tab. 3. Přehled bakterií rostoucí na Endo agaru
- Tab.4. růst bakterií na MSA médiu
- Tab. 5. Vliv jednotlivých dekontaminačních směsí na hodnoty pH kůže drůbeže během chladírenského skladování
- Tab. 6. Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování
- Tab. 7. Celkové počty koliformních mikroorganismů kultivovaných na Endo agaru vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování
- Tab. 8. Celkové počty koliformních mikroorganismů kultivovaných na XLD agaru vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování
- Tab. 9. Celkové počty psychrotrofních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování
- Tab. 10. Celkové počty stafylokoků vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování
- Tab. 11. Celkové počty kvasinek vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování
- Tab. 12. Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování
- Tab. 13. Celkové počty koliformních mikroorganismů kultivovaných na Endo agaru vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování
- Tab. 14. Celkové počty koliformních mikroorganismů kultivovaných na XLD agaru vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování
- Tab. 15. Celkové počty psychrotrofních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Tab. 16. Celkové počty stafylokoků vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Tab. 17. Celkové počty kvasinek vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Tab. 18. Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Tab. 19. Celkové počty koliformních mikroorganismů kultivovaných na Endo agaru vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Tab. 20. Celkové počty koliformních mikroorganismů na XLD agaru vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Tab. 21. Celkové počty psychrotrofních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Tab. 22. Celkové počty stafylokoků vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Tab. 23. Celkové počty kvasinek vyjádřené jako log CFU/g kůže během chladírenského skladování

Tab. 24. Výsledky identifikace pomocí soupravy ENTEROtestu16

Tab. 25. Sledované skupiny mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže první den skladování

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Počty mikroorganismů během chladírenského skladování vztažené ke kontrolnímu vzorku

Příloha P II: Výsledky biochemických testů

Příloha P III: Fotografie sledovaných ploten po aplikaci dekontaminační směsi

**Příloha P I: Počty mikroorganismů během chladírenského skladování
vztažené ke kontrolnímu vzorku**

		0 h	24 h	48 h	72 h
koli- formní (Endo agar)	kontrola	0,00 ± 0,00 ^a A	0,68 ± 0,41 ^a B	1,86 ± 0,28 ^a C	2,92 ± 1,09 ^a D
	0,2% pr	-1,12 ± 0,01 ^{bc} A	-0,08 ± 0,65 ^b AB	0,72 ± 0,67 ^b BC	1,44 ± 0,67 ^b C
	0,5% pr	-1,61 ± 1,38 ^c A	-0,03 ± 0,04 ^b B	0,19 ± 0,19 ^c B	0,78 ± 0,19 ^b B
	0,5% pk	-0,24 ± 0,06 ^{ab} A	1,06 ± 0,02 ^a B	1,13 ± 0,13 ^d B	4,07 ± 0,11 ^c C
koli- formní (XLD agar)	kontrola	0,00 ± 0,00 ^a A	1,09 ± 0,49 ^a B	2,03 ± 0,66 ^a C	2,72 ± 0,77 ^a D
	0,2% pr	-0,28 ± 0,32 ^{ab} A	0,74 ± 0,29 ^a B	1,11 ± 0,28 ^b B	1,95 ± 0,31 ^{ab} C
	0,5% pr	-1,23 ± 1,51 ^{bc} A	-0,19 ± 0,73 ^b AB	0,13 ± 0,11 ^c B	1,08 ± 0,15 ^b B
	0,5% pk	-1,75 ± 1,02 ^c A	-0,05 ± 0,31 ^b B	0,97 ± 0,28 ^b C	-0,38 ± 0,66 ^c B
CPM	kontrola	0,00 ± 0,00 ^a A	1,08 ± 0,55 ^a B	1,77 ± 0,51 ^a C	3,24 ± 0,47 ^a D
	0,2% pr	-0,91 ± 0,71 ^b A	0,42 ± 0,28 ^b B	1,22 ± 0,27 ^{ab} C	2,79 ± 0,42 ^{ab} D
	0,5% pr	-0,43 ± 0,38 ^c A	0,11 ± 0,12 ^b B	-0,08 ± 0,18 ^b AB	2,40 ± 0,14 ^b C
	0,5% pk	-0,31 ± 0,19 ^{ac} A	0,34 ± 0,13 ^b AB	0,57 ± 0,47 ^b B	2,23 ± 0,88 ^{bc} C
psychro- trofní	kontrola	0,00 ± 0,00 ^a A	1,34 ± 0,40 ^a B	2,14 ± 0,58 ^a C	3,19 ± 0,58 ^a D
	0,2% pr	-0,49 ± 0,03 ^b A	0,91 ± 0,16 ^b B	1,94 ± 0,11 ^{ac} C	2,56 ± 0,12 ^b D
	0,5% pr	-0,96 ± 0,16 ^c A	0,06 ± 0,06 ^c B	0,87 ± 0,64 ^b C	2,28 ± 0,09 ^b D
	0,5% pk	-0,73 ± 0,61 ^{bc} A	0,82 ± 0,19 ^b B	1,20 ± 0,27 ^{cb} B	2,20 ± 0,36 ^b C
stafylo- koky	kontrola	0,00 ± 0,00 ^a A	0,60 ± 0,41 ^a B	1,09 ± 0,61 ^a C	1,44 ± 0,57 ^a C
	0,2% pr	-0,41 ± 0,22 ^a A	0,19 ± 0,25 ^b AB	0,49 ± 0,53 ^{ab} BC	1,01 ± 0,52 ^{ab} C
	0,5% pr	-1,37 ± 1,66 ^b A	-0,26 ± 0,21 ^b AB	-0,09 ± 0,31 ^b AB	0,41 ± 0,40 ^b B
	0,5% pk	-0,25 ± 0,13 ^a A	-0,05 ± 0,04 ^b A	0,29 ± 0,20 ^b B	0,84 ± 0,19 ^{ab} C
kvasinky	kontrola	0,00 ± 0,00 ^a A	1,50 ± 0,93 ^a B	2,28 ± 0,80 ^a C	3,74 ± 1,29 ^a D
	0,2% pr	-0,78 ± 0,14 ^b A	1,10 ± 0,21 ^a B	1,95 ± 0,21 ^a C	0,14 ± 0,34 ^b D
	0,5% pr	-0,81 ± 0,36 ^b A	-0,13 ± 0,22 ^b AB	0,31 ± 0,23 ^b B	2,51 ± 1,03 ^a C
	0,5% pk	-0,43 ± 0,55 ^b A	1,08 ± 0,85 ^a B	2,26 ± 0,92 ^a C	4,08 ± 0,31 ^a D

0,2% pr 2% kyselina mléčná + 0,2% sorban draselný aplikovaný ponorem

0,5% pr 2% kyselina mléčná + 0,5% sorban draselný splikovaný ponorem

0,5% pk 2% kyselina mléčná + 0,5% sorban draselný aplikovaný postříkem

a, b ... statistické srovnání účinnosti mezi aplikovanými látkami

A, B ... statistické srovnání účinnosti v průběhu chladírenského skladování

Příloha P II: Výsledky biochemických testů

číslo kmenu	izolováno z půdy	barva	Gram morfologie	KOH	KAT	OXI test	OFT	VPT	ONPT
1	PCA psychrotrofní	žlutá	tyčinky	G ⁻	+	+	N	nt	nt
2	PCA psychrotrofní	sv.žlutá	kokotyčky	G ⁻	+	-	N	nt	nt
3	PCA psychrotrofní	béžová	tyčinky	G ⁻	+	+	nt	nt	nt
4	PCA psychrotrofní	bílá	tyčinky	G ⁻	+	+	nt	nt	nt
5	PCA psychrotrofní	sv.žlutá	tyčinky	G ⁻	+	+	N	nt	nt
6	PCA	žlutá	tyčinky	G ⁻	+	-	N	nt	nt
7	PCA	žlutá	tyčinky	G ⁻	+	+	F plyn	nt	nt
8	PCA	sv.žlutá	kokotyčky	G ⁻	+	+	F plyn	nt	nt
9	PCA	bílá	tyčinky	G ⁻	+	-	F plyn	+	+
10	PCA	žlutooranžová	kokotyčky	G ⁻	+	+	F plyn	nt	nt
11	XLD	žlutý střed, okolo průhledná zóna	tyčinky	G ⁻	+	-	F plyn	+	+
12	XLD	černý střed, okolo růžová zóna	tyčinky	G ⁻	+	-	F plyn	+	+
13	XLD	růžová	tyčinky	G ⁻	+	-	F plyn	+	+
14	XLD	mírně tmavý střed, bílá zóna	tyčinky	G ⁻	+	-	F	+	+
15	Endo agar	tmavě růžová, kovový lesk	kokotyčky	G ⁻	+	-	F plyn	+	+
16	Endo agar	tmavě růžová, kovový lesk	tyčinky	G ⁻	+	-	F	-	+
17	Endo agar	tmavě růžová, kovový lesk	kokotyčky	G ⁻	+	-	F plyn	+	+
18	Endo agar	tmavě růžová, kovový lesk	tyčinky	G ⁻	+	-	F plyn	+	+
19	Endo agar	tmavě růžová, kovový lesk	tyčinky	G ⁻	+	-	F plyn	-	+
20	Endo agar	tmavě růžová, kovový lesk	tyčinky	G ⁻	+	-	F plyn	+	+
21	PCA	bílá	tyčinky	G ⁻	+	+	N	-	-
22	PCA	sytě žlutá	tyčinky	G ⁻	+	+	N	+	-
23	PCA	sv.žlutá	tyčinky	G ⁻	-	+	F plyn	+	-
24	Endo agar	tmavě růžová, kovový lesk	kokotyčky	G ⁻	+	+	N plyn	+	+
25	Endo agar	tmavě růžová	tyčinky	G ⁻	+	-	N plyn	+	+
26	Endo agar	světle růžová	kokotyčky	G ⁻	+	-	N plyn	-	+
27	MSA	žlutooranžová	koky	G ⁺	+	-	F	-	+
28	MSA	světle žlutá	koky	G ⁺	+	-	F	-	+

nt ... netestováno

Příloha P III: Fotografie sledovaných ploten po aplikaci dekontaminační směsi

Níže uvedené fotografie jsou uspořádané: vlevo kontrola, vpravo ošetřený vzorek.



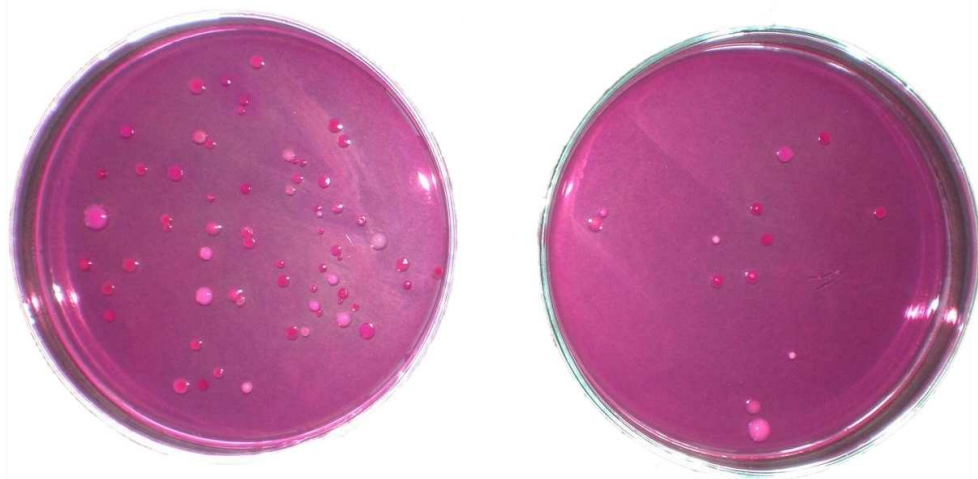
Obr. 40. Srovnání mezofilních mikroorganismů u kontroly a ošetřeného vzorku po aplikaci 2% LA a 0,2% PS ponorem ve 48 hodině, ředění 10^{-4} (foceno na tmavém podkladu)



Obr. 41. Srovnání kontroly a ošetřeného vzorku po aplikaci 2% LA a 0,5% PS ponorem ve 48 hodině kultivované na Endo agaru (ředění 10^0)



Obr. 42. Srovnání koliformních mikroorganismů kultivovaných na XLD agaru u kontroly a ošetřeného vzorku po aplikaci 2% LA a 0,5% PS ponorem ve 48 hodině (ředění 10^0)



Obr. 43. Srovnání růstu kvasinek u kontroly a ošetřeného vzorku po aplikaci 2% LA a 0,5% PS ponorem v 0 hodině (ředění 10^{-2})

