

Mgr. Magda Doležalová

**MIKROFLÓRA POVRCHU KUŘAT Z OBCHODNÍ SÍTĚ A ZKOUŠKY
PREVENCE KONTAMINACE PATOGENNÍMI BAKTERIEMI**

**MICROFLORA OF RETAIL CHICKEN SURFACE AND PREVENTING
THE CONTAMINATION BY PATHOGENS**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Program: P2901 Chemie a technologie potravin

Obor: 2901V013 Technologie potravin

Školitel: Prof. Ing. Milan Marounek, DrSc.

Konzultanti: RNDr. Leona Buňková, Ph.D., Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.

Zlín, 2009

ABSTRAKT

Práce byla zaměřena na studium skladby mikroflóry nebalené chlazené drůbeže z obchodní sítě. V literární rešerši je uveden přehled současného stavu problematiky se zaměřením na metody snižování počtu mikroorganismů na povrchu masa a drůbeže používané u nás a ve světě. V experimentální části byly izolovány bakteriální kmeny z kůže chlazených kuřat, které byly charakterizovány pomocí mikrobiologických, biochemických a molekulárně biologických metod. Dále byly testovány antimikrobiální účinky různých organických kyselin a monoacylglycerolů, z nichž byly některé vytipovány pro aplikaci na kůži chlazené drůbeže. Po aplikaci byl sledován vliv na snížení mikrobiální kontaminace kuřecí kůže. Zejména kyselina mléčná, která je přirozenou složkou masa, se jevila jako velmi účinná při potlačení mikroorganismů poškozujících drůbeží maso. Nejvyššího efektu bylo dosaženo použitím kombinace kyseliny mléčné se sorbanem draselným. Aplikace této směsi neovlivňuje vzhled, vůni ani chuť drůbežího masa. Tímto ošetřením byla zvýšena bezpečnost a prodloužena trvanlivost chlazeného drůbežího masa o několik dní, aniž by byly ovlivněny organoleptické vlastnosti.

Klíčová slova: chlazená drůbež, mikroflóra, kyselina mléčná, sorban draselný

ABSTRACT

The aim of this work was to study skin microflora of retail chicken surface. Literature review looks into the problem of this field, especially it is focused on decontamination treatments of poultry in the Czech Republic and worldwide. Bacterial strains were isolated from the chilled chicken skin and were further characterized by microbiological, biochemical and molecular biology methods. Antimicrobial activity of several organic acids and monoacylglycerols were tested. Few of them were selected for application on chicken skin. Experiments were conducted to decontaminate chilled chicken skin with selected organic acids or monoacylglycerols and the antimicrobial effect on skin microflora was observed. Namely lactic acid, that is a natural compound of meat, was found to be the most effective in reduction of spoilage microorganisms in combination with potassium sorbate. Application of this combination did not influence sensory characteristic of chicken meat and skin. Food safety of chicken meat was increased and its shelf life was prolonged by means of this treatment.

Keywords: chilled chicken, microflora, lactic acid, potassium sorbate

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala za odborné vedení a cenné rady zejména svému školiteli prof. Ing. Milanu Marounkovi, DrSc. a dále svým konzultantkám Ing. Daniele Kramářové, Ph.D. a RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. Děkuji také panu prof. Ing. Pavlu Březinovi, CSc. za věcné připomínky a poskytnutí užitečných materiálů. Mé velké díky patří také panu doc. MUDr. Davidu Šmajsovi, Ph.D. a celému jeho pracovišti (Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita v Brně) a také panu doc. RNDr. Ivo Sedláčkovi, CSc. a celému jeho pracovišti (Česká sbírka mikroorganismů, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita v Brně) za umožnění stáží a možnosti zpracování částí mé disertační práce. V neposlední řadě taktéž děkuji panu doc. Ing. Rahulu Janišovi, CSc. za přípravu a poskytnutí monoacylglycerolů použitých v této práci.

OBSAH

ABSTRAKT	2
ABSTRACT	2
PODĚKOVÁNÍ	3
OBSAH	4
1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	5
1.1. Drůbeží maso	6
1.1.1.Zpracování drůbeže v České republice a související legislativa	6
1.1.2.Spotřeba drůbežího masa v České republice	7
1.1.3.Systém HACCP	8
1.2. Mikroflóra kůže drůbeže	8
1.2.1.Mikroorganismy vyvolávající kažení masa	9
1.2.2.Patogenní mikroorganismy	10
1.2.3.Problém antibiotické rezistence	11
1.2.4.Bakteriociny	14
1.3. Identifikace bakterií	16
1.4. Způsoby snižování kontaminace potravin	16
1.4.1.Kyselina mléčná.....	18
1.4.2.Kyselina sorbová a sorban draselný.....	19
1.4.3.Kyselina citronová	19
1.4.4.Mastné kyseliny a monoacylglyceroly	19
1.4.5.Kombinace chemických aditiv.....	21
2. CÍL PRÁCE	22
3. MATERIÁL A METODY	23
3.1. Mikrobiologická analýza	23
3.1.1.Příprava vzorku	23
3.1.2.Mikrobiální rozbor	23
3.1.3.Izolace, identifikace a uchovávání mikrobiálních kmenů	24
3.1.4.Testování antibiotické rezistence	24
3.1.5.Stanovení biologické aktivity kolicinů kvalitativně	25
3.1.6.Izolace genomové DNA.....	26
3.2. Molekulárně-biologické metody	26
3.2.1.Polymerázová řetězová reakce.....	26
3.2.2.Sekvencování	28
3.2.3.SDS-PAGE.....	28
3.3. Stanovení antimikrobiálních účinků	29
3.4. Aplikace dekontaminačních roztoků	31
3.5. Měření pH kuřecí kůže	32
3.6. Senzorická analýza	32
3.7. Statistická analýza	33

4. VÝSLEDKY A DISKUZE	34
4.1. Mikrobiologická analýza	34
4.1.1. Mikrobiální identifikace.....	34
4.1.2. Rezistence na antibiotika u izolátů <i>E. coli</i>	38
4.1.3. Produkce a typizace bakteriocinů u kmenů <i>E. coli</i>	40
4.1.4. Mikroflóra kuřecí kůže	41
4.1.5. Měření pH kuřecí kůže.....	44
4.2. Antimikrobiální účinky vybraných látek	45
4.2.1. Organické kyseliny a jejich soli.....	45
4.2.2. Mastné kyseliny a jejich monoacylglyceroly	48
4.3. Snižování kontaminace kuřecí kůže	54
4.3.1. Aplikace kyseliny citronové	54
4.3.2. Aplikace kyseliny mléčné	58
4.3.3. Aplikace kyseliny kaprylové	66
4.3.4. Aplikace monoacylglycerolů kyseliny undekanové a undecenové	67
4.4. Senzorická analýza.....	68
PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI	71
ZÁVĚR.....	72
SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	74
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	88
SEZNAM OBRÁZKŮ	90
SEZNAM TABULEK	92
PUBLIKAČNÍ ČINNOST	94
CURRICULUM VITAE.....	97

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V současné době je drůbeží maso jedním z nejvyhledávanějších zdrojů živočišných bílkovin v lidské stravě. Drůbeží maso ve srovnání s masem ostatních jatečných zvířat vykazuje nižší energetickou hodnotu a vyšší obsah hodnotných, lehce stravitelných bílkovin, které obsahují všechny aminokyseliny nepostradatelné v lidské výživě. Nespornou výhodou je také snadná a rychlá kulinární úprava bez vyšších finančních nákladů na vstupní surovinu.

Drůbeží maso však bývá také velmi často zdrojem infekčních onemocnění, zejména gastroenteritid typu salmonelóza či kampylobakterií. Za rok 2007 bylo v České republice hlášeno 18 204 případů salmonelóz, které však mohou pocházet i z jiných potravin, a 24 254 případů kampylobakterií [1], jejichž zdrojem je téměř výhradně drůbeží maso. Zatímco infekce způsobené bakterií rodu *Salmonella* jsou na ústupu, byl zaznamenán narůstající trend počtu kampylobakterií, zřejmě i z důvodu zdokonalení detekce a identifikace bakterie rodu *Campylobacter*. Součástí povrchové mikroflóry drůbežího masa mohou být také další nebezpečné patogenní bakterie, např. *Listeria monocytogenes*, které mohou vyvolat závažná, až smrtelná onemocnění zejména u těhotných žen nebo imunokompromitovaných osob.

Technologické zpracování drůbeže na jatečně upravená těla zahrnuje procesy, které v sobě nesou riziko kontaminace patogenními bakteriemi ze střevního obsahu. V České republice se používá k chlazení kuřat již výhradně vzduch, což snižuje riziko zkřížené kontaminace. Ovšem po zákazu používání antibiotik jako růstových stimulantů, jež současně sloužila jako prevence střevních patogenů u kuřat, se zvyšuje riziko jejich výskytu na kůži zpracovávané drůbeže.

Ve Spojených státech, Kanadě a Austrálii se běžně aplikují dekontaminační techniky na povrch drůbežího masa. Nejběžněji se používají kombinace metod fyzikálních a chemických. Při chemickém ošetření se nejčastěji používají organické kyseliny a jejich soli. V České republice se chemické postupy příliš nevyužívají, přestože aktuální legislativa [2] dává právní základ pro možnost použití těchto metod.

Použití zejména kombinací fyzikálních a chemických zásahů, např. organických kyselin či dalších přírodních antimikrobiálních látek, vede ke snížení mikrobiální četnosti na povrchu masa. To v důsledku snižuje nejen množství přítomných patogenních mikroorganismů a zvyšuje bezpečnost drůbežího masa, ale také zpomaluje rozvoj mikroorganismů způsobujících kažení a tím prodlužuje trvanlivost.

1.1. Drůbeží maso

Podle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 326/2001 Sb. se drůbežím masem rozumí všechny požitelné části těl pocházejících z domácích druhů ptáků, patřících do rodů kur, krocan, perlička, kachna a husa [3]. Pro lidskou výživu se využívá 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. Kůže je požitelná a má vysokou schopnost absorbovat vodu [4]. Kuřecím masem se rozumí maso kura domácího ve stáří nejvýše tří měsíců. Základními složkami drůbežního masa jsou voda (70 - 74 %), bílkoviny (17 - 22 %) a lipidy (2 - 11 %), dále nebílkovinné dusíkaté látky, sacharidy a další organické látky [4]. Složení se liší v závislosti na tom, zda se jedná o svalovinu prsní či stehenní, s kůží či bez kůže. Z nutričního hlediska se jedná o maso velmi cenné, jelikož je zdrojem plnohodnotných bílkovin, vitaminů (niacin, riboflavin, thiamin), nenasycených mastných kyselin a minerálních látek (K, P, Na) [5].

1.1.1. Zpracování drůbeže v České republice a související legislativa

System zpracování drůbeže v ČR je založen na moderních technologiích s minimálním využitím lidské práce. Zpracovatelské podniky jsou modernizované tak, aby byly splněny vysoké požadavky na hygienu výroby a bezpečnost výrobků. Ke zvýšení bezpečnosti potravin vydalo ES celou řadu právních předpisů. Jedná se zejména o nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002/ES [6], které mimo jiné ukládá provozovatelům potravinářských provozů zavést systém a postupy pro identifikaci vstupních surovin a dodávek výrobků. Také nové předpisy o hygieně potravin tzv. „hygienický balíček“, kam patří nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004/ES, 853/2004/ES a k úřední kontrole potravin č. 854/2004/ES, 882/2004/ES [2; 7-9], stanoví specifická pravidla organizace úředních kontrol, upravují i jejich financování, postupy a zásady odpovědnosti provozovatelů potravinářských podniků za bezpečnost potravin v celém potravinovém řetězci.

Podrobné požadavky na hygienu provozu, tepelný režim surovin a podmínky zpracování drůbežního masa upravuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004. Po vykuchání musí být poražená drůbež očištěna a co nejdříve zchlazena na teplotu 4 °C. Provozovatelé musí zajistit řádnou prohlídku poražených kusů v průběhu post-mortem. Během bourání, vykostování, vyřezávání, krájení na plátky nebo kostky, prvního balení a balení musí být udržována teplota masa nejvýše 4 °C, a to pomocí okolní teploty nejvýše 12 °C nebo jiným systémem s rovnocenným účinkem. Teplota 4 °C u masa a 3 °C u drobů musí být dodržena během zpracování, skladování i přepravy. Evropská unie stanovuje mikrobiologická kritéria pro potraviny v Nařízení Komise (ES)

2073/2005 v platném znění Nařízení Komise (ES) 1441/2007 [10; 11]. U drůbežního masa se sleduje pouze nepřítomnost bakterie *Salmonella*.

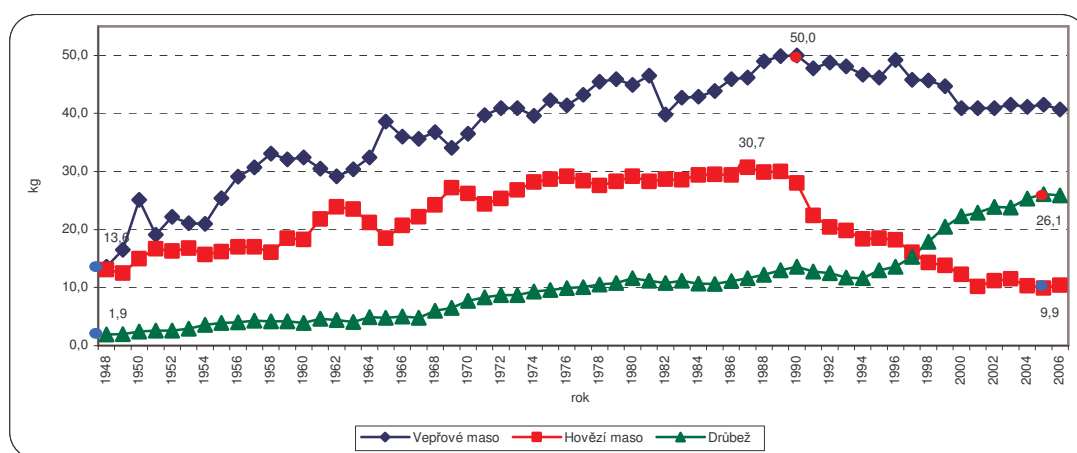
Důležitým faktorem bezpečnosti výroby je chlazení - veškerá produkce ČR je chlazená vzduchem v chladících tunelech i přes to, že legislativa EU dosud povoluje i chlazení vodou. Chlazení vzduchem je daleko progresivnější způsob chlazení a představuje vyšší hygienický standard výroby a ve svém důsledku i vyšší kvalitu drůbežního masa a drůbežích masných výrobků.

V rámci legislativy České republiky upravuje požadavky na zdravotní nezávadnost potravin zákon 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů v platném znění [12]. Podmínky použití přídatných látek při ošetření potravin uvádí Vyhláška 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin [13].

Jelikož byl v mnohých studiích prokázán vztah mezi používáním antibiotik k podpoře růstu hospodářských zvířat a zvyšováním antibiotické rezistence u humánních bakteriálních izolátů, platí od 1. 1. 2006 v Evropské unii zákaz používání antibiotik jako růstových stimulátorů [14].

1.1.2. Spotřeba drůbežního masa v České republice

Současná spotřeba drůbežního masa v ČR (26,1 kg/obyvatele/rok 2005) je nad hranicí průměrné spotřeby v EU (cca 23 kg/obyvatele/rok) a nepředpokládá se, že by se měla v budoucnu výrazně měnit [15]. Navíc právě v roce 2005 dosáhla spotřeba drůbežního masa u nás maxima, a to retrospektivně za období 1948 - 2006. Z grafu (*Obr. 1*) vyplývá, že jistý zlom nastal v roce 1997, kdy hodnota spotřeby drůbežního masa převýšila spotřebu hovězího a tento trend pokračuje do současnosti.



Obr. 1. Spotřeba vepřového, hovězího a drůbežního masa v ČR v letech 1948 - 2006 (kg/obyvatel/rok). Jsou vyznačena minima a maxima spotřeby masa ve sledovaném časovém úseku [16].

K růstu spotřeby drůbežního masa přispívá především rozšiřující se nabídka dělené drůbeže, drůbežích polotovarů a drůbežích masných výrobků. Drůbeží maso si získává svou oblibu také pro relativně snadnou a rychlou kulinářskou úpravu a pro svou příznivou cenu ve srovnání s ostatními druhy mas. Velkou výhodou drůbežního masa je jeho nízká energetická hodnota, a proto je drůbeží maso vhodnou potravinou při uplatňování zásad racionální výživy.

1.1.3. Systém HACCP

HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) je vědecky založený organizovaný systém, který identifikuje specifická rizika a opatření pro jejich kontrolu/řízení tak, aby se zajistila bezpečnost/zdravotní nezávadnost potravin. HACCP je nástrojem k vyhodnocení rizik a stanovení kontrolních systémů, které se zaměřují více na prevenci než na testování konečného produktu. HACCP lze uplatnit v celém potravinovém řetězci od primární produkce (prvovýroby) po konečnou spotřebu. Jeho implementaci lze ovlivňovat vědeckým prokazováním rizik na lidské zdraví. Zvyšování bezpečnosti potravin a realizace HACCP mohou rovněž poskytovat významné výhody. Aplikace HACCP může například pomoci při revizi prováděné kontrolními orgány a při podpoře mezinárodního obchodu zvýšením důvěry ve zdravotní nezávadnost potravin. Účelem HACCP je zaměřit se na sledování kritických kontrolních bodů, měla by se aplikovat u každé specifické operace zvlášť. HACCP aplikace by se měla posuzovat a nezbytné změny flexibilně provádět při každé změně výrobku, procesu nebo určitého kroku [7]. Hlavními kontrolními body při chovu a zpracování drůbeže jsou: vlastní chov na farmě, paření a škubání peří, kuchání [17]. V USA jsou postupně do HACCP zaváděny cílené dekontaminace syrového masa zejména organickými kyselinami v koncentraci 1-3 %. Evropská unie zastává názor, že dodržování hygienických pravidel při zpracování masa je dostatečné k udržení bezpečnosti potravin, a není proto nutné zavádět nové postupy [18].

1.2. Mikroflóra kůže drůbeže

Kůže chlazené drůbeže má ideální podmínky pro růst širokého spektra mikroorganismů psychrofilních, mezofilních i termofilních. Mikroflóra chlazené drůbeže se nejčastěji skládá ze zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*, dále rodů *Campylobacter*, *Arcobacter* [19], *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium* [20]. V literatuře byl na drůbeži dále popsán výskyt těchto bakteriálních rodů - *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Aeromonas*, druhy *Shewanella putrefaciens*, *Brochothrix thermosphacta*, *Listeria monocytogenes*, bakterie z čeledi *Micrococcaceae* a bakterie mléčného kvašení rodů *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Weissella*. Nejčastěji je zaznamenáván výskyt bakterií saprofytických - gramnegativní oxidáza-pozitivní

tyčinky (*Pseudomonas*) a grampozitivní kataláza-pozitivní koky (*Micrococcus*). Taktéž mohou být přítomny kvasinky (*Cryptococcus*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*) [21].

Mikroflóra drůbežního povrchu se skládá z kontaminace:

- primární - mikroorganismy jsou přítomny již na zvířeti před jeho porážkou a při vhodných podmínkách se mohou následně v potravině pomnožit;
- sekundární - ke kontaminaci potravin dochází až v průběhu vlastního výrobního procesu, a to zejména z prostředí, z rukou pracovníků, ze strojů a zařízení [20].

S výjimkou fermentace tepelně neopracovaných a trvanlivých masných výrobků, kde jsou aktivity vybraných mikroorganismů nezbytné pro řádný průběh zrání, jsou bakterie v mase (včetně povrchu masa) a masných produktech obecně nežádoucí. Podle jejich schopnosti zkrátit trvanlivost masa nebo vyvolat u člověka zdravotní poruchy, rozlišujeme dvě základní skupiny nežádoucích mikroorganismů. Jedná se o mikroby vyvolávající kažení masa a mikroby patogenní.

1.2.1. Mikroorganismy vyvolávající kažení masa

K autolýze se dříve či později po porážení zvířete připojují rozkladné děje katalyzované mikrobiálními enzymy kontaminující mikroflóry. Soubor reakcí katalyzovaných exogenními mikrobiálními enzymy označujeme jako proteolýzu nebo také kažení či hnití masa. Mikrobiální kažení masa se uskutečňuje převážně od povrchu dovnitř, přičemž u chlazené drůbeže je navenek manifestováno zapařením, osliznutím povrchu, tvorbou barevných skvrn (pigmentující bakterie) a nepříjemným zápachem. Na zápachu se podílejí hlavně konečné degradační produkty bílkovin: amoniak, aminy, merkaptany, sirovodík a další. Povrchové osliznutí masa nastává masivním pomnožením obecné mikroflóry na jeho povrchu. Počty bakterií mohou dosahovat denzity až $10^7 - 10^8$ CFU/cm² [22]. Rychlost procesu kažení masa závisí na počtu a druhu mikroorganismů přítomných na mase, na jejich schopnosti růstu, dále pak na podmínkách skladování masa (teplota, složení atmosféry) a na vlastnostech masa (hodnota pH, hodnota a_w – aktivita vody) [20].

Původci kažení chlazené drůbeže uložené v podmínkách normální atmosféry se skládají především z gramnegativních psychrotrofních bakterií rodů *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* a *Moraxella* [20, 23]. Druhy rodu *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi*) jsou hlavní příčinou kažení při teplotách - 2 až 5 °C. Pokud skladovací teplota přesáhne 5 °C, do kažení se zapojuje více rozmanitých bakteriálních druhů [20]. V případě potlačení aerobní mikroflóry způsobující kažení masa se dominantní složkou stávají bakterie mléčného kvašení [24].

Součástí mikroflóry jsou také kvasinky. Kvasinky rodu *Saccharomyces* se sice na drůbežím mase vyskytují, ale nejsou podstatnou měrou odpovědné

za kažení. Permanentní součástí povrchové mikroflóry drůbeže jsou proteolytické a lipolytické kvasinky rodů *Candida* [21], *Yarrowia* [20], *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium* a *Debaryomyces* [25].

1.2.2. Patogenní mikroorganismy

Intenzivní pozornost je v potravinářství věnována mikroorganismům, které vyvolávají alimentární onemocnění lidí. Závažné riziko představuje výskyt potenciálně patogenních mikroorganismů v prostředí a schopnost přežít v nepříznivých podmínkách. Řada patogenních mikroorganismů se vyskytuje v zažívacím traktu zvířat i lidí. Výkaly jsou pak rozšiřovány do prostředí, vody, prachu a na rostliny. Je zřejmé, že je obtížné zabránit proniknutí patogenních mikroorganismů do potravin. Nejčastější příčinou alimentárního onemocnění jsou drůbež, vejce, maso a masné výrobky.

Patogenními bakteriemi nejčastěji se vyskytujícími u drůbeže jsou *Salmonella* a *Campylobacter jejuni*, dále byly izolovány bakterie *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* [20]. Salmonely bývají přítomny jak ve střevech drůbeže, tak i na kůži. Jejich počty, sérotypy i výskyt se silně různí [26]. Ve Spojených státech onemocní každoročně více než 1,4 milionu osob salmonelózou [27]. V České republice bylo v roce 2008 prokázáno 11 009 případů salmonelózy, počet nálezů však v posledních letech klesá [1]. V Portugalsku byla v roce 1999 zjištěna 60% incidence bakterie *Salmonella* na vzorcích chlazené drůbeže [28].

Escherichia coli je gramnegativní tyčinkovitá bakterie, která je taxonomicky řazena do čeledi *Enterobacteriaceae*, stejně jako *Salmonella*. Rod *Escherichia* má ještě další druhy – *E. albertii*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. senegalensis* a *E. vulneris* [29]. *E. coli* je běžnou součástí střevní mikroflóry zdravých lidí. Je komenzálem, částečně saprofytem a také symbiontem, neboť svým působením jednak znemožňuje průnik patogenů (např. produkce bakteriocinů), jednak je makroorganismu prospěšná i přímo – podílí se na tvorbě vitamínů, zejména vitamínu K. Na druhou stranu se jedná o podmíněně patogenní bakterii, která může způsobovat i závažná onemocnění. V zažívacím traktu se určité kmeny *E. coli* uplatňují jako patogeny pouze v případě přítomnosti specifické výbavy faktorů virulence, podle kterých se skupiny těchto tzv. enteropatogenních kmenů označují jako:

- enteropatogenní v užším slova smyslu (EPEC);
- enterotoxigenní (ETEC);
- enteroagregativní (EAEC);
- enteroinvazivní (EIEC).

Tyto kmeny vyvolávají nebezpečné novorozenecké průjmy, průjmy u dospělých, hemoragickou kolitidu, někdy se závažnou komplikací –

hemolyticko-uremickým syndromem (HUS). Zdrojem těchto vážných infekcí je nejčastěji nedostatečně tepelně opracované hovězí maso a nepasterizované mléko infikované enterohemoragickým kmenem *E. coli* (EHEC) [30-32]. Verotoxigenní *E. coli* O157 byla v České republice prokázána např. v mechanicky odděleném drůbežím mase [33]. Mimo střevo je *E. coli* téměř vždy patogenní [34]. Extraintestinální infekce jsou způsobeny třemi odlišnými patotypy – uropatogenními kmeny (UPEC), kmeny způsobujícími neonatální meningitidu (MENEC) a kmeny způsobujícími septikémii u lidí i zvířat [35; 36]. Některé *E. coli* kolonizující ptačí gastrointestinální trakt mohou u ptáků způsobovat závažná onemocnění (perikarditis, perihepatitis, salpingitis, septikémie), která nejčastěji začínají infekcí dýchacího ústrojí po inhalaci infikovaného prachu [37]. Nazývají se aviární patogenní *E. coli* (APEC).

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* (dále jen *S. aureus*) je grampozitivní bakterie, která se vyskytuje v zevním prostředí jen v okolí člověka a teplokrevných zvířat. Člověk je od narození kolonizován stafylokoky, nejvíce na kůži rukou, perinei, kštic a na sliznici dýchacího a zažívacího traktu. Běžně se nachází v horních cestách dýchacích u 20 – 50 % zdravých lidí, aniž způsobuje onemocnění [38]. Za určitých okolností, zvláště při poškození kůže, může vzniknout infekce. Nejnáchylnější jsou oslabení pacienti po operaci či jinak imunokompromitované osoby. *S. aureus* se řadí mezi biochemicky nejaktivnější bakteriální druhy, s bohatou produkcí nejen různých hemolyzinů, enterotoxinů či dalších extracelulárních enzymů [38]. Z potravinářského hlediska je nejvýznamnější produkce termostabilních enterotoxinů při pomnožení toxigenního kmene *S. aureus* v potravinách typu sekané, bramborového salátu, krémových zákusků či zmrzliny [34]. Příznaky intoxikace, jako jsou odpor k jídlu, zvracení, průjem a svalové křeče, se dostavují již 1 - 6 hodin po požití kontaminované potraviny. Uzdravení nastupuje i bez léčení do 24 hodin, jen vzácně je fatální u nejmenších dětí a velmi starých osob [38].

1.2.3. Problém antibiotické rezistence

Antibiotikum je substance biologického, semisyntetického nebo syntetického původu, která vykazuje selektivní toxicitu proti bakteriím, a je tedy potenciálně použitelná k léčbě infekcí. Rezistence na antibiotika je schopnost bakteriální populace přežít účinek inhibiční koncentrace příslušného antimikrobního preparátu. Rezistence může v podstatě vzniknout dvěma způsoby – fenotypickou adaptací a genetickými změnami [39]. Fenotypická adaptace je přizpůsobivost bakterií na změněné metabolické pochody. Jedná se o změny částečné a přechodné. Vznik takové rezistence je relativně nevýznamný. Genetická podstata bývá vysvětlována buď modifikací genu na chromozomu, nebo převzetím genetického materiálu od rezistentních buněk. Geny rezistence získávají bakterie vertikálně (přenos z mateřské buňky na dceřinou) nebo horizontálně (od jiných bakteriálních buněk v ekosystému). Přenos genů

rezistence mezi bakteriálními buňkami se uskutečňuje plazmidy, bakteriofágy nebo bakteriálními transpozony (nereplikovatelné Tn-elementy, které se integrují do chromozomu nebo plazmidu). Transpozony jsou zřejmě nejvýznamnějším faktorem šíření rezistence k antibiotikům [40]. Šíření rezistence se uskutečňuje zejména rezistentními původci zoonóz (*Salmonella* sp., *E. coli* O157, *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp.), případně rezistentními komenzálními kmeny (*E. coli*, *Enterococcus* spp.) [41].

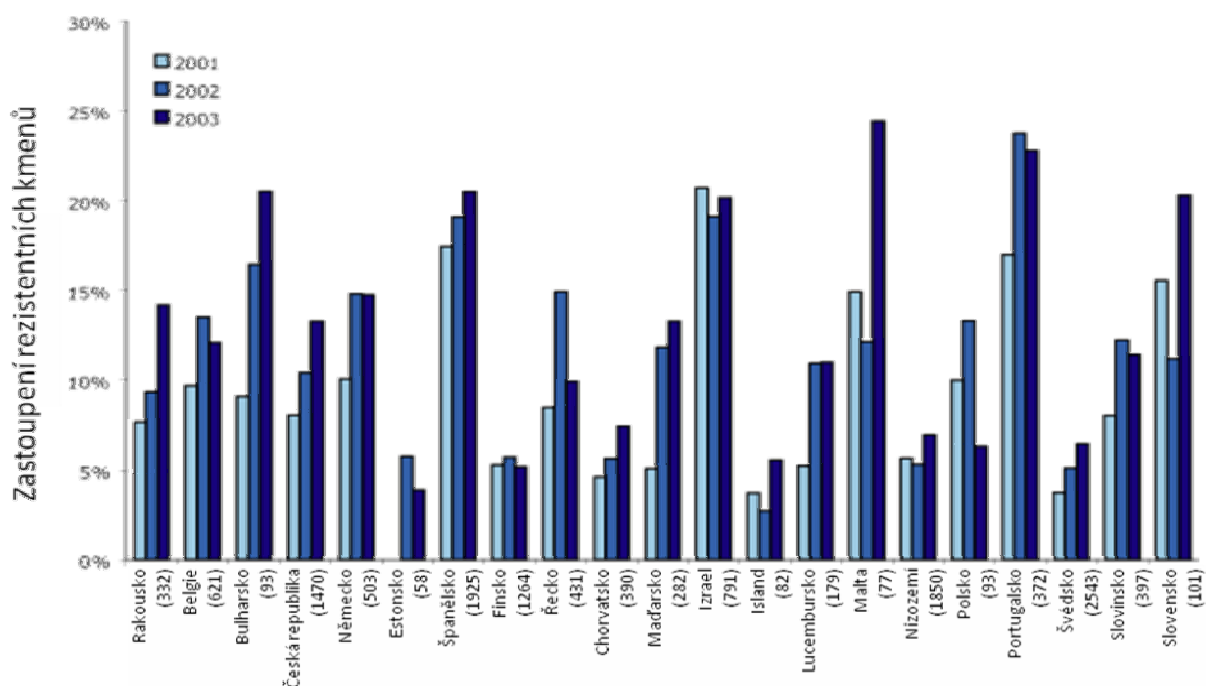
Antibiotická rezistence zvyšuje více než dvojnásobně morbiditu, podstatně prodlužuje hospitalizaci a způsobuje významný vzestup nákladů na zdravotní péči. Vzrůstajícím problémem je rozšiřování antibiotické rezistence u drůbežích patogenních kmenů, zvláště nebezpečné jsou multirezistentní kmeny. Byla prokázána souvislost mezi používáním antibiotik a vznikem rezistence nejen u lidí, ale také u zvířat. Velký význam má sledování výskytu antibiotické rezistence nejen u humánních izolátů, ale také u patogenních a komenzálních izolátů zvířecího původu jako původců infekcí, zoonóz a jako indikátorových mikroorganismů (nepatogenní bakterie tvořící součást běžné mikroflóry). Sledování by se mělo zaměřovat na stafylokoky, enterokoky, kampylobaktery a enterobakterie. V roce 2000 bylo v rámci 27 000 klinických izolátů nalezeno 40 % rezistentních kmenů *Salmonella*, z toho bylo 18 % multirezistentních [42]. Rezistence kampylobakterů je taktéž na vzestupu, zvláště vůči fluorochinolonům [43].

Fluorochinolony jsou klasifikovány do čtyř generací: první generace (např. kyselina nalidixová, kyselina oxolinová, enoxacin), druhá generace (např. norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, pefloxacin), třetí generace (např. levofloxacin, gatifloxacin, sparfloxacin), čtvrtá generace (např. trovafloxacin, moxifloxacin). Mechanismus účinku fluorochinolonů je inhibice DNA gyrázy. Mají široké antibakteriální spektrum zahrnující grampozitivní i gramnegativní bakterie, avšak lékem první volby jsou pouze pro infekce vyvolané salmonelami, shigelami, legionelami, kampylobaktery a *Bartonella henselae*. Fluorochinolony jsou rezervní antibiotika a jejich nadměrná a neindikovaná preskripce vede k rychlému rozvoji rezistence. Rezistence k chinolonům je většinou spojena s mutací na chromozomu v oblasti QRDR (z angl. Quinolone Resistance-Determining Region). Byly popsány bodové mutace v genech *gyrA*, *gyrB* (DNA gyráza) či genech *parC*, *parE* (topoizomeráza IV). Dále existují plazmidově kódované geny pro Qnr proteiny, které chrání DNA gyrázu před chinolony. V případě plazmidově kódované rezistence vyvstává nebezpečí horizontálního přenosu *qnr* genů [44].

Jako jedna z mála enterobakterií není *E. coli* primárně rezistentní k ampicilinu, přesto však počet rezistentních kmenů stoupá. Lepší je účinnost chráněných penicilinů, fluorovaných chinolonů a ko-trimoxazolu, u močových infekcí se dobře uplatní i chinolony a nitrofurantoin [34]. V roce 2000 byl

v USA zjištěn u 40 % kuřecích produktů z obchodní sítě výskyt kmenů *E. coli* rezistentních ke kyselině nalidixové [45]. V roce 2002 byla v ČR mezi 128 kmeny *E. coli* izolovanými z drůbeže nalezena následující procentuální antibiotická rezistence: 97 % (tetracyklin), 51 % (ampicilin), 31 % (piperacilin), 14 % (trimetoprim/sulfametoxazol), 10 % (ciprofloxacin), 10 % (ofloxacin), výskyt rezistence k dalším testovaným antibiotikům byly menší než 8 % nebo se nevyskytovaly vůbec [46].

Ačkoli se z **Obr. 2** může zdát, že do roku 2003 měl výskyt izolátů *E. coli* rezistentních k fluorochinolonům u některých států klesající tendenci (Belgie, Estonsko, Izrael, Řecko), v současnosti to již pravda není, a ve všech uvedených státech se výskyt zvyšuje. Z údajů EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) za rok 2007 je možno dále zjistit, že u některých států dosahuje výskyt rezistentních kmenů dokonce 30 % (Bulharsko, Izrael, Malta, Německo, Portugalsko, Španělsko) [47]. Pro Českou republiku platí pro rok 2007 tyto údaje: rezistence k fluorochinolonům (24,1 %), rezistence k aminopenicilinům (55,8 %), rezistence a aminoglykosidům (7,2 %) [47].



Obr. 2. Přehled izolátů *Escherichia coli* rezistentních k fluorochinolonům v letech 2000-2003 [48, upraveno]. V závorce je u každého státu uveden průměrný počet sledovaných kmenů.

Velkým problémem současnosti je také zvýšení výskytu rezistentních kmenů *S. aureus*. Ačkoli penicilin byl objeven podle účinku na *S. aureus*, je dnes přes 90 % kmenů k penicilinu rezistentních. Většina kmenů je však stále citlivá k semisyntetickým penicilinům (oxacilin, meticilin, cloxacilin). Jejich molekula byla upravena tak, aby bránila přístupu stafylokokové β -laktamázy narušující

strukturu klasických penicilinů. Avšak záhy po zahájení terapie polosyntetickými peniciliny se však objevily kmeny k nim rezistentní – jsou označovány MRSA (z angl. Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus*). MRSA jsou od samého počátku rezistentní vůči všem β -laktamům, včetně cefalosporinů, karbapenemů a monobaktamů. Obvykle se stávají dále rezistentní vůči makrolidům, aminoglykosidům, tetracyklinům, chloramfenikolu, rifampicinu a fluorochinolonům [34]. Výskyt MRSA v nozokomiálních invazivních infekcích je od roku 2000 sledován celoevropským systémem EARSS [49]. V zemích Evropy je frekvence výskytu invazivních kmenů MRSA velmi rozdílná. Jsou země s dlouhodobě nízkým výskytem, ke kterým se kromě všech skandinávských zemí řadí ještě Nizozemí a Estonsko. Naopak v zemích jako Kypr, Malta, Portugalsko či Řecko tvoří kmeny MRSA zhruba polovinu všech klinických izolátů *S. aureus*. V České republice vzrostl výskyt izolátů MRSA z 4,3 % v roce 2000 na 12,9 % v roce 2007 [47]. Pro potvrzení, zda se jedná o kmeny MRSA se provádí konfirmační testy např. PCR na detekci genu *mecA* [50] nebo detekce PBP2a aglutinací s monoklonálními protilátkami [51].

Některé kmeny mohou vykazovat částečnou rezistenci na vankomycin, tyto jsou označovány jako VISA (Vankomycin Intermediate-resistant *Staphylococcus aureus*). Tento typ rezistence získaly zřejmě od enterokoků. V roce 2002 byly v USA izolovány kmeny MRSA, které byly současně vysoce rezistentní k vankomycinu [52]. Jsou označovány jako VRSA (Vankomycin Resistant *Staphylococcus aureus*) – tyto polyrezistentní kmeny jsou v současnosti největší hrozbou, v případě jejich rozšíření dosud neexistuje účinná antibiotická terapie [34]. Podle EARSS byl výskyt VRSA v letech 2000 - 2008 v zemích Evropy zaznamenán výjimečně (Izrael 2005, Litva 2006, Německo 2004, Rakousko 2006 a 2008, Turecko 2004) [47]. Jednalo se pouze o ojedinělé případy. Účinná prevence vzniku a šíření MRSA vyžaduje omezení indikací antibiotické léčby na nezbytné situace a eliminaci nadužívání antibiotik v léčbě i profylaxi.

1.2.4. Bakteriociny

Bakteriociny jsou látky s antibakteriálním účinkem proteinové povahy. Koliciny jsou toxické exoproteiny produkované bakteriemi *Escherichia coli* či příbuznými rody s účinkem vůči blízkce příbuzným kmenům [53]. V rámci rodu *Escherichia* byla kromě *E. coli* produkce kolicinů prokázána pouze u druhu *E. fergusonii*, a to v mnohem nižší incidenci [54]. Účinek je zprostředkován specifickými receptory vnější membrány buněčné stěny, které primárně slouží nějakému fyziologickému účelu – nejčastěji transportu nezbytných látek, např. vitamínu B₁₂. Spolu s mikrociny, což jsou bakteriociny s velikostí do 10 kDa, je známo více než 30 různých typů kolicinů. Kolicinogenní kmeny tvoří nezanedbatelnou součást přírodních izolátů *E. coli*. Mezi více než 1000 humánními izoláty byla nalezena 41,4% incidence kolicinogenie [55].

Geny pro koliciny jsou většinou kódovány na tzv. Col-plazmidech, avšak existují i výjimky – např. chromozomálně kódovaný bakteriocin 28b [56], který je však produkován bakterií *Serratia marcescens*. Kolicinový operon se skládá obvykle ze tří genů: gen pro kolicin, gen pro imunitní protein, gen pro lytický protein. Kolicinový operon je řízen promotorem, který je SOS-inducibilní, např. UV-zářením či mitomycinem C. Podle typu letálního účinku kolicinové molekuly rozlišujeme skupinu kolicinů depolarizujících plazmatickou membránu (koliciny A, B, E1, Ia, Ib, K, N, S4, U, Y, 5, 10), koliciny s DNA endonukleázovou aktivitou (E2, E7, E8, E9), koliciny blokující proteosyntézu (koliciny D, E3, E4, E5, E6) a koliciny inhibující či degradující stěnový peptidoglykan (kolicin M) [57].

Mikrociny jsou antibakteriální peptidy, jejichž geny jsou nesené na plazmidech [58] nebo chromozomálně [59]. Jejich produkce je indukována za stresových podmínek, zejména při nedostatku živin (uhlík, dusík, železo, fosfát). Rozdělují se v závislosti na velikosti a na posttranslačních modifikacích mikrocinového peptidu na dvě skupiny – nemodifikované (MccE492, MccL, MccV, MccH47, Mcc24) a modifikované (MccB17, MccC7, MccJ25, MccD93) mikrociny [60].

Dlouhá léta se již hledá nejvhodnější využití pro fenomén kolicinogenie. V různé míře jsou studovány a aplikovány postupy při studiu buněčné biologie např. protein-proteinových interakcí [61], využití v biotechnologii pro expresi heterologních proteinů [62], využití kolicinogenních kmenů jako probiotik [63] či dokonce využití v boji proti rakovinným buňkám [64]. V nedávné době se objevila práce [65], která dává naději pro využití kolicinů při ochraně potravin vůči patogenům. Patton v ní dokazuje signifikantní účinek kolicinu E1 vůči patogenní bakterii *Listeria monocytogenes* v potravinách určených k přímé spotřebě. Velmi řídké jsou literární zdroje týkající se sledování výskytu kolicinogenie u izolátů z potravin. Téměř žádná literatura se nezabývá typizací kolicinů a mikrocinů u produkčních kmenů. Z tohoto hlediska by jistě bylo zajímavé zjistit, jak častý je výskyt produkce a jakých typů kolicinů či mikrocinů u kmenů *E. coli* izolovaných z chlazené drůbeže. Většina dostupné literatury se zabývá humánními izoláty buď zdravých osob, nebo osob trpících gastrointestinálními poruchami. Gordon *et al.* [66] uvádí 38% výskyt izolátů produkujících aspoň jeden kolicin či mikrocin mezi 266 kmeny izolovanými od osob žijících v Austrálii. Nejčastěji nalezenými typy dle procentuálního výskytu byly: mikrocin H47, mikrocin M, kolicin Ia, kolicin E1, mikrocin V, kolicin M a kolicin E7. Další sledované bakteriociny se vyskytovaly již v množství menším než 2 % [66].

1.3. Identifikace bakterií

Taxonomii prokaryot lze obecně definovat jako vědecké studium mikroorganismů s konečným cílem charakterizovat tyto mikroorganismy a zařadit je do taxonů. Hlavní funkcí taxonomie je identifikovat a popisovat základní taxonomické jednotky (druhy). Identifikace je proces prokazující příslušnost nového izolátu do jednoho z již ustanovených a pojmenovaných taxonů. Bakteriální identifikace a veškeré typizační postupy (biochemické, fyziologické, sérologické atd.) jsou ve skutečnosti taxonomickými klasifikacemi na úrovni druhu či poddruhu. Klasifikační hlediska taxonomie slouží k umístění mikroorganismu do hierarchicky uspořádaných skupin tak, že nový izolát může být mnohem snadněji charakterizován porovnáním se známými organismy. Sekvenční analýza 16S rDNA je klíčová pro stanovení fylogenetického postavení jakýchkoli prokaryot. Hodnota podobnosti 97 % a vyšší při sekvenční analýze je udávána jako hraniční pro zástupce stejného druhu. Stanovení pouze částečné sekvence je použitelné pro identifikaci mikroorganismů nebo pro jejich zařazení do dobře ustanovených fylogenetických skupin [29]. Tato analýza byla s úspěchem aplikována na identifikaci kmenů *Escherichia coli* ve vodě [67] nebo pro přesnou a rychlou identifikaci patogena *Enterobacter sakazakii* [68].

Rozvoj molekulárně biologických technik umožnil vznik metod molekulární typizace, které jsou založeny na vlastnostech molekul produkovaných bakteriemi a jsou proto univerzálně aplikovatelné. Typizační techniky mohou být na základě typu cílové makromolekuly rozděleny do tří skupin:

- metody založené na studiu lipopolysacharidů a mastných kyselin;
- metoda založená na analýze složení proteinů buněčné stěny a vnější membrány pomocí SDS-PAGE, která je užitečná pro subtypizaci bakterií, většinou gramnegativních;
- metody založené na studiu nukleových kyselin (DNA sekvencování, restrikční analýza chromozomální DNA nebo plazmidů, ribotypizace, pulzní gelová elektroforéza, polymerázová řetězová reakce – PCR) [29].

1.4. Způsoby snižování kontaminace potravin

Údržnost potravin a jejich bezpečnost se dá zajistit různými způsoby. Buď se zcela zamezí přístupu mikroorganismů, nebo jsou mikroorganismy z potravin cíleně odstraňovány či usmrčovány. K těmto cílům lze využít řadu klasických či moderních metod. Zamezení přístupu mikroorganismů k potravíně je možno kromě dodržování základní hygieny ve výrobním procesu zabezpečit zejména obalovou technikou, která se v posledních letech neustále zdokonaluje. Navíc při balení lze využít modifikovanou atmosféru s upraveným obsahem plynu (CO₂) k zabezpečení podmínek nevhodných pro růst mikroorganismů. Jiný princip využívají postupy ošetření potravin založené na fyzikálních, chemických či biologických metodách. Nejčastěji se však využívá kombinací těchto metod

v různém sledu během zpracování potravinářských surovin a výroby potravin [69].

Celý proces průchodu masa od příjmu až po vstup na trh lze charakterizovat jako snahu zamezit přístupu mikroorganismů do potraviny, zpomalit jejich množení, omezit jejich metabolismus či je vhodným zákrokem likvidovat. Nikdy se nedosáhne sterilní potraviny, ale jen potraviny, která je více či méně kontaminovaná. Důležité je především dosáhnout takového stavu, aby se při dané mikrobiální četnosti, složení mikroflóry, podmínkách a předpokládané době skladování masa nemohla přítomná mikroflóra pomnožit takovým způsobem, aby došlo ke zkáze potraviny, zhoršení jejich organoleptických vlastností či porušení zdravotní nezávadnosti. Potraviny nesmějí obsahovat mikroorganismy nebo jejich toxiny či metabolity v množstvích, která představují nepřijatelné riziko pro lidské zdraví, a potravina nesmí být uvedena na trh, není-li bezpečná [10].

Ačkoli platná legislativa Evropské unie dosud povoluje k ošetření masa pouze pitnou vodu, soustavný nárůst počtu alimentárních chorob nejen v České republice, ale i celosvětově spolu s obchodními požadavky na bezpečnost, vysokou kvalitu a zejména prodloužení údržnosti masa obrací v současné době pozornost k dekontaminačním systémům. Naproti tomu ve Spojených státech a Austrálii je používání např. roztoků organických kyselin při ošetření masa povoleno již řadu let. Navíc zákaz používání antibiotik jako růstových stimulantů od ledna 2006 v České republice [14] snížil prevenci proti střevním patogenům u brojlerů a zvýšil tak riziko kontaminace kuřecího povrchu nebezpečnými bakteriemi.

Pro omezení počtu mikroorganismů na povrchu jatečných kusů se používají fyzikální a chemické metody nebo jejich kombinace. Při dekontaminaci pomocí fyzikálních metod se využívá například páry, a to u hovězího dobytka [70], skotu a prasat [71], a také u drůbeže [72], dále ionizující záření [73], mikrovlnné a UV záření, vysoký tlak [74], ultrazvuk nebo vysoceintenzivní pulzní elektrické pole (Pulsed Electric Field - PEF) [75]. PEF znamená technologii využívající elektrické pole o síle 10 - 50 kV/cm aplikované v pulsech trvajících 1 - 30 ms, mezi elektrodami obvykle vzdálenými 3-5 mm. Celková doba ošetření je kratší než 1 s [76].

K chemické dekontaminaci se doposud používají zejména organické kyseliny [18, 71], fosforečnan sodný (TSP), sloučeniny chloru (ClO_2 , NaClO_2) nebo proteiny biologického původu s antimikrobiálními účinky (nizin, lysozym, subtilin) [77].

Nejrozšířenějším konzervačním zákrokem je snížení pH povrchových vrstev masa postříkem organickými kyselinami: mléčnou [70; 71; 78], citronovou [79, 80], octovou [81], jantarovou a vinnou. Antimikrobiální účinky byly také prokázány u vyšších mastných kyselin – např. kyseliny olejové [82] či kaprylové

[83]. Účinek organických kyselin s krátkým řetězcem je ovlivněn mnoha faktory - délkou uhlíkového řetězce, mírou disociace kyseliny a různou citlivostí odlišných mikroorganismů. Avšak nejdůležitější faktor je pH prostředí. Kyselina, která sníží pH potraviny, prodlouží lag fázi citlivých bakterií a nakonec způsobí jejich odumření [17]. Optimální inhibiční efekt mají organické kyseliny při nízkých hodnotách pH, které podporují nedisociovaný stav molekuly. V tomto případě molekula volně proniká přes plazmatickou membránu a je schopna vstupu do buňky. Následně v důsledku styku s vyšší hodnotou pH uvnitř buňky molekula disociuje. Uvolněné ionty H^+ bakterie vytlačuje protonovou pumpou z cytosolu ven za spotřeby energie, tím se její energetické rezervy vyčerpávají a hyne. Inhibice bakteriálního růstu způsobená účinkem organických kyselin je tudíž způsobena potlačením základních metabolických reakcí, zátěží na intracelulární homeostázu pH a akumulací toxických aniontů [84].

Na základě řady experimentů se ukazuje, že je vhodné ošetřit povrch masa krátce poté, kdy byl kontaminován a příslušná mikroflóra je dosud soustředěna na povrchu [85]. Výhodou kyselých dekontaminačních roztoků je prodloužený antimikrobiální účinek, který zaručuje prodloužení údržnosti masa [75]. Používané koncentrace organických kyselin (1 - 3 %) jsou obecně velmi účinné vůči patogenním bakteriím jako *Campylobacter jejuni* či *Yersinia enterocolitica* a mírně účinné proti salmonelám. *Listeria monocytogenes* a patogenní kmeny *Escherichia coli* jsou vůči kyselému ošetření relativně odolné [17]. Tyto používané koncentrace organických kyselin nemají zásadní vliv na sensorické vlastnosti masa [18]. Ihned po aplikaci mohou způsobit mírné zesvětlení barvy masa, které se ovšem po nějakém čase vrací do normálu [17].

1.4.1. Kyselina mléčná

Povrchové ošetření kyselinou mléčnou má oproti jiným kyselinám tu výhodu, že tato kyselina je přirozenou složkou masa. Kyselina mléčná (samostatně, či ve směsi s jinými organickými kyselinami nebo dalšími složkami) snižuje pH a působí baktericidně. V kombinaci se sorbanem draselným působí inhibičně na různé skupiny bakterií na povrchu drůbežího masa [86].

Kyselinu mléčnou je možné aplikovat na různých místech porážecí linky. Nanášení kyseliny na povrch je možné několika způsoby:

- postříkem roztoku kyseliny mléčné o teplotě blízké nebo vyšší než je teplota povrchu jatečně opracovaných kusů (u drůbeže např. 40 až 50 °C);
- přidavkem kyseliny mléčné do poslední oplachovací vody;
- namáčením jatečných těl drůbeže do roztoku kyseliny mléčné po dobu 15 – 60 s [87].

Aplikace kyseliny mléčné na povrch masa vede ke snížení počátečního množství mikroorganismů a tím oddálí nástup logaritmické fáze růstu. Bylo prokázáno, že 3% kyselina mléčná o teplotě 55 °C má vyšší baktericidní účinek

vůči bakteriím způsobujícím kažení (*Pseudomonas fragi*, *Brochothrix thermosphacta*) na tučném vepřovém mase než na libovém [88].

1.4.2. Kyselina sorbová a sorban draselný

Kyselina sorbová (2,4-hexadienová) a její soli jsou chemické konzervační prostředky (antimikrobiální látky), které jsou schopny zpomalit nebo zabránit růstu mikroorganismů jako jsou kvasinky, bakterie, plísně nebo houby [89]. Kyselina sorbová se řadí k nenasyceným mastným kyselinám, je fyziologicky inertní a rozkládá se v lidském těle. Nemá žádný vliv na pach či chuť výrobků, k jejichž konzervaci slouží.

Použití kyseliny sorbové je omezeno z důvodu její nízké rozpustnosti ve vodě. Sorban draselný se používá v případech, kdy je požadovaná vysoká rozpustnost ve vodě. Proto je sorban draselný hlavní formou používanou ve většině výrobků s vysokým obsahem vody. Účinkuje při pH prostředí do hodnoty 6,5. S kyselějším prostředím (< 6,5) jeho účinnost stoupá a jeho potřebné množství klesá. Sorban draselný se považuje za netoxický. Byl prokázán jeho antibakteriální účinek vůči mezofilním a psychrotrofním bakteriím, bakteriím z čeledi *Enterobacteriaceae*, fakultativně anaerobním bakteriím a laktobacilům [90].

1.4.3. Kyselina citronová

Kyselina citronová je snadno rozpustnou trikarboxylovou hydroxykyselinou [91]. Poprvé byla izolována roku 1784 ze šťávy citronu, odtud její název. Je jedním z klíčových buněčných metabolitů v Krebsově cyklu. Hojně se vyskytuje v ovoci, v malém množství i v bramborách, obilí, ve stopách i v mléce a v mase. Průmyslově se vyrábí ve velkých množstvích nepravou fermentací sacharidů, nejčastěji pomocí plísně *Aspergillus niger*. Používá se jí běžně jako přísady do různých konzervařenských výrobků, nealkoholických nápojů a jiných potravin [91, 92].

Río *et al.* [93] testovali mezi jinými vliv 2% kyseliny citronové na povrchovou mikroflóru chlazené drůbeže, pro případ legalizace použití dekontaminačních roztoků v Evropě. V další studii sice prokázali účinek kyseliny citronové (0,27%) na grampozitivní patogenní bakterie (*Listeria*, *Brochothrix*), avšak zvláště v kombinaci s 0,58% fosforečnanem sodným se může vytvořit prostředí, kde se gramnegativní patogeny (např. *Salmonella*) pomnožují rychleji [94].

1.4.4. Mastné kyseliny a monoacylglyceroly

Mastné kyseliny se rozdělují na nasycené (kyselina máselná, kapronová, kaprylová, kaprinová, laurová, myristová atd.) a nenasycené (kyselina olejová, linolová, linolenová, arachidonová atd.) mastné kyseliny. Kyselina kaprylová je osmiuhlíkatá mastná kyselina, která se přirozeně vyskytuje v kozím, kravském

a mateřském mléce a dále v kokosovém či palmovém oleji. Spolu s kyselinou kaprinovou se nachází ve vysokém množství v tuku mléka králíků (až 50 % všech mastných kyselin) [95]. Kyselina undekanová (C_{11:0}) je obsažena v některých rostlinách (*Thymus*, *Rheum*) [96] a kyselina undecenová (C_{11:1}) se v přírodě vyskytuje velmi zřídka (např. *Ricinus communis*) [97].

Monoacylglyceroly (MAG) jsou parciální estery trojsytného alkoholu glycerolu s vyššími mastnými kyselinami. Jejich molekula má amfifilní povahu a proto se MAG velmi často používají jako neionogenní surfaktanty a emulgátory nejen v potravinářství. Mastné kyseliny a jejich deriváty jsou dobře účinné vůči grampozitivním bakteriím, kvasinkám a plísním, ale méně vůči gramnegativním bakteriím [98]. Kyselina undecenová má zejména antifungální účinky, používá se např. jako antimykotikum Mykoseptin proti plísňovým onemocněním kůže [99]. Je zajímavé, že mastné kyseliny jsou účinné i proti virům, které buněčnou membránu nemají, a způsob účinku tak není zcela jasný [100].

Vztah mezi strukturou a funkcí pro nasycené a nenasycené estery je v souladu s účinností odpovídajících mastných kyselin. To znamená, že kyselina laurová tvoří nejúčinnější nasycené a kyselina palmitolejová nenasycené deriváty. To platí pouze v případě, pokud nejsou neutralizovány různými polymery, např. škrobem či proteiny [98]. Výsledky publikované Růžičkou [101] potvrzují, že monoacylglyceroly kyseliny kaprinové a laurové jsou účinnější proti grampozitivním bakteriím než vůči gramnegativním. Monokaprinoyl glycerol (MAG C_{10:0}) vykazoval minimální inhibiční koncentraci (MIC) nižší než 250 mg/l vůči *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. MIC u monolauroyl glycerolu (MAG C_{12:0}) byla u stejných kultur ještě nižší. Testované vláknité plísně a kvasinky lépe inhiboval MAG C_{10:0} při MIC cca 200 mg/l. Inhibiční účinky kyseliny kaprylové byly také pozorovány u patogenních kmenů *Streptococcus* sp. či *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* v mléce [102]. Při studiu antibakteriálního účinku kyselin se sudým počtem uhlíků (C₈-C₁₈) vůči meticilin-rezistentním kmenům *S. aureus* (MRSA) byly zjištěny nejnižší hodnoty MIC u kyseliny laurové a kaprinové [103]. Tyto dvě kyseliny prokazovaly taktéž nejlepší antimikrobiální účinky vůči kvasince *Candida albicans* [104] i dalším kvasinkovým rodům [105]. Naproti tomu účinek vůči gramnegativním patogenům (*Salmonella*, *Escherichia coli*) nebyl prokázán, jistý vliv byl pozorován na původce žaludečních vředů *Helicobacter pylori* [106] nebo vůči sbírkovým kmenům *E. coli* [107]. Petschow [108] zkoumal účinky MAG kyselin kaprinové a laurové vůči bakterii *Helicobacter pylori* a zjistil, že antibakteriální aktivita MAG kyseliny dodecenové byla několikanásobně nižší, než při aplikaci nasycené formy MAG kyseliny laurové. Je tedy zřejmé, že výskyt nenasycené vazby v uhlíkatém řetězci zbytku mastné kyseliny hraje při antimikrobiální aktivitě svou roli.

Přesný mechanismus působení amfifilních látek na mikroorganismy není znám. Plazmatické membrány jsou považovány za primární cíl ataku antimikrobiálních látek. Bylo navrženo několik hypotéz [83], z nichž jedna popisuje monoacylglyceroly jako neionogenní povrchově aktivní látky, které pronikají a včleňují se do bakteriální plazmatické membrány, čímž narušují její permeabilitu a tedy transport živin. Již mikromolární koncentrace mohou ovlivnit aktivitu důležitých enzymů v buněčné membráně [102]. Jiná hypotéza říká, že mastné kyseliny s krátkým a středním řetězcem difundují ve svém nedisociovaném stavu do bakteriálních buněk, uvnitř disociují a způsobí tak zvýšení kyselosti. Snížené pH inaktivuje intracelulární enzymy a inhibuje transport aminokyselin, nehledě na nutnost vytlačovat vodíkové ionty z cytosolu.

1.4.5. Kombinace chemických aditiv

Je velmi vhodné výše jmenované metody ošetření masa kombinovat a sledovat jejich synergický efekt. Nejčastějším účinným zákrokem je ošetření masa párou či horkou vodou ve vzájemné posloupné kombinaci [109] či v kombinaci s kyselinou mléčnou na drůbeží kůži [110] nebo na vepřovém mase [71]. Účinky různých kombinací chemických konzervantů včetně organických kyselin s enterocinem AS-48 na bakterii *Listeria monocytogenes* byly velmi pozitivní [111]. Velmi účinné bylo ošetření mechanicky odděleného drůbežního masa kombinací vysokého tlaku a bakteriocinu nizinu, avšak při kombinaci s lysozymem nebyl prokázán synergistický efekt [112]. Již dříve byl experimentálně ověřen zvýšený účinek lysozymu a nizinu v kombinaci s TSP ošetřením kuřecí kůže na uměle zaočkované patogenní bakterie [113].

Corry *et al.* [75] doporučuje věnovat pozornost kombinaci kyselých nebo TSP oplachů sprejů s ošetřením drůbežního masa ultrazvukem. Okyselený chlorid sodný (ASC) kyselinou citronovou byl spolu s ošetřením horkou vodou vyhodnocen jako nejlepší a nejekonomičtější zákrok pro dekontaminaci drůbežního povrchu [114]. Synergický efekt antibakteriálního účinku vůči *Salmonella Typhimurium* nebyl prokázán při kombinaci různých organických kyselin s aromatickými sloučeninami [115]. Kombinace 2% kyseliny mléčné s 0,2% sorbanem draselným způsobila statisticky významný úbytek všech aerobních mikroorganismů a kvasinky *Yarrowia lipolytica* uměle inokulované na povrchu drůbeže [116]. V současné době jsou atraktivní nové tzv. non-thermal konzervační technologie, zejména jejich kombinace se známými, prakticky ověřenými zákroky [74].

2. CÍL PRÁCE

Základním cílem práce bylo studium mikroflóry kuřecí kůže a dále testování možností snížení kontaminace drůbežího povrchu. Pro dosažení tohoto základního cíle byly stanoveny následující úkoly:

- popsat mikroflóru kůže čerstvých chlazených kuřat, zaměřit se na různé skupiny mikroorganismů, sledovat rozdíly v průběhu roku;
- vytvořit sbírku bakteriálních kmenů izolovaných z kůže chlazené drůbeže;
- izolované kmeny identifikovat a typizovat dostupnými metodami mikroskopickými, biochemickými a molekulárně biologickými;
- sledovat stav mikrobiální kontaminace chlazených kuřat v průběhu zpracování na výrobní lince;
- otestovat účinek dostupných a potravinářsky vhodných chemických konzervačních látek na vybrané mikroorganismy a vybrané látky aplikovat na mikroflóru kuřecí kůže:
 - ✓ kyselina kaprylová,
 - ✓ kyselina olejová,
 - ✓ kyselina citronová,
 - ✓ kyselina mléčná,
 - ✓ kyselina octová,
 - ✓ kyselina sorbová a sorban draselný,
 - ✓ kombinace – sorban draselný a kyselina mléčná,
 - ✓ kombinace – sorban draselný a kyselina mléčná a lysozym,
 - ✓ monoacylglyceroly kyseliny undekanové a undecenové;
- provést senzorickou analýzu vybraných ošetřených vzorků a vyhodnotit vhodnost a možnost použití;
- navrhnout možnost aplikace dekontaminačního roztoku při technologickém postupu výroby chlazené drůbeže.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Mikrobiologická analýza

3.1.1. Příprava vzorku

Celá chlazená kuřata byla zakoupena v podnikové prodejně (Raciola Jehlička, s r.o., Uherský Brod, Česká republika) v období leden 2006 – duben 2008. V prodejně se prodávají kuřata chlazená nebalená, zpravidla do 12 hodin od porážky. Při přepravě je zabezpečeno dodržování chladicího řetězce do 4 °C. Vzorkování kuřecí kůže bylo prováděno metodou výplachu. Asepticky bylo naváženo 10 g kůže do 100 ml sterilního fyziologického roztoku, který byl následně 15 minut protřepáván na třepáče. Získaná suspenze byla podrobena mikrobiálnímu rozboru.

3.1.2. Mikrobiální rozbor

Suspenze získaná výplachem kuřecí kůže byla v desítkovém ředění vysévána na různé typy živných půd (vyjma jinak označených vše Himedia, Indie), jejichž názvy jsou uvedeny zkratkami, které jsou rozepsány v Seznamu zkratk. Sledované parametry byly: celkové počty mezofilních mikroorganismů (MPA, 37 °C/24 h), psychrotrofních mikroorganismů (10 °C/7 dní), koliformních bakterií (Endo agar, VRBA, 37 °C/24 h), *Salmonella* sp. (XLD, 37 °C/24 h), stafylokoků (MSA, 37 °C/24 h), bakterií mléčného kvašení (MRS, 30 °C/48 h; M17 (Oxoid, Velká Británie), 37 °C/48 h), kvasinek a plísní (YGA, 20 °C/5 dní).

Bakterie *E. coli* byly u vybraných vzorků cíleně selektovány na Endo agaru. Izolovány byly laktóza pozitivní kolonie, většinou s kovovým leskem. Mikroskopicky byly potvrzeny gramnegativní nesporulující tyčinky. Celkem bylo tímto způsobem izolováno dalších 44 kmenů. Všechny byly gramnegativní fermentující kataláza-pozitivní (KAT+) oxidáza-negativní (OXI-) tyčinky.

U dvou vzorků chlazených kuřat bylo provedeno kvalitativní a kvantitativní stanovení výskytu bakterie *Listeria monocytogenes*:

- 225 ml 1/2 Fraser bujónu (BioRad Laboratories, Kalifornie, USA) + 25 ml výplachu z kůže - kultivace 30 °C/24 h;
- poté 0,1 ml přeneseno do 10 ml Fraser bujónu (BioRad Laboratories, Kalifornie, USA) – kultivace 37 °C/24 - 48 h;
- vyseto 0,1 ml na agarovou půdu ALOA nebo OXFORD – kultivace 37 °C/24 - 48 h;

a *Salmonella* sp.:

- 450 ml peptonové vody + 50 ml výplachu – kultivace 37 °C/24 h;
- poté 0,1 ml přeneseno do 10 ml tekutého média Rappaport-Vassiliadis – kultivace 42 °C/24 h;
- po kultivaci vyseto 0,1 ml suspenze na agarovou půdu XLD.

Vzorky byly analyzovány podle českých technických norem ČSN EN ISO 4833, ČSN EN ISO 11290, ČSN EN ISO 17410, ČSN ISO 7954 [117-122]. Počty mikroorganismů byly vyjádřeny jako log CFU/g kůže.

3.1.3. Izolace, identifikace a uchovávání mikrobiálních kmenů

Vybrané bakteriální kolonie byly izolovány v čisté kultuře. Celkem bylo izolováno 235 kmenů. Tyto kmeny byly dále podrobeny sérii testů vedoucích k taxonomickému zařazení. K tomuto účelu byly využity techniky mikroskopického barvení, biochemické diagnostiky a sekvencování genu pro 16S rRNA [123].

Všechny bakteriální izoláty byly rozděleny dle barvení Grama, tvaru buněk, fermentace glukózy a dalších biochemických testů (produkce katalázy, produkce oxidoreduktázy) do šesti skupin:

- gramnegativní fermentující kataláza-pozitivní (KAT+) oxidáza-negativní (OXI-) tyčinky;
- gramnegativní fermentující KAT+ OXI+ tyčinky;
- gramnegativní nefermentující KAT+ OXI+ tyčinky;
- gramnegativní nefermentující KAT+ OXI- tyčinky;
- grampozitivní koky;
- grampozitivní tyčinky.

Z těchto 235 bakteriálních kmenů bylo 103 podstoupeno k taxonomické identifikaci (ve spolupráci s pracovištěm České sbírky mikroorganismů v Brně) pomocí sad biochemických či růstových testů pro:

- gramnegativní fermentující tyčinky (např. hydrolýza Tweenu80, želatiny, DNA, produkce H₂S, dekarboxylace ornitinu, lyzinu, argininu);
- gramnegativní nefermentující tyčinky (např. redukce nitrátů, nitritů, užití citrátu, hydrolýza škrobu, lecitinu, kaseinu, pigment na KingA);
- grampozitivní koky, KAT+ (rezistence k bacitracinu, furantoinu, novobiocinu, volná koaguláza, detekce pyrrolidonylarylamidázy);
- grampozitivní koky, KAT- (růst při 45 °C, hemolýza, hydrolýza hippurátu sodného, fosfatáza, leucin aminopeptidáza, β -glukuronidáza, hydrolýza eskulinu).

Výsledky testů byly vyhodnoceny programem TNW Lite 6.5 (Pliva-Lachema Diagnostika).

Bakteriální kmeny 24 h narostlé v tekutém médiu jsou uchovávány ve 20% glycerolu při -80 °C.

3.1.4. Testování antibiotické rezistence

Celkem 20 kmenů *Escherichia coli* bylo testováno ve spolupráci s Ústavem fyziologie hospodářských zvířat SAV v Košicích na antibiotickou rezistenci. U těchto kmenů byla zjišťována minimální inhibiční koncentrace metodou Stanovení minimální inhibiční koncentrace antimikrobiálních látek dle normy

NCCLS M31-A2 [124]. K testování minimální inhibiční koncentrace (MIC) byl použit Midivet kit (Bel-Miditech, Bratislava). MIC se hodnotí v jamkách mikrotitrační destičky, které obsahují zvolené koncentrace antibiotik ve 100 μ l bujónu. Jamky se zaočkují standardizovaným bakteriálním inokulem o zákalovém stupni McFarlanda 0,5 a po aerobní kultivaci (16 - 20 h) se odečítá MIC jako nejnižší množství antibiotika, které inhibuje viditelný růst. Obvykle se připravuje 8 koncentrací antibiotika v dvojnásobné geometrické řadě. Hodnoty MIC se vyjadřují v mg/l. Výsledky se zapisují ve formě: C - citlivý, R - rezistentní. V **Tab. 1** jsou uvedeny hraniční koncentrace *E. coli* dle NCCLS a rozmezí ředění.

Tab. 1. Hraniční koncentrace antibiotik pro stanovení MIC u *E. coli* dle NCCLS [124].

ATB	citlivé (mg/l)	rezistentní (mg/l)
ampicilin (AMP)	≤ 16	≥ 64
ampicilin + sulbaktam (A+IB)	$\leq 16+8$	$\geq 32+16$
ceftriaxon (CTR)	≤ 32	≥ 64
ceftiofur (CFF)	≤ 2	≥ 8
gentamicin (GEN)	≤ 8	≥ 16
streptomycin (STM)	≤ 32	≥ 64
apramycin (APR)	≤ 16	≥ 32
neomycin (NEO)	≤ 16	≥ 32
kyselina nalidixová (NAL)	≤ 16	≥ 32
ciprofloxacin (CIP)	≤ 2	≥ 4
enrofloxacin (ENR)	≤ 8	≥ 16
tetracyklin (TTC)	≤ 8	≥ 16
chloramfenikol (CMP)	≤ 16	≥ 32
florfenikol (FLO)	≤ 16	≥ 32
trimetoprim + sulfonamid (COT)	$\leq 2+38$	$\geq 4+76$

Dále byla provedena pravděpodobnostní analýza mechanismů rezistence na: β -laktamázy typu TEM (TEM-1,2/SHV-1), širokospektré β -laktamázy (ESBL-TEM, ESBL CTX-M), chromozomální chinolonovou rezistenci (*gyrA*, *parC*) dle současného výskytu rezistencí na různá antibiotika u jednotlivých kmenů.

3.1.5. Stanovení biologické aktivity kolicinů kvalitativně

Testované kmeny *Escherichia coli* byly očkované vpichem na MPA plotny a poté byly kultivovány 24 - 48 h při 37 °C. Bakterie na miskách s makrokoloniemi byly nejdříve usmrceny parami chloroformu po dobu 30 min a poté byly přelity 3 ml 1,05% MPA agaru s 0,1 ml přes noc narostlé kultury indikátorového kmene. Jako indikátorové kmeny byly použity 4 kmeny *E. coli* (Row, B1, Φ , P400) a 1 kmen *Shigella sonnei* 17. Po následné 20 h kultivaci

při 37 °C byla zjišťována přítomnost a hodnocena velikost kruhových inhibičních zón.

3.1.6. Izolace genomové DNA

Pro izolaci genomové DNA u kmenů *E. coli* byl použit komerční kit DNAzol (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA). Postup se skládá z pěti kroků:

- lyze buněk (1 ml DNAzol + 0,1 ml tekuté kultury, ponechat 10 min při pokojové teplotě),
- centrifugace (10 000 g po dobu 10 min),
- srážení DNA (supernatant + 0,5 ml 96% etanolu),
- promývání DNA (dvakrát přidat 1 ml 75% etanolu, lehce promíchat),
- rozpouštění DNA ve vodě.

Izolovaná DNA byla následně použita pro PCR reakce (bakteriocinotypizace) nebo byla uchovávána při -20 °C.

3.2. Molekulárně-biologické metody

3.2.1. Polymerázová řetězová reakce

Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) byla využita pro určení typu kolicinu u nalezených produkčních kmenů. Byl vypracován systém PCR typizace pro 24 kolicinů (ColA, ColB, ColD, ColE1-ColE9, ColIa, ColIb, ColJs, ColK, ColL=28b, ColM, ColN, ColS4, ColU, ColY, Col5, Col10) a 7 mikrocinů (MccB17, MccC7, MccH47, MccJ25, MccL, MccM, MccV). PCR byla provedena se sadou 24 párů primerů pro koliciny a se 7 páry primerů pro mikrociny (**Tab. 2**). PCR reakce byla provedena na termocykleru GeneAmp® PCR System 9700 (Perkin-Elmer, USA) s následujícím programem: 94 °C/2 min; 30 cyklů – 94 °C/30 sec, 60 °C/30 sec, 72 °C/60 sec; 72 °C/7 min; 4 °C/∞. PCR produkty byly detekovány elektroforézou na 1% agarózovém gelu s použitím etidium bromidu (0,5 µl/ml gelu) k vizualizaci DNA. Správnost výsledků byla ověřena sekvenací PCR produktů (Genomac, Praha, Česká republika).

Tab. 2. Seznam použitých primerů pro PCR typizaci (vše poskytnuto Biologickým ústavem LF MU v Brně) a velikosti PCR produktů.

Název primeru	Sekvence (5'-3')	Velikost PCR produktu (bp)
ColA-F	CGTGGGGAAAAGTCATCATC	475
ColA-R	GCTTTGCTCTTTCCTGATGC	
colicin B-F	AAGAAAATGACGAGAAGACG	461
colicin B-R	GAAAGACCAAAGGCTATAAGG	

Pokračování Tab. 2

ColD-F	CTGGACTGCTGCTGGTGATA	420
ColD-R	GAAGGTGCGCCTACTACTGC	
colicin E1-F	TGTGGCATCGGGCGAGAATA	700
colicin E1-R	CTGCTTCCTGAAAAGCCTTTT	
ColE2-F	TGATGCTGCTGCAAAAGAG	409
ColE2-R	TTCAAAGCGTTCCCTACCAC	
ColE3589-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	
ColE3-R	TCGGATCTGGACCTTTCAAC	413
ColE4-F	GAAGGCTGCATTTGATGCT	409
ColE4-R	CGGATCCGGACCTTTAATTT	
ColE5-R	TTGAATTCTCGAATCGTCCA	430
ColE6-F	ACCGAACGTC CAGGTGTT	399
ColE6-R	TTAGCCTGTCGCTCCTGAT	
ColE7-F	GCATTCTGCCATCTGAAAT	431
ColE7-R	CTTCTGCCACTTTCTTTTCG	
ColE8-R	GACTGATTGGCTTGTCTGTA	449
ColE9-R	GACTTTTCTCCCTCCGACCT	418
ColIa-F	GCATGCAAATGACGCTCTTA	473
ColIa-R	GAGGACGCCAGTTCTCTGTC	
ColIb-F	AACGAGTGGGTTCGATGATTC	464
ColIb-R	CCTTTTCTGCGCTCGTATTC	
ColJs-F	TCAAAATGTTTGGGCTCCTC	254
ColJs-R	TAATCTGCCCTGTCCCCTG	
ColK-F	CAGAGGTCGCTGAACATGAA	469
ColK-R	TCCGCTAAATCCTGAGCAAT	
Col28b-F	TGCATATTGAAAGCGTCAGC	449
Col28b-R	CAGGTTATCCCCTCTCACCA	
ColM-F	GCTTACCACTTCGCAAACC	429
ColM-R	GAGCGACTCTCCGATAATGC	
ColN-F	AGCTTGGCGAGTATCTTGGA	401
ColN-R	CAACACAGCCCCGAATAAAC	
ColS4-F	TATATGGCCCAACTGCTGGT	490
ColS4-R	CGTAAGGACGGACACCTGTT	
ColU-F	TGATTGCTGCGAGAAAAATG	485
ColU-R	TCTGACAGCCTCTCCCTGTT	
ColY-F	GCAGGCAGAAAAGAACAAGG	477
ColY-R	CGGACGTTATTTGCCTTCAT	
Col5-F	CATTGGCAAAGCGAAATCT	443
Col5-R	TGCAACTCTGGAAACAATCG	
Col10-F	GGTTACCGGATTTCTGGAT	448
Col10-R	TTCTAGATGCTTGGCCCACT	

Pokračování Tab. 2

microcin B17-F	TCACGCCAGTCTCCATTAGGTGTTGGCA TT	135
microcin B17-R	TTCCGCCGCTGCCACCGTTTCCACCACT AC	
microcin C7-F	GATTAGTTGGTGGAGGCGGAAAGGAGC AAT	200
microcin C7-R	TAACGCAATATTTATTAACCCAGTTAAT CA	
microcin H47-F	CACTTTCATCCCTTCGGATTG	227
microcin H47-R	AGCTGAAGTCGCTGGCGCACCTCC TCAGCCATAGAAAGATATAGGTGTACC	
microcin J25-F	AAT	175
microcin J25-R	TGATTAAGCATTTCATTTTAATAAAGT GT	
microcin L-F	GGTAAATGATATATGAGAGAAATAACG TTA	233
microcin L-R	TTTCGCTGAGTTGGAATTCCTGCTGCA TC	
microcin M-F	CGTTTATTATTTTATGAATA	456
microcin M-R	AAACGGAAGAATGGATGATCTCGCAA CACACAAAACGGGAGCTGTT	
microcin V-F		680
microcin V-R	CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	

3.2.2. Sekvencování

Pro identifikaci kmenů, které nemohly být identifikovány standardními biochemickými identifikačními testy, byla provedena analýza genu pro 16S rRNA. PCR amplifikace genu pro 16S rRNA byla provedena za použití primerů 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') a 1492R-Y (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') [125]. PCR s 30 cykly (94 °C/45 s, 54 °C/45 s, 72 °C/90 s) byla provedena na přístroji DNA Engine® Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BioRad, USA). Amplifikovaný produkt o velikosti 1,5 kb byl purifikován kitem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Německo) a komerčně sekvenován dideoxy-terminační metodou dle Sangera [126]. Sekvenční homologie byly hledány v NCBI databázi programem BLAST [127].

3.2.3. SDS-PAGE

Polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE) je metoda využívaná pro separaci bílkovin. SDS uděluje všem bílkovinným molekulám záporný náboj a umožňuje tak jejich pohyb v elektrickém poli stejným směrem [123]. Základním principem je pohyb

nabitých molekul v polyakrylamidovém gelu elektrickým polem. Mobilita komplexu SDS-bílkovina je přímo úměrná logaritmu molekulové hmotnosti příslušné bílkoviny. Jako porézní matrice slouží polyakrylamidový gel, který se připravuje kopolymerací akrylamidu a *N,N'*-metylen-bisakrylamidu.

Při izolaci celkového buněčného proteinu byla použita metoda podle Pot a kol. [128]. Přes noc narostlé buňky (1 ml) byly smíchány s 20% SDS a vzorkovým pufrem a vše bylo inkubováno při 100 °C po dobu 10 min. Po centrifugaci byly vzorky připraveny pro nanášení na 5% koncentrační gel [128]. Současně byl nanesen molekulový hmotnostní standard (Serva unstained SDS PAGE protein marker 6,5-200 kDa, Liquid Mix; Serva Electrophoresis). Elektroforéza dále probíhala na 12% separačním gelu za konstantního proudu 40 mA. Gely s fixovanými proteiny byly barveny dusičnanem stříbrným se zkráceným fixačním časem dle Kirkeby a kol. [129].

SDS-PAGE byla v této práci použita pro stanovení podobností či rozdílností celobuněčných proteinových profilů u 11 vybraných bakteriálních izolátů, které měly stejné biochemické, makroskopické i mikroskopické morfologické znaky.

3.3. Stanovení antimikrobiálních účinků

Antibakteriální účinky kyseliny mléčné (kyselina DL-2-hydroxypropanová), kaprylové (kyselina oktanová) a olejové (kyselina cis-9-oktadecenová) byly sledovány na vybraných potravinářsky významných mikroorganizmech: *Escherichia coli* CCM 3954, *Serratia marcescens* CCM 303, *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Micrococcus luteus* CCM 732, *Bacillus subtilis* CCM 2216 a *Bacillus cereus* CCM 2010, které byly poskytnuty z České sbírky mikroorganismů a *Pseudomonas fluorescens* a *Salmonella Typhimurium*, které byly poskytnuty ze sbírky Ústavu potravinářského inženýrství FT UTB ve Zlíně. Stanovení MIC bylo provedeno standardní diluční metodou v bujónu. Použité koncentrace kyseliny mléčné (Penta, Praha, Česká republika) a kaprylové (Fluka, Buchs, Švýcarsko) byly od 0,1 do 1 % (v/v), u *B. subtilis* a *B. cereus* do 3 % (v/v). Kyselina olejová (Penta, Praha, Česká republika) byla použita v rozmezí koncentrací 1 - 2,5 % (v/v). Kultivace probíhala dle růstových požadavků testovaných bakterií: 30 °C/24 h pro *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*; 37 °C/24 h pro ostatní. Po kultivaci byla vytvořena řada desítkového ředění ve fyziologickém roztoku a příslušná ředění byla vysévána na pevnou agarovou půdu (MPA). Po další kultivaci byly počítány kolonie a počty bakterií byly převedeny na CFU/ml. Výsledky byly vyjádřeny jako log CFU/ml.

Antibakteriální účinky vybraných organických kyselin - kyselina citronová (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika), octová (Lachema, Brno, Česká republika), sorbová (VIA – REK, Rájec – Jestřebí, Česká republika) a jejich soli - sorban draselný (AROMA, Praha, Česká republika) byly testovány v bujónu

diluční metodou v mikrotitrační destičce. Pro testování byly vybrány identifikované izoláty z kuřecí kůže z těchto bakteriálních skupin: gramnegativní fermentující tyčinky (kmen *Escherichia coli* 66), gramnegativní nefermentující tyčinky (kmen *Pseudomonas fragi* 19), grampozitivní koky (kmen *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* 7). Biochemická charakterizace je uvedena v **Tab. 3**. Každá testovací jamka v mikrotitrační destičce obsahovala masopeptonový bujón (MPB), testovanou látku (rozmezí 0,025 - 10 %) a bakteriální inokulum v konečné hodnotě absorbance 0,1 (550 nm). Nárůst bakterií byl sledován v jamkách jako optická denzita, měřena byla absorbance při vlnové délce 550 nm každých 30 min po protřepání po dobu 24 hodin spektrofotometrem (Tecan SUNRISE, Rakousko). Výsledky byly vyhodnoceny softwarem Magellan, verze 3.11. Hodnota MIC byla stanovena jako nejnižší koncentrace, která již zastavila množení bakterií, tzn., že hodnota absorbance zůstala po 24 h kultivaci stejná jako před kultivací (hodnota inokula $A_{550} = 0,1$).

Tab. 3. Charakteristika vybraných izolátů z kuřecí kůže.

	<i>E. coli</i> 66	<i>P. fragi</i> 19	<i>S. aureus</i> 7
pigment	ne	ne	ano, žlutý
*KAT	+	+	+
OXI	-	+	-
IND	+	NT	NT
H ₂ S	-	NT	NT
LYS	+	-	NT
ARG	-	-	+
MAN	+	+	+
SOR	+	NT	NT
KAS	NT	-	NT
URE	-	-	+
DNA	-	-	+
FRU	NT	+	NT
ORN	-	-	-
NIT	NT	+	+

* zkratky testů jsou vysvětleny v Seznamu symbolů a zkratk

Monoacylglyceroly (MAG) kyseliny undekanové a undecenové byly připraveny na Ústavu chemie FT UTB ve Zlíně reakcí příslušné mastné kyseliny a glycidolu za přítomnosti Cr(III) komplexu jako katalyzátoru [130]. HPLC prokázala čistotu 99 %, rezidua Cr(III) iontů byla stanovena pomocí AAS menší než 50 mg/kg. Použité bakteriální, kvasinkové a plísňové kmeny pro testování účinků monoacylglycerolů jsou uvedeny v **Tab. 4**. Zástupci byli vybráni tak, aby reprezentovali široké spektrum mikroorganismů s různým výskytem a významem. Oba monoacylglyceroly byly jednotlivě přidány k příslušné živné půdě v těchto konečných koncentracích - 50, 100, 250, 500, 750 a 1000 mg/l.

U bakteriálních a kvasinkových kmenů byly v bujónu stanovovány hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) obou monoacylglycerolů. Byla připravena řada různých koncentrací obou monoacylglycerolů v rozmezí 30-2400 mg/l v bujónu, který byl poté zaočkován bakteriálními či kvasinkovými kmeny. Jako MIC byla stanovena nejnižší koncentrace, která již zcela zastavovala viditelný růst mikroorganismů. Minimální baktericidní koncentrace (MBC) byla stanovena jako nejnižší koncentrace způsobující totální inhibici sledovaných mikroorganismů po jejich vysetí na pevnou živnou půdu. Plísně byly očkované vpichem na agarovou půdu (Czapek-Dox agar, Himedia, Indie), kultivovány při laboratorní teplotě a po 7 a 14 dnech byly měřeny průměry kolonií.

Tab. 4. Seznam mikrobiálních kmenů použitých pro testování antimikrobiálních účinků monoacylglycerolů.

Kmen	Původ nebo označení	Typ mikroorganismu
<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954, ATCC 25922	gramnegativní bakterie
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955, ATCC 27853	gramnegativní bakterie
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	CCM 3953, ATCC 25923	grampozitivní bakterie
<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010, ATCC 14579	grampozitivní bakterie
<i>Candida albicans</i>	CCM 8261, ATCC 90028	kvasinka
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CCM 8191, ATCC 9763	kvasinka
<i>Mucor racemosus</i>	CCM 8190, ATCC 42647	plíseň, kmen <i>Zygomycota</i>
<i>Alternaria</i> sp.	wild strain	plíseň, kmen <i>Ascomycota</i>
<i>Aspergillus niger</i>	CCM 8189, ATCC 9642	plíseň, kmen <i>Ascomycota</i>
<i>Cladosporium</i> sp.	wild strain	plíseň, kmen <i>Ascomycota</i>
<i>Phoma</i> sp.	wild strain	plíseň, kmen <i>Ascomycota</i>
<i>Scopulariopsis</i> sp.	wild strain	plíseň, kmen <i>Ascomycota</i>
<i>Trichoderma</i> sp.	wild strain	plíseň, kmen <i>Ascomycota</i>
<i>Trichothecium</i> sp.	wild strain	plíseň, kmen <i>Ascomycota</i>

3.4. Aplikace dekontaminačních roztoků

Pro testování antimikrobiálních účinků vybraných látek na povrchovou mikroflóru byla v den nákupu kuřata rozdělena na dvě poloviny. Jedna sloužila jako kontrola (aplikace sterilní destilované vody) a druhá jako testovaný vzorek (aplikace kyseliny citronové, kaprylové, mléčné, sorbanu draselného, monoacylglycerolu kyseliny undekanové a undecenové a kombinací s a

bez lysozymu). Lysozym (EC 3.2.1.17, 112 500 U/mg) pocházející z vaječného bílku (Serva, Heidelberg, Německo) byl použit v koncentraci 100 mg/l [131].

Aplikace roztoků byla prováděna potěrem (15 ± 2 ml roztoku), ponorem (500 ml roztoku; 1 minuta) či postřikem (5 ± 1 ml roztoku). Kuřata pak byla skladována při 4 ± 2 °C a následně byly další vzorky odebrány po 24, 48 a 72 hodinách (doba použitelnosti). Byly stanoveny celkové počty aerobních mezofilních a koliformních bakterií, kvasinek a plísní na příslušných půdách (PCA, Endo agar, YGA). Změny počtu mikroorganismů byly odečítány oproti kontrolnímu vzorku bez aplikace organických kyselin v hodině 0 a následně byly vyjádřeny jako log CFU/g kůže.

Kyselina citronová byla aplikována na povrch kuřat v koncentracích 2, 4, 6, 8 a 10 % metodou potěru. Kyselina kaprylová byla nanášena v koncentracích 0,5, 1, 2, 3 a 4 % metodou potěru. Kyselina mléčná byla aplikována v koncentracích 1 a 2 % metodou potěru a ponoru. Sorban draselný byl nanášen na kuřecí kůži metodou potěru a ponoru. Monoacylglyceroly byly aplikovány metodou ponoru v koncentraci 500 mg/l. Všechny dekontaminační roztoky byly připraveny čerstvě před použitím a sterilizovány autoklávováním (121 °C/20 min). Pouze lysozym byl do roztoku přidán až po sterilizaci. Směsi byly míseny těsně před aplikací.

3.5. Měření pH kuřecí kůže

Hodnoty pH byly měřeny vpichovým pH metrem GRYF 209S (GryfHB, Havlíčkův Brod, Česká republika) na pěti různých místech povrchu kůže chlazené drůbeže. U vzorků určených pro aplikaci dekontaminantů bylo pH měřeno poprvé ihned po aplikaci roztoku a poté každých 24 hodin před odebráním vzorků kůže pro mikrobiologickou analýzu. Hodnoty byly vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka.

3.6. Senzorická analýza

Celkem 168 kuřecích stehýnek zakoupených v jeden den v podnikové prodejně (Raciola Jehlička, s.r.o., Uherský Brod, Česká republika) bylo rozděleno na 6 částí po 28 kusech. První skupina byla ošetřena 10% kyselinou citronovou, druhá 2% kyselinou kaprylovou, třetí směsí 2% kyseliny mléčné s 0,2% sorbanem draselným, čtvrtá monoacylglycerolem kyseliny undekanové (500 mg/l), pátá monoacylglycerolem kyseliny undecenové (500 mg/l). Poslední část byla ošetřena sterilní destilovanou vodou a sloužila jako kontrolní vzorek. Každá skupina byla rozdělena na dvě podskupiny. První podskupina byla ihned sensoricky hodnocena. Poté byly tyto vzorky upečeny (2 h/220 °C, přísadky 0,25 \pm 0,5 g soli na vzorek, bez přísadky koření, podléváno vodou podle potřeby). Druhá podskupina byla uskladněna při 6 ± 2 °C a po 72 hodinách bylo provedeno sensorické hodnocení pouze za syrova.

Senzorická analýza byla prováděna panelem 12 vybraných posuzovatelů (zaměstnanci Ústavu potravinářského inženýrství, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně) školených podle ČSN ISO 8586-1 [132]. Senzorické hodnocení bylo prováděno v senzorické laboratoři vybavené senzorickými kójiemi v souladu s normou ISO 8589 [133]. Vzorčky syrových a pečených kuřat byly hodnoceny při teplotě 22 ± 2 °C. Pomocí pětibodových či sedmibodových ordinálních hédonických stupnic byly hodnoceny následující znaky: vzhled a barva, vůně, nečisté pachy, chuť, nečisté pachuti. Dále byly stanoveny preference pořadovou zkouškou dle ISO 8587 [134].

3.7. Statistická analýza

Pomocí programů Unistat Version 5.5 (Unistat Ltd., Londýn, Velká Británie), SAS for Windows 9.1.3. a StatSoft, Inc. (2001) STATISTICA Cz (Softwarový systém na analýzu dat), verze 6, Www.StatSoft.Cz byly statisticky vyhodnoceny antimikrobiální účinky sledovaných látek na vybrané mikrobiální kmeny a na povrchovou mikroflóru chlazené drůbeže (GLM analýza, Kruskall-Wallisův test, Wilcoxonův test, analýza rozptylu ANOVA, Duncan test, t-test, Friedman test). Byla provedena Pearsonova korelační analýza vztahu úbytku mikroorganismů na kuřecí kůži a pH. Senzorická analýza byla vyhodnocena Kruskall-Wallisovým a Wilcoxonovým testem.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Mikrobiologická analýza

V rámci mikrobiologické analýzy byly sledovány bakterie, kvasinky i plísně. Identifikaci a charakterizaci bakteriálních izolátů se věnují následující podkapitoly. Počáteční počty (vzorky kůže odebrány ihned po zakoupení v obchodní síti) aerobních mezofilních bakterií se pohybovaly okolo 5 - 6 log CFU/g kůže, psychrotrofních bakterií bylo výrazně více, dosahovaly počtů 8 log CFU/g kůže. Kvasinky tvoří taktéž nezanedbatelnou součást mikroflóry kuřecí kůže. Počet kvasinek se pohyboval v rozmezí 4 - 5 log CFU/g kůže. Mnoho z nich produkuje barevné pigmenty (*Obr. 3*). Červeně pigmentující kvasinkou běžně izolovanou z potravin je např. rod *Rhodotorula* [20]. Byl sledován také výskyt plísní na kuřecí kůži. V průběhu všech pokusů nebyly z povrchu kuřat izolovány žádné plísně.



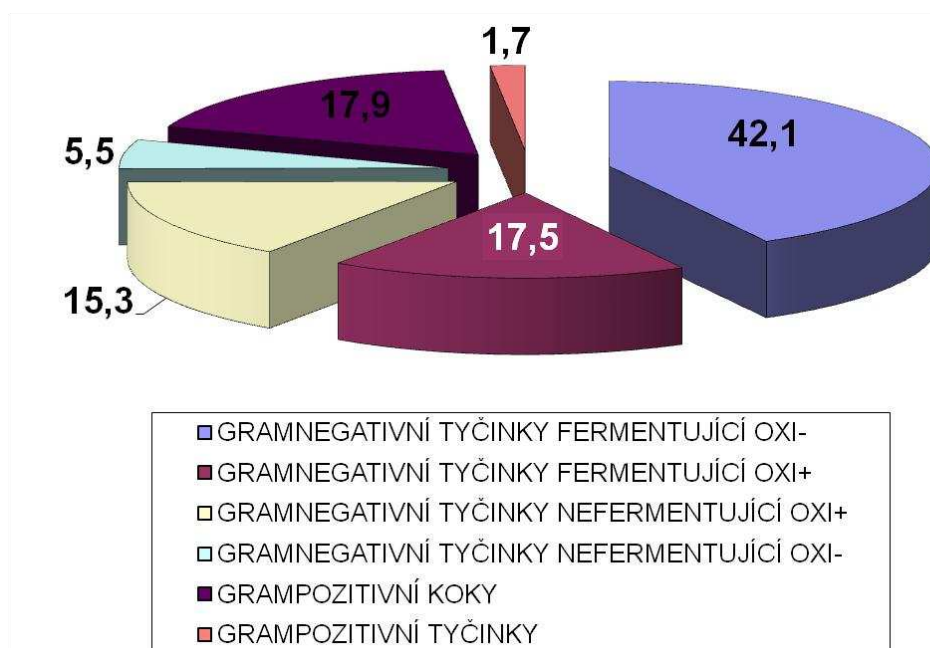
Obr. 3. Půda pro růst kvasinek (YGA) po aplikaci výplachu z kuřecí kůže a následné kultivaci při 20 °C (a). Izolované kmeny kvasinek produkující různobarevné pigmenty (b).

4.1.1. Mikrobiální identifikace

Byla provedena charakterizace přirozené aerobní mikroflóry kuřecího povrchu na základě 235 bakteriálních kmenů izolovaných z těchto agarových živných médií: PCA (45,9 % izolátů), VRBA (20,9 %), Endo (15,3 %), XLD (11,1 %), Slanetz-Bartley (2,2 %), MSA (2,2 %), MRS (0,8 %), M17 (0,8 %), ALOA (0,8 %). Kmeny byly izolovány z kůže chlazené drůbeže v období únor 2006 až březen 2008.

Procentické zastoupení bakteriálních izolátů v šesti základních identifikačních skupinách je znázorněno na *Obr. 4*. Nejbohatší skupinou byly gramnegativní fermentující kataláza-pozitivní (KAT+) oxidáza-negativní (OXI-) tyčinky (42,1 %). Tato skupina je tvořena zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*. Další tři

nejčastěji zastoupené skupiny jsou: grampozitivní koky (17,9 %), gramnegativní fermentující KAT+ OXI+ tyčinky (17,5 %) a gramnegativní nefermentující KAT+ OXI+ tyčinky (15,3 %). Gramnegativní nefermentující KAT+ OXI- a grampozitivní tyčinky byly zastoupeny v nejmenší míře.



Obr. 4. Graf procentuálního zastoupení sledovaných skupin mezi 235 bakteriálními izoláty.

Bakteriální kmeny byly pomocí sad biochemických testů určeny do rodu či druhu (**Tab. 5**) nebo nebyly identifikovány (13,6 % kmenů) např. z důvodu atypických reakcí.

Z gramnegativních fermentujících bakterií, které tvořily více než 60 % aerobní mikroflóry kuřecí kůže, byli nejčastěji izolováni zástupci *Aeromonas* sp., *Escherichia coli*, *Serratia* sp. či *Proteus vulgaris*. Žádný izolát, který produkoval H₂S, nebyl dalšími testy potvrzen jako rod *Salmonella*. Z potenciálně patogenních bakterií byly izolovány po jednom kmeni *Yersinia enterocolitica* a *Aeromonas hydrophila*. *A. hydrophila* je hojně rozšířená ve vodě, vodním prostředí, mezi zvířaty a v potravinách. Může způsobovat onemocnění studenokrevných i teplotokrevných živočichů, zejména zoonózy, choroby přenosné ze zvířat na člověka. Jako patogen izolovaný z potravin může způsobovat zejména gastroenteritidy [135].

Z gramnegativních nefermentujících tyčinek, které tvořily kuřecí aerobní mikroflóru z více než 20 %, byl nejčastěji izolován rod *Pseudomonas*. Zjištění, že převládající složkou drůbeží mikroflóry jsou bakterie způsobující kažení (enterobakterie, *Aeromonas*, *Pseudomonas*) je v souladu s dostupnou literaturou [20, 23].

Tab. 5. Identifikace 103 bakteriálních izolátů z kůže chlazené drůbeže.

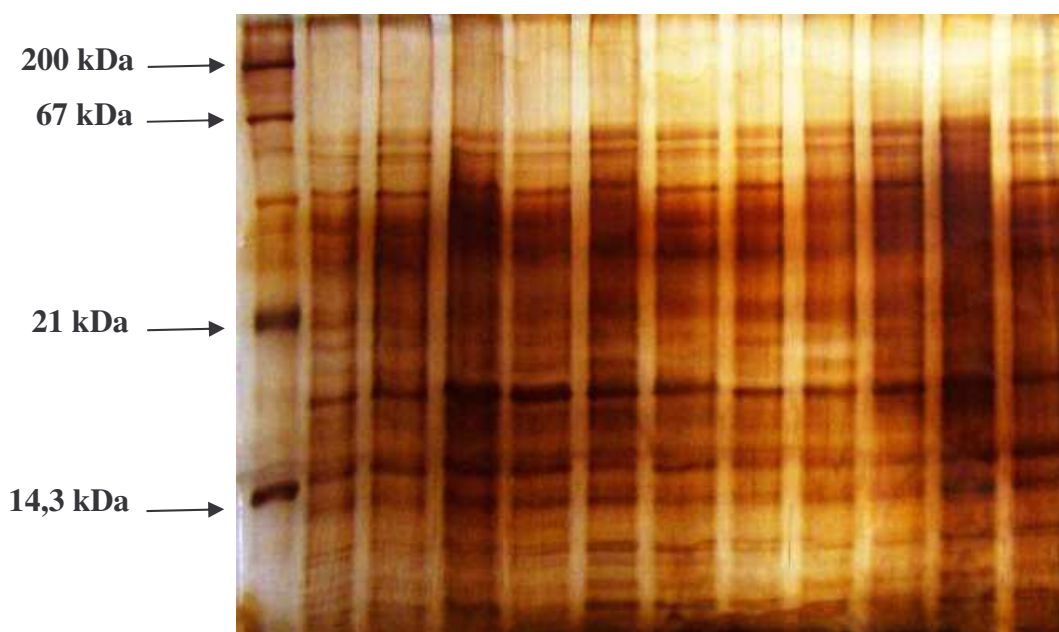
Identifikovaný taxon	Počet kmenů	% zastoupení
G- fermentující OXI- tyčinky		
<i>Escherichia coli</i>	12	11,7
<i>Pantoea</i> *	11	10,7
<i>Proteus vulgaris</i>	4	3,9
<i>Serratia marcescens</i>	4	3,9
Enteric Group 69	3	2,9
<i>Klebsiella</i> sp.	3	2,9
<i>Serratia liquefaciens</i>	2	1,9
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1,0
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1	1,0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	1,0
neidentifikováno	5	4,9
G- fermentující OXI+ tyčinky		
<i>Aeromonas</i> sp.	10	9,7
<i>Aeromonas caviae</i>	7	6,8
<i>Aeromonas sobria</i>	2	1,9
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	1,0
neidentifikováno	1	1,0
G- nefermentující OXI+ tyčinky		
<i>Pseudomonas fragi</i>	8	7,8
<i>Pseudomonas putida</i>	4	3,9
<i>Pseudomonas</i> sp.	4	3,9
<i>Delftia acidovorans</i>	1	1,0
<i>Moraxella</i> *	1	1,0
neidentifikováno	3	2,9
G- nefermentující OXI- tyčinky		
<i>Acinetobacter</i> sp.	2	1,9
G+ KAT+ koky		
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	2	1,9
<i>Staphylococcus</i> sp.	3	2,9
<i>Micrococcus luteus</i>	1	1,0
neidentifikováno	3	2,9
G+ KAT- koky		
<i>Enterococcus faecium</i>	1	1,0
<i>Streptococcus</i> *	1	1,0
G+ nefermentující tyčinky		
neidentifikováno	1	1,0

Pozn. * - tyto taxony byly identifikovány s nízkou pravděpodobností

Přestože byl jeden kmen určen jako rod *Moraxella* jen s malou pravděpodobností, výskyt této bakterie na povrchu kuřecího masa byl popsán [136], takže můžeme spekulovat o správnosti navrženého taxonu.

Zbýlých 20 % izolátů tvořily grampozitivní bakterie, zejména koky rodu *Staphylococcus*. Dva izoláty byly identifikované jako *S. aureus* subsp. *aureus*. Bylo izolováno i několik grampozitivních tyčinek, z nichž žádná nebyla určena jako patogen *Listeria monocytogenes* a žádná nebyla sporulující.

Jedenáct bakteriálních izolátů, které nebyly biochemickými a dalšími testy identifikovány, mělo shodné biochemické, makroskopické i mikroskopické znaky. Jednalo se o gramnegativní fermentující, KAT+, OXI-, žlutě pigmentující tyčinky. Standardními metodami byly tyto kmeny s nízkou pravděpodobností zařazeny do rodu *Pantoea*. Jako vhodná metoda pro porovnání těchto 11 izolátů byla vybrána SDS-PAGE celobuněčných proteinů. Bylo zjištěno, že všechny kmeny mají shodný proteinový profil (**Obr. 5**), takže se zřejmě jednalo o stejný kmen, který byl izolován vícekrát. Mohlo se jednat o kontaminant porážecí či výrobní linky, který se dostával na různá jatečně opracovaná těla. Jednalo se o izoláty z půd PCA nebo Endo, které byly získány v období únor až červenec 2006. Dva z těchto izolátů byly vybrány a podrobeny sekvenční analýze pro 16S rDNA. Srovnáním získaných DNA sekvencí s NCBI databází programem BLAST [127] byly oba kmeny shodně identifikovány jako *Pantoea agglomerans* s 98% sekvenční homologií s kmenem *Pantoea agglomerans* HY 5080.



Obr. 5. SDS-PAGE profil celobuněčných proteinů 11 kmenů se shodnými makroskopickými, mikroskopickými a biochemickými znaky.

P. agglomerans z čeledi *Enterobacteriaceae*, se běžně vyskytuje na rostlinách a ve výkalech lidí a zvířat. Tato bakterie byla identifikována jako převládající ve střevní mikroflóře u volně žijícího ptáka - vlhovce žlutohlavého (*Xanthocephalus xanthocephalus*) [137]. Přestože je obecně považována za nepatogenní, v literatuře jsou popsány případy vzniku septické artritidy po poranění kůže [138].

Další dva kmeny (č. 35 a 63), které nebyly standardními testy identifikovány do rodu, byly podrobeny částečné analýze genu pro 16S rRNA. Jejich biochemická identifikace je shrnuta v **Tab. 6**. Oba kmeny patří do skupiny gramnegativních fermentujících tyčinek. Získaná sekvence nukleotidů byla srovnána s databází BLAST [127]. U kmene č. 35 se sekvence na 99 % shodovala s částečnou sekvencí bakterie *Enterobacter amnigenus* JCM 24165. *E. amnigenus* je často izolován z povrchových či pitných vod, dále z půdy a výjimečně z ran, respiračního traktu nebo stolice, avšak jeho význam jako etiologické agens infekcí nebyl prokázán [139]. Získaná sekvence u kmene č. 63 se z 97 % zcela shodovala s bakterií *Escherichia coli* BE27.

Tab. 6. Biochemická charakteristika kmenů č. 35 a 63.

Test	Kmen č. 35	Kmen č. 63	Test	Kmen č. 35	Kmen č. 63
KAT	+	+	PHE	-	-
OXI	-	-	ONP	+	+
TWE	-	-	INO	-	-
GEL	-	-	ADO	-	-
DNA	-	-	CEL	+	+
IND	-	+	SUC	-	-
H ₂ S	-	-	TRE	+	+
LYS	-	-	MAN	+	+
ORN	-	+	VPT	-	-
URE	-	-	ESL	+	-
ARG	-	-	SOR	+	+
SCI	+	-	RHA	+	+
MAL	+	-	DUL	-	-

4.1.2. Rezistence na antibiotika u izolátů *E. coli*

Kromě 12 kmenů *E. coli*, které byly identifikovány v rámci 103 izolátů, bylo diluční metodou testováno na rezistenci k antibiotikům dalších 8 kmenů selektovaných na Endo agaru. Přehled získaných výsledků pro všech 20 kmenů je shrnut v **Tab. 7**. Oproti celorepublikovému průměrnému výskytu rezistence k aminopenicilinům, který se již od roku 2006 drží přes 55 % [47], byl zaznamenán u kuřecích izolátů nízký výskyt rezistence k ampicilinu (20 %) a tetracyklinu (20 %). To může být způsobeno nereprezentativním výběrem izolátů z drůbeže pouze od jednoho výrobce, avšak zejména je to dáno nízkým

počtem kmenů v souboru. Kolář a kol. [46] uvádí 97% výskyt rezistence k tetracyklinu a 51% výskyt rezistence k ampicilinu u 128 kmenů *E. coli* izolovaných z drůbeže.

Téměř všechny testované kmeny byly rezistentní ke kyselině nalidixové (95 %). Kyselina nalidixová patří k 1. generaci chinolonů, do skupiny fluorovaných chinolonů. Dále do této skupiny patří z testovaných antibiotik ještě ciprofloxacin a enrofloxacin. Mezi testovanými kmeny bylo nalezeno 20 % izolátů rezistentních k ciprofloxacinu a až 30 % kmenů bylo rezistentních k enrofloxacinu, který se využívá ve veterinární medicíně. Výskyt fluorochinolon-rezistentních kmenů *E. coli* v populaci drůbeže by měla být průběžně sledována, protože tato rezistence hraje klíčovou roli při přenosu rezistence na jejich klinické protějšky, které poté komplikují léčbu *E. coli* infekcí u lidí [140]. Naproti zjištěným výsledkům byla v roce 2005 mezi 239 izoláty *E. coli* ze zdravých slepic rezistence k ciprofloxacinu a ofloxacinu nalezena pouze u 3 % kmenů [141]. Výsledky tedy naznačují, že rezistence k fluorochinolonům je velmi aktuálním problémem. Navíc, kmeny rezistentní k fluorochinolonům jsou velmi často také rezistentní k jiným antibiotikům (cefalosporiny 3. generace, aminoglykosidy) a projevují se tedy jako multirezistentní. Podle EARSS se v roce 2005 počet těchto multirezistentních *E. coli* v České republice rapidně zvýšil [142].

Tab. 7. Výsledky testování rezistence kmenů *E. coli* k antibiotikům a hodnoty MIC50 a MIC90 (mg/l).

ATB	citlivé	rezistentní	MIC50	MIC90
AMP	16	4	2,00	64,00
A+IB	20	0	2,00	4,00
CTR	20	0	0,50	0,50
CFE	20	0	0,13	0,50
GEN	20	0	0,25	1,00
STM	12	8	8,00	256,00
APR	20	0	2,00	4,00
NEO	18	2	2,00	4,00
NAL	1	19	256,00	256,00
CIP	16	4	0,50	4,00
ENR	14	6	2,00	32,00
TTC	16	4	1,00	32,00
CMP	20	0	2,00	4,00
FLO	20	0	2,00	2,00
COT	19	1	2,00	8,00

Pozn. Hodnoty MIC50 a MIC90 vyjadřují koncentraci daného antibiotika, která je hodnotou MIC pro 50, resp. 90 % sledovaných kmenů.

Analýza mechanismů rezistence aminopenicilinů odhalila u všech testovaných kmenů výskyt β -laktamáz typu TEM-1/SHV-1/low. Žádný z kmenů nebyl označen jako ESBL (extended spectrum of β -lactamases, širokospektré β -laktamázy). Při analýze mechanismů rezistence na chinolony byly nalezeny pouze jednoduché mutace (25 %) QRDR oblasti na chromozomu *E. coli*. Pro potvrzení konkrétních mutací byla zavedena PCR metoda [140].

4.1.3. Produkce a typizace bakteriocinů u kmenů *E. coli*

Na produkci kolicinů bylo testováno celkem 56 kmenů určených standardními identifikačními metodami jako *E. coli*. Bylo nalezeno 21 kolicinogenních producentů, což představuje 37,5% incidence kolicinogenie u kmenů *Escherichia coli* izolovaných z povrchu chlazené drůbeže. Bylo zjištěno, že studované izoláty produkují 10 typů kolicinů a 4 typy mikrocinů. Jedenáct z nich produkuje pouze jeden typ kolicinu nebo mikrocinu, ostatní produkují dva a více typů bakteriocinů (**Tab. 8**). 35 % z produkčních kmenů vykazuje vícenásobnou produkci bakteriocinů, tzn. 3 a více typů kolicinů či mikrocinů. Vícenásobná produkce kolicinů a mikrocinů byla sledována mezi 102 produkčními humánními izoláty *E. coli* a byl nalezen pouze jeden kmen produkující čtyři typy bakteriocinů současně [66]. Přestože zde studovaný soubor kolicinogenních izolátů *E. coli* z kuřecí kůže byl pětkrát menší, bylo zde nalezeno 7 kmenů produkujících současně 3 a více bakteriocinů. Dá se tedy předpokládat, že vícenásobná produkce kolicinů a mikrocinů je u drůbežích izolátů rozšířeným jevem.

Tab. 8. Kombinace typů bakteriocinů u produkčních kmenů a jejich počet.

Typ produkovaného bakteriocinu	Počet kmenů
Ia	4
Y	3
mV	3
E1,E2,E6,E7, mV,mM	2
mC7	1
Ia, mL	1
Ia, Y	1
E5, mC7	1
E5, E9, Y	1
Ia, mC7, mV	1
B, E1, M	1
B, E1, E7, M	1
B, M, E5, E9, Y	1

Nejčastěji byly zastoupeny koliciny Ia, Y a E1 (**Tab. 9**). V menší míře se vyskytovaly kmeny produkující další koliciny typu E (E5, E7, E2, E6, E9), B a M. U sledovaných kmenů platí, že všechny kmeny produkující kolicin B produkují i kolicin M. Současný výskyt kolicinu B a M byl již dříve v literatuře popsán u humánních izolátů [66]. Ostatní typy kolicinů nebyly detekovány. Z mikrocinů byl zjištěn nejčastější výskyt mikrocinu V (6 kmenů), dále mikrocinu C7 (3 kmeny), mikrocinu M (2 kmeny) a u jednoho izolátu byla zaznamenána produkce mikrocinu L.

Tab. 9. Frekvence výskytu jednotlivých typů bakteriocinů.

Typ bakteriocinu	Frekvence výskytu (%) (n = 56)
Kolicin	
Ia	10,7
Y	10,7
E1	7,1
B	5,4
E5	5,4
E7	5,4
M	5,4
E2	3,6
E6	3,6
E9	3,6
A, D, E3, E4, E8, Ib, Js, K, L, N, S4, U, 5, 10	0
Mikrocin	
mV	10,7
mC7	5,4
mM	3,6
mL	1,8
mB17, mH47, mJ25	0

4.1.4. Mikroflóra kuřecí kůže

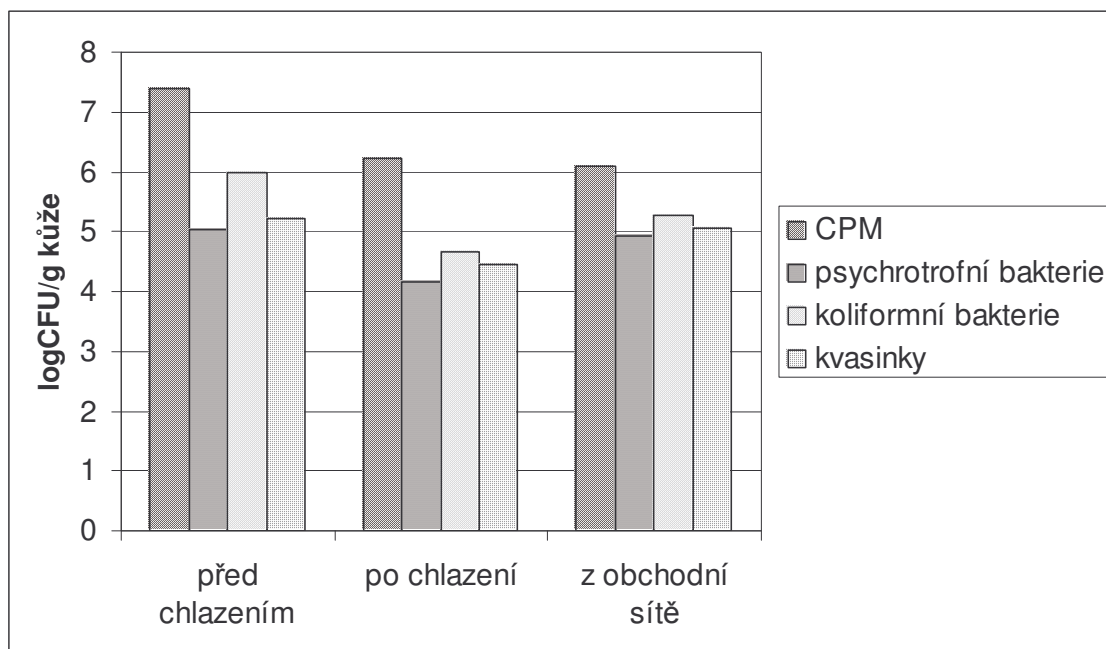
Byly sledovány celkové počty mikroorganismů (mezofilní bakterie, psychrotrofní bakterie, koliformní bakterie, kvasinky) na kuřecí kůži chlazené drůbeže v průběhu výroby (před chlazením; po chlazení) a po distribuci do obchodní sítě (**Tab. 10, Obr. 6**). Navíc byly hledány množstevní rozdíly v závislosti na délce chladového skladování (0, 24, 48, 72 hodin) a na ročním období (únor, duben, červen, září 2006) (**Obr. 7, 8**).

Tab. 10. Počty mikroorganismů (log CFU/g kůže) na kuřecí kůži chlazené drůbeže na výrobní lince před chlazením, po chlazení a z obchodní sítě (průměr ± směrodatná odchylka).

mikroorganismy	před chlazením	po chlazení	z obchodní sítě
CPM	7,38 ± 0,35	6,23 ± 0,16	6,09 ± 0,23
psychrotrofní bakterie	5,03 ± 0,12	4,16 ± 0,89	4,92 ± 0,17
koliformní bakterie	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

pozn. CPM – celkový počet mezofilních bakterií

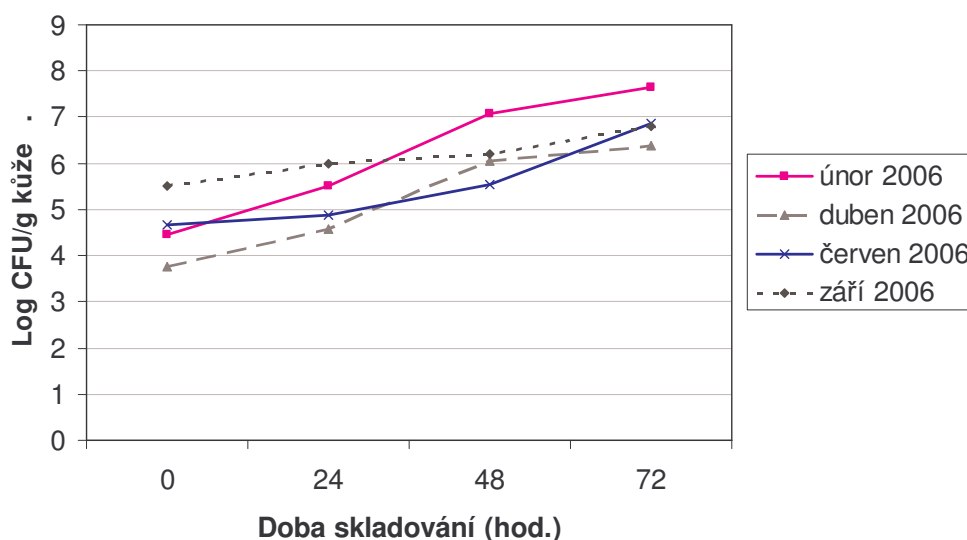
Na **Obr. 6** jsou znázorněny počty různých skupin mikroorganismů mikroflóry kuřecí kůže v průběhu zpracování a následné distribuce do obchodní sítě. Z grafu je patrné, že chlazení při výrobě je účinné a způsobuje redukci počáteční mikroflóry průměrně asi desetkrát. Nejméně jsou ovlivněny kvasinky a psychrotrofní bakterie. Metabolismus zejména mezofilní mikroflóry je zpomalen a dochází tedy ke zpoždění rozvoje potenciálně patogenních bakterií např. z čeledi *Enterobacteriaceae*.



Obr. 6. Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů, psychrotrofních bakterií, koliformních bakterií a kvasinek na povrchu kuřecí kůže před a po chlazení ve výrobě a po zakoupení z obchodní sítě.

Stanovení celkového počtu mikroorganismů na kůži chlazené drůbeže ukazuje, že největší počet mikroorganismů byl na povrchu drůbeže zakoupené v září (**Obr. 7**), zatímco nejméně mikroorganismů se vyskytovalo na drůbeži zakoupené v dubnu. Ve studii z roku 2006 jsou shrnuty výsledky několika

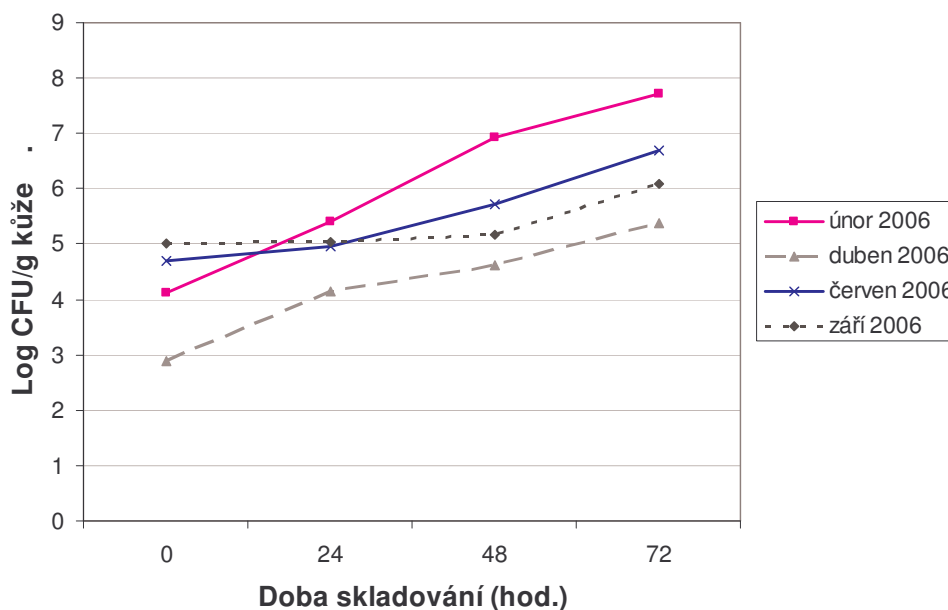
autorů, které uvádějí podobné počáteční hodnoty celkových aerobních bakterií na povrchu drůbeží kůže v rozmezí 4,73 – 5,73 log CFU/g kůže [143]. Z našich výsledků rovněž vyplývá, že po 24 hodinách skladování drůbeže při chladírenské teplotě došlo k nárůstu počtu mikroorganismů zhruba o 1 řád. Při skladování drůbeže (4 ± 2 °C) během 3 dnů, což byla doba použitelnosti chlazené drůbeže uvedená prodejcem, se počet mikroorganismů zvýšil zhruba tisíckrát (**Obr. 7**). Nižší nárůst počtu bakterií a kvasinek během skladování byl zaznamenán v září a červnu, což lze vysvětlit tím, že prodejce pravděpodobně využíval maximálního chlazení drůbeže v prodejně oproti méně teplým měsícům. Tím mohlo dojít (v teplejších měsících) ke zpomalení růstu některých skupin mikroorganismů a následně k prodloužení jejich fáze adaptace na nové prostředí. Tyto výsledky potvrzují i studie jiných autorů, podle kterých je většina mikroorganismů izolovaných z povrchu drůbeže schopna přežití nebo růstu při chladírenských teplotách [20].



Obr. 7. Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů izolovaných z povrchu drůbeže během roku 2006 a vliv doby skladování na mikroflóru povrchu drůbeže uskladněné při chladírenské teplotě.

Na povrchu drůbeže se rovněž vyskytovalo značné množství koliformních bakterií, jejichž počet se v době zakoupení drůbeže pohyboval zhruba mezi 10^4 až 10^5 CFU/g kůže, což koresponduje s podobnými studiemi [143]. Výjimkou byla kuřata zakoupená v dubnu, na kterých byl zjištěn nižší počet koliformních bakterií (**Obr. 8**). V tomto měsíci, podobně jako v únoru, však došlo k největšímu nárůstu počtu koliformních bakterií izolovaných z povrchu drůbeže skladované při chladírenské teplotě. Oproti tomu v teplejších měsících došlo k nárůstu počtu koliformních bakterií během třídního skladování drůbeže

pouze o necelé dva řády (**Obr. 8**), což lze opět vysvětlit pomalejší adaptací těchto bakterií na nové prostředí.



Obr. 8. Celkové počty koliformních bakterií izolovaných z povrchu drůbeže během roku 2006 a vliv doby skladování na mikroflóru povrchu drůbeže uskladněné při chladírenské teplotě.

U všech sledovaných mikrobiálních skupin došlo v průběhu 72 hodin chladového skladování ke značnému zmnožení. Počty přesahující 10^7 CFU/g kůže již znatelně způsobovaly rozklad lipidů a proteinů a výrazně tak byly ovlivněny organoleptické vlastnosti kuřecího masa (nepříjemný zápach).

4.1.5. Měření pH kuřecí kůže

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 po celou dobu chladírenského skladování vždy s 24 hodinovým odstupem.

Celkem byla analýza pH provedena na 33 kusech chlazených nebalených kuřat, které byly zakoupeny postupně v období leden 2006 – duben 2008 v podnikové prodejně od jednoho výrobce (Raciola Jehlička, s.r.o., Uherský Brod, Česká republika). Průměrná hodnota pH kůže čerstvé chlazené drůbeže byla $6,42 \pm 0,07$. Po 24 hodinách skladování při 4 ± 2 °C se pH mírně zvýšilo na $6,50 \pm 0,21$. Trend zvyšování byl pozorován i po 48 ($6,64 \pm 0,28$) a 72 ($6,82 \pm 0,43$) hodinách skladování. Podobné hodnoty (od 6,52 do 6,61) a trend

mírného zvyšování hodnot pH během 5 dnů skladování při 3 ± 1 °C byly zaznamenány při měření 66 kuřecích stehen zkoupených ve Španělsku [93].

4.2. Antimikrobiální účinky vybraných látek

4.2.1. Organické kyseliny a jejich soli

Z celkového pohledu na antibakteriální účinky organických kyselin nelze říci, že by existoval rozdíl mezi skupinou gramnegativních a grampozitivních bakterií. Antibakteriální účinek organických kyselin je dán nejen snížením pH, ale také inhibicí metabolických procesů nedisociovanými molekulami [77].

Kyselina mléčná

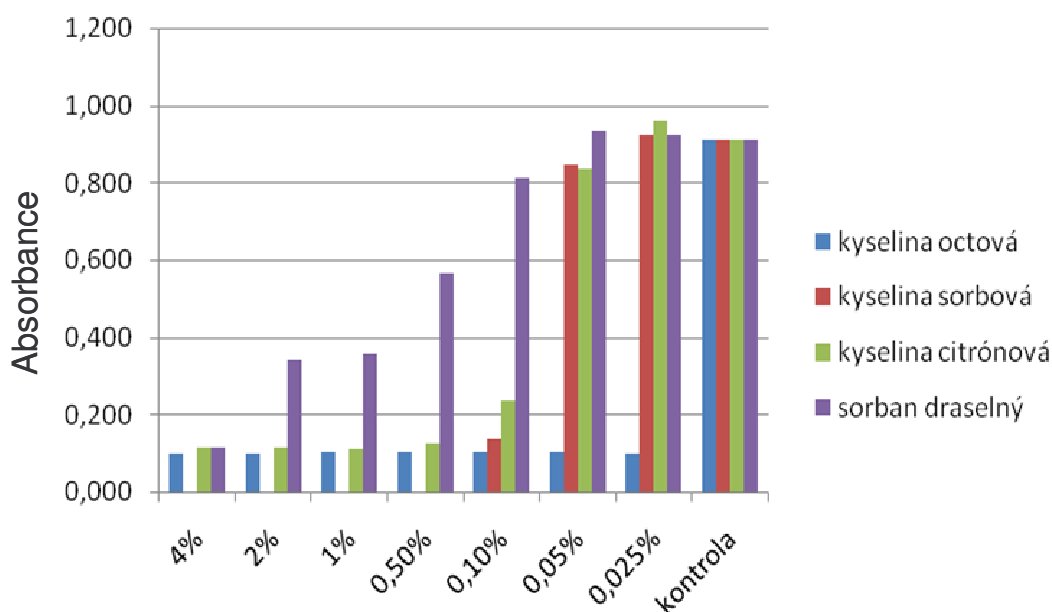
Antimikrobiální účinky kyseliny mléčné v rozmezí koncentrací 0,1 - 1 % (v/v) byly sledovány na vybrané bakterie. Na základě výsledků bylo zjištěno, že k úplné inhibici *E. coli* dochází při 0,5% koncentraci kyseliny mléčné. Při stejné koncentraci této kyseliny došlo k absolutní inhibici také u *P. fluorescens* a *S. aureus*. Na *S. Typhimurium* a *M. luteus* má kyselina mléčná inhibiční účinek při koncentraci 0,25 %, a růst *S. marcescens* byl zastaven již při aplikaci 0,125% kyseliny. V případě bacilů nebyla stanovena koncentrace, při které dochází k totální inhibici. Byl stanoven pouze statisticky významný úbytek v počtu bakterií po aplikaci 2 a 3% kyseliny mléčné.

Kyselina citronová, octová, sorbová a sorban draselný

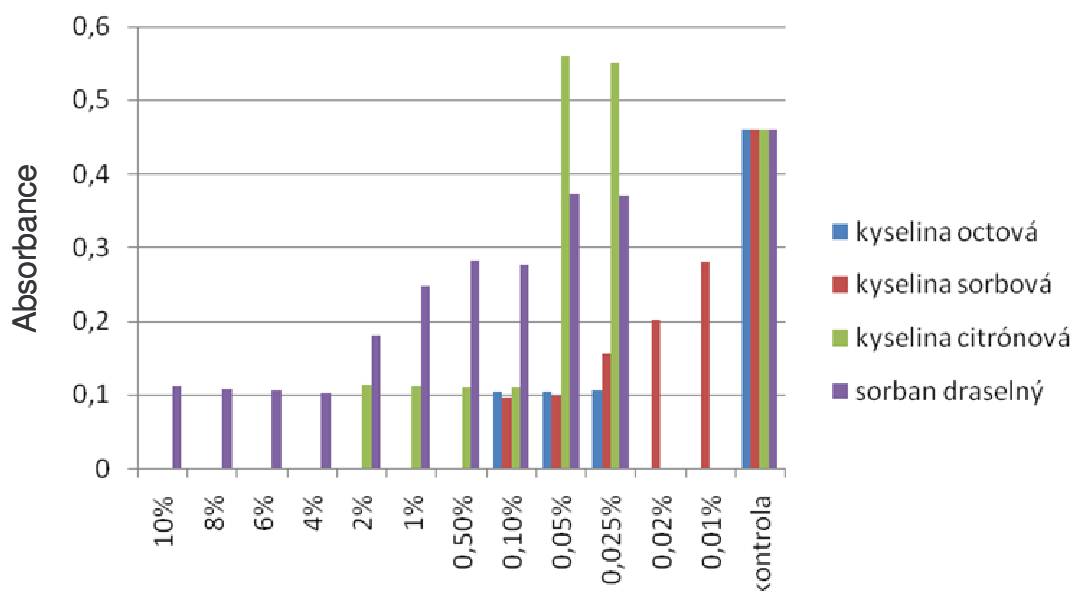
Antimikrobiální účinky kyseliny citronové, octové, sorbové a sorbanu draselného byly testovány diluční metodou na vybrané tři bakteriální kmeny, které byly izolovány z kuřecí kůže. Jedná se o zástupce gramnegativních fermentujících tyčinek z čeledi *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli* 66), gramnegativních nefermentujících tyčinek (*Pseudomonas fragi* 19) a grampozitivních koků (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* 7). Úbytek bakterií byl stanoven spektrofotometricky měřením zákalu. Jelikož je za určitých podmínek absorbance přímo úměrná koncentraci bakteriálních buněk, je možné považovat úbytek absorbance za úbytek buněk tzn., že bylo zpomalené resp. zastaveno buněčné množení. V grafech (**Obr. 9, 10, 11**) je znázorněn pokles absorbance v závislosti na koncentraci testované látky po 24 hodinové kultivaci. Pokud byla nalezena taková koncentrace, která zcela zastavuje bakteriální dělení, byla označena za minimální inhibiční koncentraci (MIC). Všechny zjištěné hodnoty MIC jsou shrnuty v **Tab. 11**.

Nejcitlivější bakterií k testovaným organickým kyselinám byla *P. fragi*. Je to psychrotrofní bakterie, která se velkou měrou podílí na kažení masa a drůbeže. V rozsáhlé studii bylo z 5920 kmenů izolovaných z jatečně opracovaných těl kuřat více než 30 % identifikováno jako *Pseudomonas* sp. [144]. Jiný literární zdroj uvádí, že *P. fragi* tvořila podstatnou část (13,7 %) počáteční mikroflóry chlazených kuřat odebíraných po chlazení přímo

z výrobní linky. Po osmi dnech chladového skladování tvořila již téměř 30 % ze sledované povrchové mikroflóry, která byla zaměřena na pseudomonády [145].



Obr. 9. Hodnoty absorbance (OD_{550}) po 24 hodinové kultivaci *Escherichia coli* 66 s různými koncentracemi kyseliny citronové, octové, sorbové a sorbanu draselného.



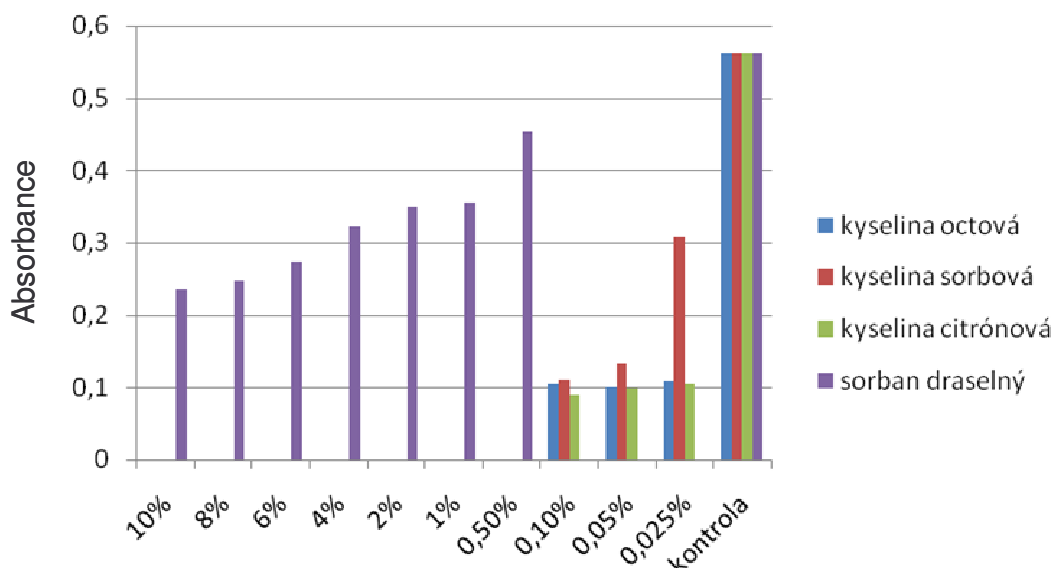
Obr. 10. Hodnoty absorbance (OD_{550}) po 24 hodinové kultivaci *Pseudomonas fragi* 19 s různými koncentracemi kyseliny citronové, octové, sorbové a sorbanu draselného.

Tab. 11. Přehled stanovených minimálních inhibičních koncentrací.

	<i>E.coli</i> 66	<i>P. fragi</i> 19	<i>S. aureus</i> 7
kyselina citronová	0,50 %	0,10 %	0,10 %
kyselina octová	0,02 %	0,02 %	0,03 %
kyselina sorbová	0,10 %	0,05 %	0,10 %
sorban draselný	6,00 %	4,00 %	N

pozn. N – MIC nestanovena, jelikož látka ani v nejvyšší testované koncentraci zcela nezastavovala růst

Z výsledků získaných v této práci je tedy možno předpokládat, že v případě aplikace organických kyselin na povrch drůbeže nastane největší zpomalení rozvoje té části mikroflóry, skládající se převážně z psychrotrofních *Pseudomonas*. Jelikož jsou převážně tyto bakterie odpovědné za proteolytický a lipolytický rozklad drůbežního masa, zpomalí se tímto způsobem významně proces kažení.



Obr. 11. Hodnoty absorbance (OD_{550}) po 24 hodinové kultivaci *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* 7 s různými koncentracemi kyseliny citronové, octové, sorbové a sorbanu draselného.

Z testovaných látek měla jednoznačně největší účinek na všechny tři vybrané zástupce různých bakteriálních skupin kyselina octová. Již velmi nízká koncentrace od 0,02 % zastavovala bakteriální růst. Mikroorganismy se však ve své citlivosti ke kyselině octové značně liší. Pro inhibici *Bacillus cereus*, *Salmonella Aertrycke* či *S. aureus* je potřeba nižší koncentrace než pro redukci *Saccharomyces cerevisiae* či *Aspergillus niger*. Dále bylo zjištěno, že antibakteriální účinek vůči gram pozitivním i gram negativním bakteriím se zvyšuje použitím pufrovacích systémů [146].

Kyselina octová přes své velmi dobré účinky není sensoricky vhodná pro aplikaci na drůbeží maso. Nevýhodou aplikace kyseliny sorbové je její nízká rozpustnost ve vodě. Pro praktické aplikace se využívá jejích solí, zejména sorban draselný a sorban sodný.

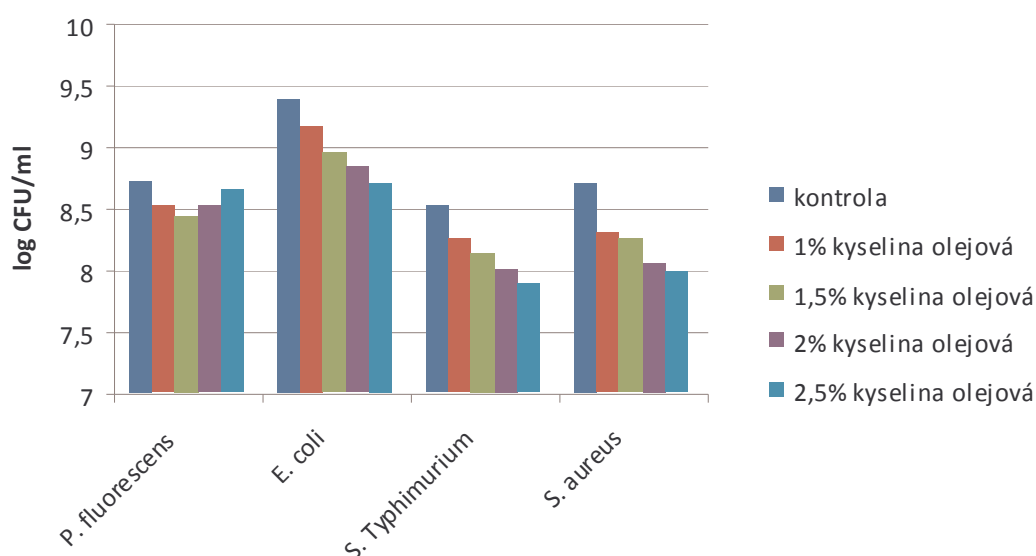
4.2.2. Mastné kyseliny a jejich monoacylglyceroly

Kyselina kaprylová

Antibakteriální účinky kyseliny kaprylové byly sledovány v rozmezí koncentrací 0,1 - 1% (v/v). Nejcitlivější vůči kyselině kaprylové byly grampozitivní koky (*S. aureus*, *M. luteus*). Celková inhibice růstu byla u *S. aureus* zjištěna po aplikaci 0,25% kyseliny kaprylové, stejně jako u *S. Typhimurium* a *M. luteus*. U *P. fluorescens* byla tato hodnota rovna 0,5 %, u *E. coli* 0,75 % a u *S. marcescens* 2 %. U rodu *Bacillus* nebyla stanovena koncentrace, při které dochází k totální inhibici. Byl stanoven pouze statisticky významný úbytek v počtu bakterií po aplikaci 2 a 3% kyseliny kaprylové.

Kyselina olejová

Antibakteriální účinek kyseliny olejové (1 - 2,5 % v/v) byl sledován u bakterií *P. fluorescens*, *E. coli*, *S. Typhimurium* a *S. aureus* (**Obr. 12**). Statisticky významný úbytek (Kruskal-Wallisův test, $P \leq 0.05$) byl zaznamenán pouze při použití 2% a 2,5% koncentrace na bakterie *E. coli*, *S. Typhimurium* a *S. aureus*. *P. fluorescens* byla ke všem testovaným koncentracím odolná.



Obr. 12. Počet bakterií (log CFU/ml) po 24 hodinové kultivaci s různými koncentracemi kyseliny olejové.

Monoacylglyceroly kyseliny undekanové a undecenové

Gramnegativní bakterie byly mnohem odolnější vůči inhibičnímu působení monoacylglycerolů kyseliny undekanové (MAG C_{11:0}) a kyseliny undecenové (MAG C_{11:1}) než bakterie grampozitivní. MAG C_{11:0} od koncentrace 1000 mg/l snižuje počty *Escherichia coli* o jeden řád, zatímco na *Pseudomonas aeruginosa* tohoto účinku nedosahuje ani při nejvyšší použité koncentraci 2400 mg/l. Ve srovnání s MAGy C_{10:0} a C_{12:0}, které neměly žádné inhibiční účinky na stejné kmeny *E. coli* a *P. aeruginosa* [101], MAG C_{11:0} alespoň zpomaloval růst *E. coli*. Thormar a Hilmarsson [147] ve svém přehledu uvedli, že dva nejúčinnější monoacylglyceroly v koncentraci 5 - 10 mmol/dm³ vůči spektru patogenních bakterií a virů byly MAG C_{10:0} a MAG C_{12:0}, ovšem nikoli na *Escherichia coli*. MAG C_{11:1} měl bakteriostatický účinek na *E. coli* od koncentrace 1000 mg/l (**Tab. 12**), kdežto na *P. aeruginosa* by mohl mít stejný účinek zřejmě až od koncentrace vyšší než 2400 mg/l. Vyšší koncentrace však již z důvodu špatné rozpustnosti MAGů nebyly testovány. Zvýšení účinku lipidů proti gramnegativním bakteriím je možné dosáhnout kombinací s vyšší teplotou (50 °C) či okyselením, např. kyselinou citronovou [147]. Tato zjištění poukazují na to, že gramnegativní bakterie jsou chráněny vnější membránou buněčné stěny, která je tvořena lipopolysacharidy. Nízké pH a zvýšená teplota zřejmě narušují tuto ochrannou bariéru a dovolí tak penetraci mastných kyselin až k bakteriální plazmatické membráně [106].

Mnohem výraznější bakteriostatický účinek byl pozorován u grampozitivních bakterií. MAG C_{11:0} již v koncentraci 70 mg/l působil na *Staphylococcus aureus* bakteriostaticky (**Tab. 12**), v koncentraci 100 mg/l již baktericidně. Hodnota MIC pro MAG C_{11:0} (70 mg/l) u *S. aureus* leží mezi hodnotami MIC pro MAG C_{10:0} (150 mg/l) a MAG C_{12:0} (35 mg/l) u stejného kmene *S. aureus* [101]. *Bacillus cereus*, jakožto sporotvorný mikroorganismus, byl odolnější než *S. aureus*. MAG C_{11:0} působil bakteriostaticky na *B. cereus* až v koncentraci 750 mg/l, baktericidní koncentrace nebyla stanovena. Nicméně koncentrace 1000 mg/l způsobila snížení v počtu buněk o 7 log řádů. MAG C_{11:1} v koncentraci 140 mg/l působil na *S. aureus* bakteriostaticky, v koncentraci 240 mg/l baktericidně. MAG C_{11:1} v koncentraci 380 mg/l působil na bakterie *B. cereus* bakteriostaticky a způsobil snížení o více než dva log řády. Baktericidní koncentrace MAG C_{11:1} pro *B. cereus* nebyla stanovena.

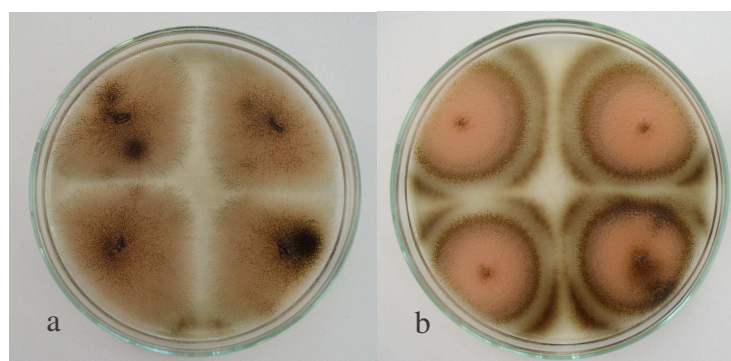
Na testované kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*) působil MAG C_{11:0} pouze mikrobistaticky až do koncentrace 1000 mg/l, kdežto MAG C_{11:1} působil i mikrobicidně – na *S. cerevisiae* v koncentraci 360 mg/l a na *C. albicans* v koncentraci 400 mg/l (**Tab. 12**). Nedávná studie [104] popisuje, že tři kmeny *C. albicans* (ATCC 28516, dva klinické izoláty) byly nejvíce inhibovány kyselinou kaprinovou a laurovou. V 10 mmol/dm³ koncentraci způsobilý snížení o více než 5 log řádů kvasinkových buněk. V této práci bylo pozorováno,

že monoacylglyceroly kyseliny undekanové i undecenové v koncentraci 250 mg/l způsobily snížení o více než 2 log řády u buněk *C. albicans* i *S. cerevisiae*.

Tab. 12. Přehled minimálních inhibičních koncentrací (MIC) a minimálních baktericidních koncentrací (MBC) u testovaných bakterií a kvasinek.

	MAG C _{11:0} (mg/l)		MAG C _{11:1} (mg/l)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	70	100	140	240
<i>Bacillus cereus</i>	750	>1000	380	N
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	250	N	250	360
<i>Candida albicans</i>	250	N	250	400
<i>Escherichia coli</i>	N	N	1000	N
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	N	N	>2400	N

N – MIC nestanovena



Obr. 13. Srovnání makrokolonií rodu *Phoma* na Czapek Dox agaru bez přídavku MAG (a) a s přídavkem 250 mg/l MAG C_{11:1} (b) po 14 denní kultivaci při pokojové teplotě.

Vláknité houby jsou běžnými organizmy způsobujícími kažení potravin, např. kysané mléčné výrobky, sýry, chléb. Nedostatek literárních údajů o antifungálních účincích monoacylglycerolů je zmírněn současnou studií sledující inhibiční vliv kyseliny laurové, myristové a palmitové a jejich monoacylglycerolů na *Aspergillus* spp. a *Penicillium* spp. [148].

Redukce mycelia při růstu na pevném médiu s MAGy byla hodnocena měřením velikosti kolonií v centimetrech (průměr). MAGy v agarové půdě ovlivňovaly nejen velikost a morfologii kolonií, ale také produkci a distribuci exopigmentů (**Obr. 13**).

Výsledky působení MAG C_{11:0} na plísňové kmeny jsou zaznamenány v **Tab. 13**. MAG C_{11:0} do koncentrace 1000 mg/l neinhibuje zcela ani jednu ze sledovaných plísní. Na druh *Mucor racemosus* nepůsobil vůbec. Na *Aspergillus niger* a *Scopulariopsis* měla tato látka signifikantní vliv po 7 dnech kultivace, ale po 14 dnech kultivace již žádný účinek nebyl zaznamenán. Rod *Cladosporium* byl statisticky významně inhibován ještě po 14 dnech kultivace až vysokou koncentrací 1000 mg/l, obdobně tomu bylo u rodu *Trichothecium*, na inhibici však dostačovala již koncentrace 500 mg/l. Nejcitlivějšími plísněmi byly rody *Alternaria*, *Phoma* a *Trichoderma*, na jejichž statisticky významnou redukci růstu stačila koncentrace 250 mg/l. Je možné, že stejné účinky by měla i nižší koncentrace, což bude předmětem dalšího zkoumání.

Výsledky působení MAG C_{11:1} na plísňové kmeny jsou zaznamenány v **Tab. 14**. MAG C_{11:1} inhibuje *Aspergillus niger* a rod *Phoma* v koncentraci 500 mg/l ($P \leq 0,001$) či vyšší po 7 dnech kultivace. Nicméně po 14 dnech kultivace již tento výsledek nebyl statisticky průkazný ani u nejvyšší použité koncentrace, přestože by hodnoty velikostí kolonií ($3,70 \pm 0,17$ cm; $1,35 \pm 0,45$ cm, resp.) mohly napovídat o opaku. Na vině statistické neprůkaznosti je velký rozptyl naměřených hodnot. Přesto, že MAG C_{11:0} na *Mucor racemosus* vůbec nepůsobil, jedna dvojná vazba v molekule MAG C_{11:1} navíc způsobila antifungální účinek při koncentraci 500 mg/l po 7 dnech a 750 mg/l po 14 dnech kultivace. Rod *Scopulariopsis* byl významně redukován nejnižší koncentrací po 7 dnech kultivace, avšak po 14 dnech kultivace byla účinná pouze koncentrace 1000 mg/l. Koncentrace 250 mg/l MAG C_{11:1} způsobila významnou inhibici *Trichoderma*, avšak žádná použitá koncentrace nezpůsobila úplnou redukci růstu. MAG C_{11:1} zcela inhibuje růst *Alternaria* při koncentraci 1000 mg/l, zatímco *Cladosporium* a *Trichothecium* je redukováno již koncentrací 500 mg/l a to i po 14 dnech kultivace. Všechny tři poslední jmenované plísně byly inhibovány již při použití 250 mg/l MAG C_{11:1} ($P \leq 0,001$).

Při srovnání antifungálních účinků MAG C_{11:0} a MAG C_{11:1} bylo vyhodnoceno, že přítomná nenasycená vazba výrazně ovlivňuje a zvyšuje účinnost sledované látky nejen proti plísním (**Tab. 15**), ale také proti sledovaným kvasinkám a gramnegativním bakteriím. Ne zcela průkazný je vliv této vazby na grampozitivní koky *S. aureus* a sporotvorné tyčinky *B. cereus*. Kabara [149] naproti tomu prokázal zvýšení antimikrobiálního účinku přítomností nenasycené vazby na spektru grampozitivních bakterií, avšak také kvasinek.

Tab. 13. Růst plísní na pevné půdě (Czapek-Dox agar) s přidavkem MAG C_{11:0} vyjádřen jako velikost kolonií v centimetrech (LSM ± SE).

Mikroorganismus	Doba kultivace (dny)	Koncentrace MAG C _{11:0} (mg/l)				
		0	250	500	750	1000
<i>Alternaria</i> sp.	7	5,50 ± 0,24 ^A	2,78 ± 0,24 ^B	2,07 ± 0,24 ^B	1,75 ± 0,24 ^B	1,72 ± 0,24 ^B
	14	5,50 ± 0,16 ^A	4,16 ± 0,16 ^B	4,16 ± 0,16 ^B	3,68 ± 0,16 ^B	3,77 ± 0,16 ^B
<i>Aspergillus niger</i>	7	3,56 ± 0,11 ^A	3,63 ± 0,11 ^A	2,73 ± 0,11 ^B	2,32 ± 0,11 ^B	2,12 ± 0,11 ^B
	14	4,43 ± 0,12	4,66 ± 0,12	4,53 ± 0,12	4,47 ± 0,12	4,33 ± 0,12
<i>Cladosporium</i> sp.	7	2,03 ± 0,15 ^A	1,15 ± 0,15	1,31 ± 0,15	1,27 ± 0,15	0,93 ± 0,15 ^B
	14	3,63 ± 0,11 ^A	3,45 ± 0,11	3,43 ± 0,11 ^A	3,12 ± 0,11	2,66 ± 0,11 ^B
<i>Mucor racemosus</i>	7	5,50 ± 0,10	5,50 ± 0,10	5,50 ± 0,10	5,50 ± 0,10	5,50 ± 0,10
	14	5,50 ± 0,10	5,50 ± 0,10	5,50 ± 0,10	5,50 ± 0,10	5,50 ± 0,10
<i>Phoma</i> sp.	7	3,85 ± 0,11 ^A	2,98 ± 0,11 ^{AB}	2,57 ± 0,11 ^B	2,47 ± 0,11 ^B	1,97 ± 0,11 ^B
	14	4,18 ± 0,10 ^A	3,15 ± 0,10 ^B	2,75 ± 0,10 ^B	2,60 ± 0,10 ^B	2,75 ± 0,10 ^B
<i>Scopulariopsis</i> sp.	7	3,87 ± 0,13 ^A	2,63 ± 0,13 ^{AB}	1,50 ± 0,13 ^B	1,40 ± 0,13 ^B	1,43 ± 0,13 ^B
	14	4,12 ± 0,18	3,88 ± 0,18	3,56 ± 0,18	3,28 ± 0,18	3,12 ± 0,18
<i>Trichoderma</i> sp.	7	4,32 ± 0,13 ^A	2,77 ± 0,13 ^B	2,32 ± 0,13 ^B	1,66 ± 0,13 ^B	1,52 ± 0,13 ^B
	14	5,50 ± 0,13 ^A	2,91 ± 0,13 ^B	2,51 ± 0,13 ^B	2,25 ± 0,13 ^B	2,37 ± 0,13 ^B
<i>Trichothecium</i> sp.	7	3,12 ± 0,15 ^A	2,27 ± 0,15 ^A	0,50 ± 0,15 ^B	0,83 ± 0,15 ^B	0,65 ± 0,15 ^B
	14	3,83 ± 0,29 ^A	2,18 ± 0,29	1,21 ± 0,29 ^B	1,63 ± 0,29 ^B	1,91 ± 0,29 ^B

Pozn. A, B Hodnoty s rozdílným písmenem v rámci řádku se od sebe signifikantně liší ($P \leq 0,001$).

Tab. 14. Růst plísní na pevné půdě (Czapek-Dox agar) s přidavkem MAG C_{11:1} vyjádřen jako velikost kolonií v centimetrech (LSM ± SE).

Mikroorganismus	Doba kultivace (dny)	Koncentrace MAG C _{11:1} (mg/l)				
		0	250	500	750	1000
<i>Alternaria</i> sp.	7	5,50 ± 0,23 ^A	2,47 ± 0,23 ^B	2,05 ± 0,23 ^B	1,47 ± 0,23 ^B	0,10 ± 0,23 ^B
	14	5,50 ± 0,21 ^A	2,61 ± 0,21 ^B	3,58 ± 0,21 ^B	3,66 ± 0,21 ^B	0,10 ± 0,21 ^B
<i>Aspergillus niger</i>	7	4,37 ± 0,17 ^A	2,23 ± 0,17 ^A	1,06 ± 0,17 ^B	1,10 ± 0,17 ^B	1,06 ± 0,17 ^B
	14	4,42 ± 0,17	4,06 ± 0,17	4,16 ± 0,17	3,56 ± 0,17	3,70 ± 0,17
<i>Cladosporium</i> sp.	7	1,92 ± 0,04 ^A	1,37 ± 0,04 ^{AB}	0,12 ± 0,04 ^B	0,10 ± 0,04 ^B	0,10 ± 0,04 ^B
	14	3,40 ± 0,15 ^A	2,77 ± 0,15 ^A	0,68 ± 0,15 ^B	0,10 ± 0,15 ^B	0,10 ± 0,15 ^B
<i>Mucor racemosus</i>	7	5,50 ± 0,12 ^A	5,50 ± 0,12 ^A	3,55 ± 0,12 ^B	2,97 ± 0,12 ^B	1,78 ± 0,12 ^B
	14	5,50 ± 0,10 ^A	5,50 ± 0,10 ^A	5,50 ± 0,10 ^A	3,91 ± 0,10 ^B	3,37 ± 0,10 ^B
<i>Phoma</i> sp.	7	2,16 ± 0,17 ^A	2,11 ± 0,17 ^A	2,03 ± 0,17 ^A	0,51 ± 0,17 ^B	0,52 ± 0,17 ^B
	14	3,70 ± 0,45	2,96 ± 0,45	2,93 ± 0,45	1,68 ± 0,45	1,35 ± 0,45
<i>Scopulariopsis</i> sp.	7	3,70 ± 0,11 ^A	2,77 ± 0,11 ^{AB}	1,51 ± 0,11 ^{AB}	0,32 ± 0,11 ^B	0,33 ± 0,11 ^B
	14	3,86 ± 0,35 ^A	3,50 ± 0,35 ^A	4,06 ± 0,35 ^A	2,61 ± 0,35	1,65 ± 0,35 ^B
<i>Trichoderma</i> sp.	7	4,26 ± 0,14 ^A	3,17 ± 0,14 ^{AB}	1,90 ± 0,14 ^B	1,57 ± 0,14 ^B	1,10 ± 0,14 ^B
	14	5,50 ± 0,11 ^A	3,13 ± 0,11 ^{AB}	2,02 ± 0,11 ^B	2,21 ± 0,11 ^B	1,65 ± 0,11 ^B
<i>Trichothecium</i> sp.	7	2,17 ± 0,06 ^A	1,05 ± 0,06 ^{AB}	0,43 ± 0,06 ^B	0,10 ± 0,06 ^B	0,10 ± 0,06 ^B
	14	3,12 ± 0,09 ^A	1,70 ± 0,09 ^{AB}	0,73 ± 0,09 ^{AB}	0,10 ± 0,09 ^B	0,10 ± 0,09 ^B

Pozn. A, B Hodnoty s rozdílným písmenem v rámci řádku se od sebe signifikantně liší ($P \leq 0,001$).

Tab. 15. Průměrné velikosti kolonií plísní (cm) vztažené k různé době kultivace a použitým monoacylglycerolům (LSM ± SE).

Doba kultivace (dny)	MAG C _{11:0}	MAG C _{11:1}
7	1,90 ± 0,03 ^A	1,17 ± 0,03 ^B
14	3,16 ± 0,05 ^A	2,19 ± 0,05 ^B

Pozn. A, B Hodnoty s rozdílným písmenem v rámci řádku se od sebe signifikantně liší ($P \leq 0,001$). *Mucor racemosus* nebyl zahrnut do této celkové analýzy.

4.3. Snižování kontaminace kuřecí kůže

Vybrané chemické látky byly na povrch chlazené drůbeže aplikovány několika způsoby – metodou potěru, ponoru a postřiku. Nejvyšší účinnost aplikace byla v laboratorních podmínkách pozorována při namáčení poloviny chlazeného kuřete do 500 ml sterilního dekontaminačního roztoku po dobu 1 minuty. Při této metodě dochází zřejmě k nejdokonalejšímu proniknutí testované látky do všech záhybů kůže. Obě další metody nedosahovaly při použití stejných koncentrací shodných výsledků. Navíc metodu potěru je možno využít pouze v laboratorních podmínkách. Nejlépe využitelnou metodou pro praxi je aplikace sledované látky za pomoci rozprašovače. Tento krok je snadné zařadit do výrobní linky a to ve fázi vzduchového chlazení.

4.3.1. Aplikace kyseliny citronové

Kyselina citronová byla na povrch chlazené drůbeže aplikována v koncentracích 2, 4, 6, 8 a 10 %. S rostoucí koncentrací kyseliny citronové se snižoval počet aerobních mezofilních bakterií a počet skupiny koliformních bakterií klesal do 48 hodin od aplikace kyseliny citronové ještě rapidněji. V literatuře se uvádí, že s výjimkou laktobacilů jsou psychrotrofní bakterie způsobující kažení (*Pseudomonas* sp., *Brochothrix thermosphacta*) a patogenní bakterie (*Listeria*, *Yersinia*, *Aeromonas*) obecně citlivější k organickým kyselinám než mezofilní enterobakterie [18].

Kyselina citronová měla významné inhibiční účinky na sledované skupiny bakterií až při aplikaci 4% a vyšší (**Tab. 16**). Kyselina citronová v 2% koncentraci byla popsána jako neúčinnější mezi různými chemickými látkami ve snížení počtů koliformních bakterií a kvasinek [93], což v této práci pozorováno nebylo (**Tab. 16**). Lze však spekulovat o tom, že vyšší koncentrace kyseliny citronové budou výrazněji ovlivňovat sensorické vlastnosti drůbeže. Na druhou stranu autor Río *et al.* [93] pozoroval při použití 2% kyseliny

citronové celkové senzoričké zlepšení oproti kontrole ještě po pěti dnech skladování. Antifungální účinek kyseliny citronové byl v této práci pozorovatelný pouze v rozmezí jednoho řádu, a to zejména do 48 hodin od aplikace 4% kyseliny citronové a vyšších koncentrací.

Bylo pozorováno, že bezprostředně po ošetření povrchu kyselinou citronovou došlo ke snížení pH (*Tab. 17*). Během chladírenského skladování se však tento rozdíl pozvolna snižoval. Snížení pH závisí přímo úměrně na koncentraci aplikovaného roztoku. Nejvýraznější rozdíl mezi hodnotou pH ošetřených vzorků a kontrolou byl bezprostředně po aplikaci roztoku kyseliny. Tehdy průměrná hodnota pH neošetřených vzorků dosáhla hodnoty $6,42 \pm 0,24$.

Tab. 16. *Přírůstek mikroorganismů vztažený ke kontrolnímu vzorku v 0 h (log CFU/g kůže) po aplikaci kyseliny citronové (průměr ± směrodatná odchylka).*

	Ošetření kyselinou citronovou (w/v)	Doba skladování (hod)			
		0	24	48	72
Mezofilní bakterie	0% (4,49±0,17)*	0±0,00 ^a A	1,04±0,25 ^a B	2,53±0,41 ^a C	3,19±0,41 ^a D
	2%	-0,17±0,24 ^{a,b} A	0,82±0,16 ^{a,b} B	2,10±0,51 ^{a,b} C	2,62±0,09 ^{a,b} C
	4%	-0,39±0,67 ^{a,b} A	0,33±0,49 ^{b,c} B	1,49±0,32 ^{b,c} C	2,26±0,20 ^b D
	6%	-1,06±0,91 ^b A	-0,43±0,31 ^c A	1,43±0,42 ^{b,c} B	2,45±0,03 ^{a,b} B
	8%	-0,53±1,04 ^{a,b} A	-0,63±1,30 ^d A	1,38±0,82 ^{b,c} B	2,39±0,72 ^b B
	10%	-1,05±0,68 ^b A	-0,85±0,55 ^d A	0,85±0,34 ^c B	1,85±0,63 ^b B
Koliformní bakterie	0% (3,95±0,32)*	0±0,00 ^a A	1,53±0,34 ^a B	3,04±0,44 ^a C	3,74±0,54 ^a D
	2%	-0,40±0,56 ^{a,b} A	1,37±0,38 ^a B	2,51±0,51 ^{a,b} B,C	3,02±0,22 ^{a,b} C
	4%	-0,60±1,45 ^{a,b} A	0,57±0,61 ^b A	2,08±0,51 ^b B	2,87±0,25 ^b B
	6%	-1,68±1,14 ^{b,c} A	-0,25±0,41 ^c A	1,85±0,70 ^{b,c} B	3,01±0,10 ^{a,b} B
	8%	-0,91±1,53 ^{a,b} A	-0,83±0,46 ^c A	1,74±0,84 ^{b,c} B	2,91±0,63 ^b B
	10%	-2,42±1,13 ^c A	-0,56±0,15 ^c B	1,16±0,43 ^c C	2,44±0,96 ^b C
Kvasinky	0% (3,85±0,53)*	0±0,00 ^a A	1,39±0,57 ^a B	2,98±0,59 ^a C	3,50±0,85 ^a D
	2%	-0,53±0,75 ^{a,b} A	0,96±0,88 ^a A,B	2,48±0,89 ^{a,b} B,C	3,39±0,39 ^a C
	4%	-0,18±0,91 ^{a,b} A	0,94±0,67 ^a B	2,11±0,58 ^b C	3,19±0,68 ^a C
	6%	-0,60±0,56 ^{a,b} A	0,39±0,60 ^a A,B	2,30±0,86 ^{a,b} B,C	3,51±1,34 ^a C
	8%	-0,44±0,86 ^{a,b} A	0,76±0,65 ^a B	2,40±0,66 ^{a,b} C	3,34±0,49 ^a C
	10%	-0,80±0,14 ^b A	0,66±0,10 ^a B	1,85±0,26 ^b C	3,14±0,28 ^a D

Pozn. k Tab. 16: Statistická analýza hodnot ($n = 4$) byla zpracována analýzou rozptylu (jednocestná ANOVA) a Duncanovým testem (pro vícečetná srovnání). Hodnoty v rámci sloupce (vliv ošetření) se stejným horním indexem se od sebe signifikantně neliší ($P \geq 0,05$); každá mikrobiální skupina byla hodnocena zvlášť. Hodnoty v rámci řádku (vliv doby skladování) se stejným velkým písmenem se signifikantně neliší ($P \geq 0,05$).

* Počáteční množství mikroorganismů na kontrolních vzorcích ošetřených vodou byly brány jako referenční hodnoty (voda 0 h skladování). Negativní hodnoty vyjadřují úbytek mikroorganismů.

Tab. 17. Hodnoty pH kuřecí kůže během 72 hodin skladování při 4 ± 2 °C (průměr \pm směrodatná odchylka) po aplikaci kyseliny citronové.

Ošetření	Doba skladování (hodiny)			
	0	24	48	72
voda	6,42 \pm 0,24 ^a A	6,71 \pm 0,34 ^a B	7,01 \pm 0,28 ^a C	7,32 \pm 0,16 ^a D
2%	5,23 \pm 0,87 ^{a,b} A	5,63 \pm 0,16 ^b A	6,12 \pm 0,22 ^{a,b} A	6,58 \pm 0,44 ^{a,b} A
4%	4,61 \pm 1,10 ^b A	5,23 \pm 0,37 ^b A,B	5,90 \pm 0,36 ^b A,B	6,30 \pm 0,58 ^b B
kyselina citronová (w/v) 6%	3,81 \pm 0,79 ^b A	4,90 \pm 0,45 ^b A	5,49 \pm 0,14 ^b A	5,82 \pm 0,11 ^b A
8%	4,28 \pm 1,18 ^b A	4,91 \pm 0,43 ^b A	5,43 \pm 0,59 ^b A	5,87 \pm 0,67 ^b A
10%	3,33 \pm 0,63 ^b A	4,52 \pm 0,31 ^b A,B	5,03 \pm 0,34 ^b B	5,60 \pm 0,53 ^b B

Statistická analýza hodnot pH ($n = 10$) byla zpracována analýzou rozptylu (jednocestná ANOVA) a Duncanovým testem (pro vícečetná srovnání). Hodnoty v rámci sloupce (vliv ošetření) se stejným horním indexem se od sebe signifikantně neliší ($P \leq 0,05$); každá mikrobiální skupina byla hodnocena zvlášť. Hodnoty v rámci řádku (vliv doby skladování) se stejným velkým písmenem se signifikantně neliší ($P \leq 0,05$).

4.3.2. Aplikace kyseliny mléčné

Inhibiční účinek kyseliny mléčné byl již dříve pozorován na různé gramnegativní [79; 150] a grampozitivní bakterie [88] na vepřovém a hovězím masu. Z výsledků této práce je patrné, že kyselina mléčná na kuřecí kůži způsobila výrazné zpoždění logaritmického růstu zejména mezofilních bakterií včetně koliformních (**Tab. 18**). Největší pokles počtu bakterií byl zaznamenán 24 hodin po aplikaci. Nicméně 48 hodin od aplikace začaly mikroorganismy růst exponenciálně.

Ošetření kuřecího masa kyselinou mléčnou v kombinaci se sorbanem draselným statisticky průkazně prodlužuje jeho údržnost (**Tab. 18, Tab. 19**). Samotný sorban draselný je znám svým účinkem především vůči kvasinkám a plísním, avšak také vůči celé řadě bakterií, včetně pseudomonád [151] a koliformních bakterií. Nedávno bylo publikováno, že 5% sorban draselný byl účinný při redukci psychrotrofní bakterie *Listeria monocytogenes* na čerstvé drůbeži po dobu 7 dní od aplikace [152]. Z výsledků vyplývá, že inhibiční efekt kyseliny mléčné je vhodně podpořen přídatkem sorbanu draselného, zvláště ve snížení počtu mezofilních a koliformních bakterií, které mohou zahrnovat nejen bakterie způsobující kažení, ale i bakterie patogenní, čímž se výrazně zvyšuje bezpečnost drůbežího masa a prodlužuje se jeho trvanlivost.

Tab. 18. Přírůstek mikroorganismů vztažený ke kontrolnímu vzorku v 0 h (log CFU/g kůže) po aplikaci kyseliny mléčné a sorbanu draselného (průměr ± směrodatná odchylka).

		Doba skladování (hod)			
Ošetření		0	24	48	72
Mezofilní bakterie	voda (5,13±0,56)*	0±0,00 ^a A	0,39±0,60 ^a B	0,66±0,54 ^a B	1,63±0,64 ^a C
	1% kyselina mléčná	-1,13±0,25 ^b A	0,44±0,47 ^a B	0,69±0,17 ^{a,b} B,C	1,00±0,24 ^b C
	2% kyselina mléčná	-1,84±0,37 ^c A	-0,61±0,76 ^b B	0,14±0,94 ^{a,b,c} B,C	0,93±0,74 ^b C
	0,2% sorban draselný	-0,26±0,56 ^a A	0,45±0,62 ^a A,B	-0,09±0,27 ^{b,c} A	1,07±0,11 ^{a,b} B
	kombinace 2%LA+0,2%PS**	-1,03±0,13 ^b A	-0,25±0,09 ^{a,b} B	-0,61±0,75 ^c A,B	-0,51±0,54 ^c A,B
Koliformní bakterie	voda (4,92±0,37)*	0±0,00 ^a A	0,18±0,32 ^a A	0,54±0,50 ^a B	1,42±0,63 ^a C
	1% kyselina mléčná	-1,14±0,63 ^b A	-0,24±0,41 ^{a,b} A,B	0,17±0,50 ^{a,b} B	0,86±1,34 ^{a,b} B
	2% kyselina mléčná	-3,36±1,48 ^c A	-0,83±0,10 ^b B	-0,46±0,27 ^c B,C	0,29±0,92 ^{b,c} C
	0,2% sorban draselný	-0,57±0,58 ^{a,b} A	-0,23±0,98 ^{a,b} A	-0,33±0,25 ^{b,c} A	0,32±0,38 ^{b,c} A
	kombinace 2%LA+0,2%PS	-1,61±0,61 ^b A	-0,68±0,64 ^b B	-0,68±0,26 ^c B	-0,34±0,06 ^c B

Pokračování Tab. 18

Kvasinky	voda (4,34±0,64)*	0±0,00 ^a A	0,47±0,36 ^a B	0,53±0,36 ^a B	0,60±0,48 ^a B
	1% kyselina mléčná	-0,74 ±0,42 ^b A	-0,17±0,50 ^b B	0,11±0,35 ^b B	0,22±0,32 ^{a,b} B
	2% kyselina mléčná	-0,46±0,29 ^{b,c} A	-0,18±0,36 ^b A	0,33±0,37 ^{a,b} B	0,48±0,47 ^{a,b} B
	0,2% sorban draselný	-0,26±0,65 ^{a,c} A	0,04±0,66 ^b A	-0,02±0,21 ^b A	0,03±0,11 ^b A
	kombinace 2%LA+0,2%PS	-0,64±0,16 ^{b,c} A	-0,67±0,17 ^b A	0,12±0,35 ^b B	0,54±0,21 ^{a,b} C
	Psychrotrofní bakterie	voda (6,02±0,73)*	0±0,00 ^a A	0,59±0,32 ^a B	1,26±0,69 ^a C
	1% kyselina mléčná	-1,06±0,38 ^b A	-0,39±0,16 ^b B	0,21±0,58 ^b C	1,55±0,68 ^{a,b} D
	2% kyselina mléčná	-1,78±0,63 ^c A	-0,85±0,10 ^c B	-0,16±0,30 ^b B	0,72±0,85 ^{b,c} C
	0,2% sorban draselný	-0,32±0,50 ^a A	0,62±0,16 ^a B	0,40±0,26 ^b B	1,18±0,19 ^{b,c} C
	kombinace 2%LA+0,2%PS	-1,51±0,04 ^{b,c} A	-1,07±0,69 ^c A,B	-0,43±0,51 ^b B,C	0,09±0,24 ^c C

* Počáteční množství mikroorganismů na kontrolních vzorcích ošetřených vodou byly brány jako referenční hodnoty (voda 0 h skladování). Negativní hodnoty vyjadřují úbytek mikroorganismů.

** LA – kyselina mléčná, PS – sorban draselný

Statistická analýza hodnot ($n = 4$) byla zpracována analýzou rozptylu (jednocestná ANOVA) a Duncanovým testem (pro vícečetná srovnání). Hodnoty v rámci sloupce (vliv ošetření) se stejným horním indexem se od sebe signifikantně neliší ($P \leq 0,05$); každá mikrobiální skupina byla hodnocena zvlášť. Hodnoty v rámci řádku (vliv doby skladování) se stejným velkým písmenem se signifikantně neliší ($P \leq 0,05$).

Tab. 19. *Přírůstek mikroorganismů vztažený ke kontrolnímu vzorku v 0 h (log CFU/g kůže) po aplikaci kyseliny mléčné a sorbanu draselného (průměr ± směrodatná odchylka) – porovnání dvou metod – ponor, postřík.*

	Ošetření	Doba skladování (hodiny)			
		0	24	48	72
mezofilní bakterie	voda † (5,15 ± 0,31)	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
koliformní bakterie (Endo agar)	voda † (4,35 ± 0,11)	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	3,07 ± 0,11 ^c C
koliformní bakterie a salmonely (XLD agar)	voda † (3,62 ± 0,49)	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
psychrotrofní bakterie	voda † (7,37 ± 0,03)	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

Pokračování Tab. 19

stafylokoky	voda † (3,86 ± 0,07)	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	voda † (5,05 ± 0,34)	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

† Počáteční množství mikroorganismů na kontrolních vzorcích ošetřených vodou byly brány jako referenční hodnoty (voda 0 h skladování). Negativní hodnoty v celé tabulce vyjadřují úbytek mikroorganismů oproti neošetřenému vzorku.

* 0,2% pr – 2% kyselina mléčná ve směsi s 0,2% sorbanem draselným aplikovaná ponorem; 0,5% pr – 2% kyselina mléčná ve směsi s 0,5% sorbanem draselným aplikovaná ponorem; 0,5% pk – 2% kyselina mléčná ve směsi s 0,5% sorbanem draselným aplikovaná postříkem.

Statistická analýza hodnot ($n = 4$) byla zpracována analýzou rozptylu (jednocestná ANOVA) a Duncanovým testem (pro vícečetná srovnání). Hodnoty v rámci sloupce (vliv ošetření) se stejným horním indexem se od sebe signifikantně neliší ($P \leq 0,05$); každá mikrobiální skupina byla hodnocena zvlášť. Hodnoty v rámci řádku (vliv doby skladování) se stejným velkým písmenem se signifikantně neliší ($P \leq 0,05$).

Vývoj pH u kontrolních vzorků byl stabilní, pohyboval se okolo hodnoty 6,5 (**Tab. 20**). 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 [86; 152]. V průběhu chladírenského skladování docházelo k postupnému zvyšování pH k hodnotám blízkým kontrolním vzorkům. Opětovný růst pH byl způsoben difúzí kyseliny mléčné do hlubších vrstev masa a také jejím rozkladem [87].

U vzorků, které byly ošetřeny ponorem do dekontaminační směsi, se pH v hodině 0 snížilo na průměrnou hodnotu $4,79 \pm 0,12$. Oproti kontrole nastal pokles o 1,69 jednotky. Vzorek ošetřený postřikem měl průměrné pH vyšší ($5,75 \pm 0,22$) a rozdíl oproti kontrole byl výrazně menší. Metoda ponoru měla tedy větší vliv na snížení hodnoty pH než metoda postřiku, což mohlo být způsobeno rovnoměrnější aplikací při ponoření celé poloviny kuřete. Během skladování došlo k vyrovnání pH u obou metod a nebyl statisticky významný rozdíl oproti kontrole.

Z **Tab. 17, 20** vyplývá, že hodnoty pH kůže chlazené drůbeže jsou silně ovlivněny přítomností organických kyselin, zejména ihned po aplikaci. Hodnoty pH klesají výrazně, většinou o více než tři jednotky. Antimikrobiální účinek organických kyselin je taktéž připisován účinku sníženého pH. Proto byla provedena korelační analýza mezi počtem mikroorganismů (mezofilní, koliformní, psychrotrofní bakterie a kvasinky) na kuřecí kůži a aktuální hodnotou pH za použití Pearsonova korelačního koeficientu. Pro korelační analýzu byla použita naměřená data u kyseliny citronové, kyseliny mléčné a jako doplněk byly použity hodnoty pro sorban draselný, u něhož se neočekával pokles pH. Výsledek korelační analýzy je uveden v **Tab. 21**. Významná korelace ($P \leq 0.001$) byla prokázána mezi počtem bakterií a kvasinek a hodnotou pH při aplikaci kyseliny citronové a mléčné. Jedním z principů mechanismu účinku organických kyselin je právě snižování pH [77]. Jelikož sorban draselný nesnižuje pH nemohl být prokázán ani vztah mezi úbytkem mikroorganismů a hodnotou pH.

Tab. 20. Hodnoty pH kuřecí kůže během 72 hodin skladování při 4 ± 2 °C (průměr \pm směrodatná odchylka) po aplikaci kyseliny mléčné, sorbanu draselného a jejich kombinací.

Ošetření	Doba skladování (hodiny)			
	0	24	48	72
voda	6,48 \pm 0,19 ^a A	6,40 \pm 0,21 ^a A	6,43 \pm 0,31 ^a A	6,54 \pm 0,37 ^a A
1% kyselina mléčná	3,70 \pm 0,20 ^b A	5,55 \pm 0,38 ^b B	5,99 \pm 0,28 ^{b,d} C	6,17 \pm 0,23 ^{b,c} C
2% kyselina mléčná	3,53 \pm 0,22 ^b A	5,26 \pm 0,34 ^b B	5,65 \pm 0,27 ^c C	5,98 \pm 0,20 ^{c,d} D
0,2% sorban draselný	6,34 \pm 0,20 ^a A	6,26 \pm 0,25 ^a A	6,26 \pm 0,24 ^{a,b} A	6,37 \pm 0,28 ^{a,b} A
2% kyselina mléčná +0,2% sorban draselný	3,73 \pm 0,12 ^b A	5,31 \pm 0,33 ^b B	5,74 \pm 0,45 ^{c,d} B,C	5,99 \pm 0,40 ^{b,d} C
2% kyselina mléčná +0,5% sorban draselný ponor	4,79 \pm 0,12 ^{a,b} A	5,53 \pm 0,21 ^b B	6,09 \pm 0,23 ^b C	6,74 \pm 0,33 ^a D
2% kyselina mléčná +0,5% sorban draselný postřik	5,75 \pm 0,22 ^a A	6,24 \pm 0,13 ^a B	6,32 \pm 0,14 ^{a,b} B	6,66 \pm 0,23 ^a C

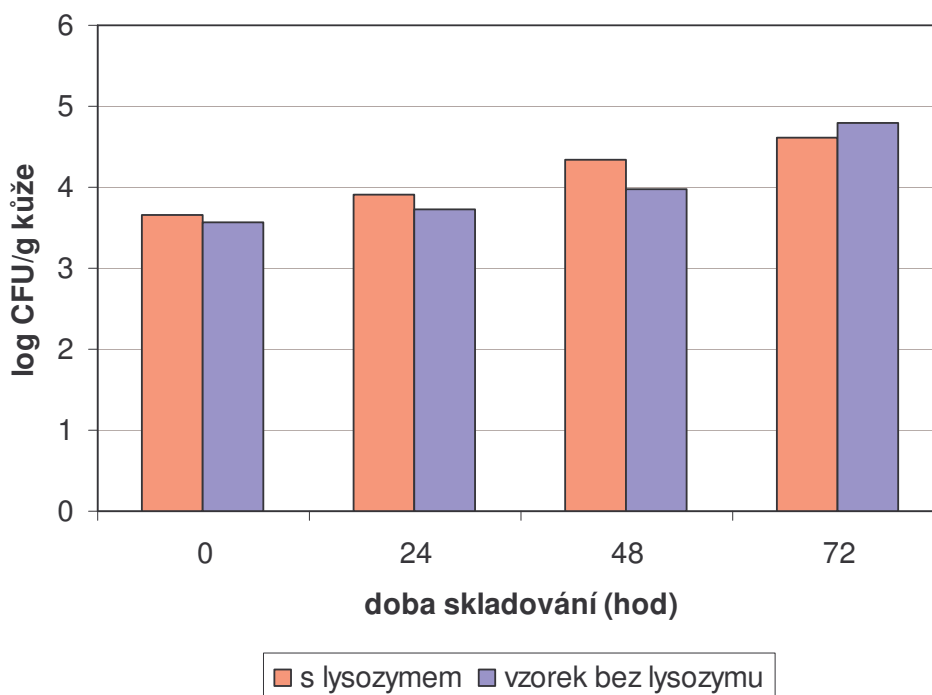
Statistická analýza hodnot pH ($n = 10$) byla zpracována analýzou rozptylu (jednocestná ANOVA) a Duncanovým testem (pro vícečetná srovnání). Hodnoty v rámci sloupce (vliv ošetření) se stejným horním indexem se od sebe signifikantně neliší ($P \leq 0,05$); každá mikrobiální skupina byla hodnocena zvlášť. Hodnoty v rámci řádku (vliv doby skladování) se stejným velkým písmenem se signifikantně neliší ($P \leq 0,05$).

Tab. 21. Pearsonův korelační koeficient – vztah mezi množstvím mikroorganismů na kuřecí kůži a hodnotou pH ovlivněnou organickými kyselinami.

Pearsonův korelační koeficient	kyselina citronová	kyselina mléčná	sorban draselný
mezofilní bakterie	0,8396*	0,8524*	0,5417
koliformní bakterie	0,8625*	0,8781*	0,4863
kvasinky	0,7518*	0,8535*	-0,0564
psychrotrofní bakterie	NT	0,8461*	0,1839

pozn. NT – netestováno; * statisticky významná korelace na hladině významnosti $P \leq 0,001$

Součástí práce bylo dále zjistit, zda enzym lysozym v kombinaci s kyselinou mléčnou má vliv na mikroflóru chlazené drůbeže. Lysozym má baktericidní účinky a je schopen štěpit glykosidické vazby v buněčné stěně grampozitivních bakterií. Po statistickém vyhodnocení pomocí regresních křivek bylo na 5% hladině významnosti zjištěno, že aplikované množství nemá žádný vliv na sledované skupiny mikroorganismů nacházejících se na kůži chlazené drůbeže. Jeho neúčinnost mohla být způsobena nízkou aplikační dávkou, která byla zvolena dle literatury [131] a také tím, že grampozitivní bakterie se na drůbeži vyskytují v menším zastoupení oproti gramnegativním (**Obr. 4**) a tudíž nedošlo k ovlivnění mikroflóry kůže chlazené drůbeže. Na obrázku (**Obr. 14**) je znázorněna dynamika růstu stafylokoků po aplikaci směsi 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného s lysozymem nebo bez v závislosti na době skladování. Z grafu je zřejmé, že přítomnost lysozymu významně neovlivňuje množení stafylokoků. Dá se tedy usoudit, že jeho aplikace v dávce 100 mg/l na kuřecí kůži nemá žádný inhibiční účinek na přítomnou grampozitivní mikroflóru.



Obr. 14. Množství stafylokoků na drůbeží kůži v průběhu chladírenského skladování po aplikaci směsi kyseliny mléčné a sorbanu draselného s lysozymem nebo bez lysozymu.

4.3.3. Aplikace kyseliny kaprylové

Kyselina kaprylová byla na povrch chlazených kuřat aplikována v rozmezí 0,5 - 4 % (**Tab. 22**). Významné snížení počtu aerobních mezofilních a koliformních bakterií bylo pozorováno při použití 3 a 4% kyseliny kaprylové přesto, že nedošlo k výraznému snížení pH (**Tab. 23**). Pro kyselinu kaprylovou, na rozdíl od kyseliny citronové, platilo, že úbytek kvasinek byl pozorovatelný až po 48 h skladování, a po 72 h byl nejnižší počet kvasinek zaznamenán na povrchu kuřat ošetřených 1%, 2% a 3% kyselinou kaprylovou. Jelikož kyselina kaprylová výrazně ovlivňovala organoleptické vlastnosti, zejména chuť, což bylo potvrzeno i následnou senzorkou analýzou, nebyly pokusy s aplikací na kuřecí kůži více opakovány. Ze stejného důvodu nejsou data vyhodnocena statisticky.

Tab. 22. Celkové počty mezofilních bakterií, koliformních bakterií a kvasinek během 72 hodin skladování při 4 ± 2 °C po aplikaci kyseliny kaprylové.

	Doba skladování (hodiny)	Kyselina kaprylová (v/v)					
		0 %	0,5 %	1 %	2 %	3 %	4 %
mezofilní bakterie	0	4,71	4,03	3,56	3,23	2,92	2,87
	24	5,40	4,76	4,40	3,77	3,20	3,97
	48	6,27	5,46	6,37	4,14	3,88	4,90
	72	7,02	6,08	7,01	4,61	4,73	5,16
koliformní bakterie	0	4,25	3,00	2,49	0,00	1,68	2,63
	24	5,03	4,60	4,43	1,40	1,78	3,95
	48	5,84	4,92	4,70	3,05	3,19	4,64
	72	6,60	5,58	5,55	3,06	3,31	5,36
kvasinky	0	4,14	4,67	4,52	3,04	2,26	4,01
	24	4,96	4,89	5,02	4,16	4,39	4,64
	48	5,88	7,38	6,21	4,96	5,21	6,25
	72	6,11	8,35	6,29	5,88	5,51	7,35

Tab. 23. Hodnoty pH kuřecí kůže během 72 hodin skladování při 4 ± 2 °C (průměr \pm směrodatná odchylka) po aplikaci kyseliny kaprylové.

Ošetření	Doba skladování (hodiny)			
	0	24	48	72
voda	6,34 \pm 0,16	6,36 \pm 0,16	6,44 \pm 0,24	6,61 \pm 0,13
0,5 %	6,35 \pm 0,16	6,22 \pm 0,29	6,30 \pm 0,25	6,53 \pm 0,37
kyselina 1,0 %	6,20 \pm 0,08	6,25 \pm 0,10	6,26 \pm 0,03	6,48 \pm 0,23
kaprylová 2 %	6,03 \pm 0,19	6,16 \pm 0,16	6,28 \pm 0,15	6,29 \pm 0,11
(v/v) 3 %	6,32 \pm 0,21	6,26 \pm 0,23	6,29 \pm 0,28	6,49 \pm 0,43
4 %	5,74 \pm 0,36	5,98 \pm 0,18	6,13 \pm 0,25	6,20 \pm 0,33

4.3.4. Aplikace monoacylglycerolů kyseliny undekanové a undecenové

Na povrch chlazené drůbeže byly aplikovány MAG C_{11:0} a MAG C_{11:1} ponořením do roztoku o koncentraci 500 mg/l. Byly sledovány celkové počty mezofilních mikroorganismů, koliformních bakterií, psychrotrofních bakterií, během 72 hodin skladování při 4 ± 2 °C (**Tab. 24**). Analýza pH ošetřené kuřecí kůže neodhalila statisticky významné změny oproti kontrole (**Tab. 25**). Počty mikroorganismů zjištěné na povrchu ošetřených kuřat byly srovnávány párovým t-testem s kontrolními, vodou ošetřenými vzorky. Nejvýraznější inhibiční efekt měly oba monoacylglyceroly na psychrotrofní bakterie. Počty však nebyly nikdy sníženy o více než 0,5 log CFU/g kůže. Růst ostatních skupin bakterií a kvasinek nebyl zásadnějším způsobem ovlivněn ani jedním z monoacylglycerolů. Za zmínku stojí zpomalení vývoje anaerobní mikroflóry v průběhu 3 dnů skladování. Slabý účinek může být způsoben použitou nízkou koncentrací, která však byla v *in vitro* testech účinná na většinu testovaných mikroorganismů. Na druhou stranu je nutno podotknout, že koncentrace nad 2000 mg/l se již nerozpouští ve vodě. Pro aplikace je zřejmě potřeba použití vyšších koncentrací, což může být předmět dalších experimentů.

Tab. 24. Počty mikroorganismů (log CFU/g kůže) po aplikaci MAG C_{11:0} a MAG C_{11:1} (průměr ± směrodatná odchylka) v průběhu 72 hodin skladování při 4 ± 2 °C.

	čas	kontrola	MAG C _{11:0}	kontrola	MAG C _{11:1}
Mezofilní bakterie	0	6,66±0,01	6,29±0,01*	5,65±0,14	5,71±0,19
	24	7,98±0,49	8,43±0,57	8,23±0,15	8,13±0,03
	48	8,91±0,17	8,36±0,07	8,51±0,53	8,71±0,36
	72	9,81±0,14	9,61±0,18	9,50±0,14	9,46±0,24
Koliformní bakterie	0	6,69±0,09	6,27±0,10*	5,67±0,08	5,67±0,08
	24	8,15±0,10	7,96±0,04	7,96±0,12	8,04±0,07
	48	8,20±0,15	8,00±0,38	7,80±0,56	8,37±0,07
	72	9,48±0,18	9,46±0,06	9,02±0,01	9,19±0,13
Stafylokoky	0	3,74±0,12	4,27±0,59	4,02±0,11	3,35±0,15*
	24	3,40±0,29	3,90±0,13	3,10±0,55	3,69±0,91
	48	3,31±0,01	3,42±0,04	2,69±0,12	3,39±0,10
	72	3,80±0,09	3,77±0,13	3,30±0,22	3,27±0,44
Kvasinky	0	5,40±0,22	5,67±0,08	5,41±0,08	4,75±0,09*
	24	7,42±0,05	7,48±0,24	6,74±0,14	7,01±0,10
	48	7,09±0,46	7,17±0,24	7,06±0,30	7,17±0,24
	72	7,96±0,22	8,00±0,28	8,44±0,59	7,86±0,12

Pokračování Tab. 24

	0	NT	NT	NT	NT
Anaerobní bakterie	24	8,37±0,25	8,22±0,18	8,18±0,17	8,25±0,11
	48	8,81±0,10	8,69±0,16	8,78±0,09	8,74±0,24
	72	9,29±0,07	8,88±0,23*	8,60±0,31	8,48±0,15
	0	8,07±0,10	8,17±0,18	7,53±0,23	6,77±0,18*
Psychrotrofní bakterie	24	9,67±0,05	9,40±0,05*	9,35±0,06	9,14±0,11*
	48	10,19±0,07	9,94±0,18*	9,86±0,06	10,00±0,22
	72	10,11±0,08	9,68±0,35*	9,81±0,11	9,44±0,25*

Získané hodnoty ($n = 4$) byly zpracovány statisticky Studentovým t-testem.

* - statisticky nižší hodnota oproti kontrole na hladině významnosti $P \leq 0,05$; NT – netestováno.

Tab. 25. Hodnoty pH kuřecí kůže během 72 hodin skladování při 4 ± 2 °C (průměr \pm směrodatná odchylka) po aplikaci MAG C_{11:0} a MAG C_{11:1}.

Doba skladování (hod)	kontrola (voda)	MAG C _{11:0}	MAG C _{11:1}
0	6,38±0,13	6,41±0,18	6,34±0,04
24	6,54±0,21	6,53±0,57	6,62±0,61
48	6,93±0,44	7,11±0,85	6,82±0,72
72	6,91±0,49	7,13±0,46	7,35±0,37

4.4. Senzorická analýza

Senzorická analýza byla provedena na kuřecích stehnech po aplikaci 10% kyseliny citronové, 2% kyseliny kaprylové, 500 mg/l MAG C_{11:0}, 500 mg/l MAG C_{11:1}, směsi 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného a vody jako kontroly. Hodnocení bylo provedeno v syrovém (0 a 72 hodin) a tepelně opracovaném stavu (pouze 0 hodin). Po 72 hodinách skladování již většina vzorků nepříjemně zapáchala a proto bylo hodnocení tepelně opracovaného masa zrušeno. Výsledky jsou shrnuty v **Tab. 26** jako hodnoty mediánu.

Tab. 26. Senzorická analýza kuřecích stehen ošetřených kyselinou citronovou, kyselinou kaprylovou a směsí LA - PS.

Znak	Doba skladování (hod)	Úprava	Kůže/ maso	Ošetření					
				voda	CA *	KA *	LA – PS směs *	MAG C _{11:0}	MAG C _{11:1}
Barva a vzhled	0	syrové	kůže	2 ^a A	3 ^a B	2 ^a B	2 ^a A	2 ^a A	2 ^a A
	0	pečené	kůže	2 ^a A	2 ^b A	2 ^a A	2 ^a A	2 ^a A	2 ^a A
	72	syrové	kůže	3 ^a A,B	3 ^a A,B	2 ^a A,B	2 ^a B	2 ^a B	3 ^a A
Vůně	0	syrové	kůže	3 ^a A,B	3 ^a A	4 ^a B	3 ^a A	3 ^a A	3 ^a A
	0	pečené	kůže	2 ^a A	4 ^b B,C	5 ^a B	3 ^a A,C	2 ^a A	2 ^a A
	72	syrové	kůže	4 ^b A	4 ^b A,B	4 ^a A	3 ^a B,C	5 ^b C	4 ^b A,C
Chuť **	0	pečené	kůže	2 ^a A	5 ^a B	4 ^a B,C	2 ^a A,C	2 ^a A	2 ^a A
	0	pečené	maso pod kůží †	2 ^a A,B	3 ^b C	3 ^a A,C	2 ^a A,B,C	1 ^a B	2 ^a A,B
Nečisté pachy a pachutě	0	syrové	kůže	4 ^a A,B	2 ^a A	5 ^a B	3 ^a A,B	3 ^a A	3 ^a A
	0	pečené	kůže	2 ^b A	6 ^b B	6 ^a C	3 ^a A,B	1 ^b A	3 ^a A,B
	0	pečené	maso pod kůží †	2 ^b A,B	3 ^c A	4 ^b A	2 ^a A,B	1 ^b B	1 ^b B
	72	syrové	kůže	6 ^c A	5 ^d A,B	5 ^a A	4 ^a B	7 ^c B	6 ^c A,B

Senzorické hodnocení ($n = 12$) bylo zpracováno 7-bodovou hédonickou stupnicí (1 – výborný, 4 – dobrý, 7 – velmi špatný, nepřijatelný) a je vyjádřeno jako medián. ^{a, b} Hodnoty v témže sloupci (účinek času a/nebo ošetření) se stejným písmenem se od sebe signifikantně neliší ($P \geq 0.05$); každý sledovaný znak byl vyhodnocen zvlášť. A, B Hodnoty v rámci řádku (účinek testovaných látek) se stejným písmenem se od sebe signifikantně neliší ($P \geq 0.05$).

* LA - PS – směs 2% kyseliny mléčné a 0,2% sorbanu draselného; CA – 10% kyselina citronová; KA – 2% kyselina kaprylová

** Chuť u syrového masa nebyla hodnocena.

† Tepelně opracované kuřecí maso bylo zvlášť hodnoceno jako kůže a maso pro chuť a nečisté pachy/pachutě.

Vzhled syrového masa ošetřeného kyselinou citronovou byl světlejší než kontrola, zatímco po 72 hodinách skladování rozdíl od kontroly nebyl významný (kontrola se zhoršila). U syrového masa byla vůně ovlivněna pouze u vzorků ošetřených kyselinou kaprylovou. U ostatních se nečisté pachy objevily až po upečení, kromě vzorku ošetřeného směsí kyseliny mléčné a sorbanu draselného, u něhož došlo ke statisticky významnému zlepšení vůně oproti kontrole. Chuťově nejlépe, avšak ne statisticky významně oproti kontrole, byly hodnoceny vzorky ošetřené MAG C_{11:0}. Na stejné úrovni jako kontrola byly hodnoceny vzorky ošetřené kyselinou mléčnou a MAG C_{11:1}. Za nejhorší a statisticky významně odlišné byly označeny vzorky ošetřené kyselinou citronovou a kyselinou kaprylovou. Nejzajímavějším a nejvýznamnějším ($P \geq 0.05$) výsledkem je lepší hodnocení ve srovnání s kontrolou u vzorku ošetřeného kyselinou mléčnou pro znaky vůně a nečisté pachy po 72 hodinách skladování. V žádném z ostatních hodnocení nebyly vzorky s kyselinou mléčnou hodnoceny statisticky průkazně hůř než kontrola.

V pořadovém testu byly jako nejhorší vyhodnoceny vzorky s kyselinou citronovou a kyselinou kaprylovou. Nejlépe byl hodnocen vzorek ošetřený MAG C_{11:0}, dále následovala kontrola, vzorek ošetřený MAG C_{11:1} a vzorek ošetřený kyselinou mléčnou. Nicméně, vzorek ošetřený kyselinou mléčnou nebyl statisticky významně odlišný ani od kontroly, ale ani od kyseliny citronové či kaprylové. Předchozí výsledky ovšem naznačují, že použití 1 – 2% kyseliny mléčné významně snižuje mikrobiální počty na povrchu drůbeže bez ovlivnění organoleptických vlastností jako jsou barva, chuť a vůně, což již bylo pozorováno dříve [153].

PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

V posledních letech drůbeží maso neustále stoupá u konzumentů v oblibě. Dokonce je již několik let jeho spotřeba vyšší, než spotřeba hovězího masa. Drůbeží maso je však na druhou stranu také zdrojem rozmanitých infekcí, zejména gastrointestinálních. Proto je kladen velký důraz na bezpečnost masa a masných výrobků. Producenty zase zajímá možnost prodloužení trvanlivosti. Cílem této práce bylo zmapovat složení mikroflóry kůže chlazených kuřat z obchodní sítě a otestovat účinek aplikace dekontaminačních látek vedoucí ke zvýšení bezpečnosti a prodloužení údržnosti.

Přínos pro vědu:

- ✓ komplexní pohled na mikroflóru chlazených nebalených kuřat z obchodní sítě;
- ✓ vytvoření a podrobná mikrobiologická charakteristika rozsáhlé sbírky bakteriálních kmenů z kuřecí kůže;
- ✓ zjištění výskytu kolicinogenie a typu kolicinu u produkčních kmenů *Escherichia coli* izolovaných z kuřecí kůže;
- ✓ studium vlivu vybraných chemických látek na mikroflóru kůže chlazené drůbeže.

Přínos pro praxi:

- ✓ zjištění četnosti patogenních bakterií u chlazené drůbeže vyrobené po zákazu plošného užívání antibiotik u drůbeže;
- ✓ sledování výskytu rezistentních kmenů *Escherichia coli* u chlazené drůbeže;
- ✓ sledování stavu mikrobiální kontaminace chlazených kuřat v průběhu zpracování na výrobní lince;
- ✓ navržení možnosti aplikace konkrétního dekontaminačního roztoku při technologickém postupu výroby chlazené drůbeže.

ZÁVĚR

Byla podrobně prozkoumána mikroflóra kůže chlazených kuřat a vytvořena sbírka bakteriálních izolátů, která je uchovávána na Ústavu technologie a mikrobiologie potravin FT UTB ve Zlíně. Sbírkou bakteriálních izolátů je využívána k dalším výzkumným účelům.

Ukázalo se, že nejpočetnější skupinou bakterií vyskytující se na kůži chlazené drůbeže byly gramnegativní fermentující KAT+ OXI- tyčinky (43,3 %) s nejčastějšími zástupci *Escherichia coli*, *Pantoea* sp. Ani v jednom případě nebyla potvrzena přítomnost bakterie *Salmonella* sp. na kuřecí kůži. Další skupiny (gramnegativní fermentující KAT+ OXI+ tyčinky; grampozitivní koky) se vyskytovaly s četností 18,4 % a 14,9 % z celkového počtu izolátů. U gramnegativních nefermentujících KAT+ OXI+ tyčinek byl nejčastěji identifikován rod *Pseudomonas*. Gramnegativní nefermentující KAT+ OXI- a grampozitivní tyčinky byly zastoupeny v nejmenší míře. Žádný kmen nebyl identifikován jako *Listeria monocytogenes*.

V práci byly dále sledovány antimikrobiální účinky vybraných látek, které by mohly být použity pro záměr snížení kontaminace kůže chlazených kuřat. Na zástupce gramnegativních fermentujících a nefermentujících tyčinek a grampozitivních koků byla z organických kyselin nejúčinnější kyselina octová, která však pro další testování byla zavržena z důvodu silného ovlivnění organoleptických vlastností kuřecího masa. Další v pořadí byla kyselina sorbová, která je ve vodném prostředí špatně rozpustná, proto pro aplikaci na drůbeží kůži byla vybrána její draselná sůl, která je v potravinářství běžně používána. Pokud byla kyselina citronová použita v koncentraci 0,1 % měla též výrazný inhibiční efekt na použité čisté bakteriální kultury.

U kyseliny olejové nebyly prokázány výrazné redukční účinky na bakterie v daném systému, proto byla pro další aplikace vybrána lépe účinkující kyselina kaprylová. Součástí této práce bylo dále otestovat antimikrobiální účinky netradičních monoacylglycerolů (MAG C_{11:0}, MAG C_{11:1}) na spektrum mikroorganismů. Byla prokázána statisticky vysoce významná inhibice zejména některých plísní, což rozšiřuje možnosti aplikace těchto netradičních monoacylglycerolů. Účinnější se jevil monoacylglycerol kyseliny undecenové, což by mohlo být způsobeno přítomností dvojné vazby v jeho molekule.

Při aplikaci dekontaminačních roztoků na povrch chlazené drůbeže byly testovány tři metody. Metoda potěru není vhodná z důvodu nerovnoměrnosti aplikace roztoku. Obdobné zkušenosti byly pozorovány u metody postřiku, avšak tato metoda se bude ještě zdokonalovat. Nejjednodušší a nejrychlejší metodou aplikace v laboratorních podmínkách byla metoda ponoru kuřat do roztoku po dobu jedné minuty. Jelikož jsou kuřata v České republice chlazená výhradně vzduchem, není možné použít aplikaci ponorem v praxi.

Vhodným doplněním práce by bylo vyzkoušet aplikaci dekontaminačního roztoku postřikem přímo ve výrobě.

Aplikace kyseliny citronové a kaprylové sice silně snižovala kontaminaci kuřecí kůže, avšak při sensorické analýze byly vyhodnoceny jako nepoužitelné. Kvalita drůbežího masa se dá zlepšit aplikací kyseliny mléčné v kombinaci se sorbanem draselným. Aplikace této směsi neovlivňuje vzhled, vůni ani chuť drůbežího masa, naopak zvyšuje bezpečnost a prodlužuje údržnost. Neošetřené vzorky po 72 hodinách přesahovaly hranice přijatelnosti nejen ze sensorického hlediska, ale také z hlediska vysokého počtu mikroorganismů.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] *Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 1999-2008 – absolutně* [online]. [cit. 13. dubna 2009]. Dostupné z: <<http://www.szu.cz/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-1998-2007-absolutne>>
- [2] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 853/2004, ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. *Úř. věst.* 2004, L 139, s. 55.
- [3] Vyhláška č. 326/2001 Sb., ze dne 30. srpna 2001, kterou se provádí § 18 písm. a), d), g), h), i) a j) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich, v platném znění. *Sbírka zákonů*, 2001, č. 126, s. 7414-7444.
- [4] SIMEONOVÁ, J. a kol. *Technologie drůbeže, vajec a minoritních živočišných produktů*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1999. 247 s.
- [5] PETR, J., LOUDA, F. *Produkce potravinářských surovin*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 1998. 213 s.
- [6] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 178/2002, ze dne 28. ledna 2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin. *Úř. věst.* 2002, L 31, s. 1.
- [7] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 852/2004, ze dne 29. dubna 2004 o hygieně potravin. *Úř. věst.* 2004, L 139, s. 1.
- [8] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 854/2004, ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní pravidla pro organizaci úředních kontrol produktů živočišného původu určených k lidské spotřebě. *Úř. věst.* 2004, L 139, s. 206.
- [9] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 882/2004, ze dne 29. dubna 2004 o úředních kontrolách za účelem ověření dodržování právních předpisů týkajících se krmiv a potravin a pravidel o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat. *Úř. věst.* 2004, L 191, s. 201.
- [10] NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005, ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. *Úř. věst.* 2005, L 338, s. 1.

- [11] NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1441/2007, ze dne 5. prosince 2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. *Úř. věst.* 2007, L 322, s. 12.
- [12] Zákon 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. *Sbírka zákonů*, 1997, č. 38, s. 2178-2188.
- [13] Vyhláška č. 4/2008 Sb., ze dne 3. ledna 2008, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin, v platném znění. *Sbírka zákonů*, 2008, č. 3, s. 258-340.
- [14] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1831/2003, ze dne 22. září 2003, o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat. *Úř. věst.* 2003, L 268, s. 29.
- [15] *Retrospektivní údaje o spotřebě potravin v letech 1920 – 2006* [online]. [cit. 12. září 2008]. Dostupné z: <<http://www.czso.cz/csu/2008edicniplan.nsf/p/3014-08>>
- [16] *Spotřeba vepřového, hovězího a drůbežího masa v ČR v letech 1948-2006 (kg/obyvatele/rok)* [online]. [cit. 12. září 2008]. Dostupné z: <<http://www.czso.cz/csu/2008edicniplan.nsf/tab/9500293E45>>.
- [17] GOULD, G.W. *New Methods of Food Preservation*. 1st ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1995. 324 s. ISBN 0-8342-1341-9.
- [18] SMULDERS, F.J.M., GREER, G.G. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *Int. J. Food Microbiol.* 1998, vol. 44, s. 149-169.
- [19] OLIVEIRA, S.J., MORAES, H.L.S., KUCHENBECKER, B.S., IKUTA, N., LUNGE, V., FONSECA, A., COIRO, J.R. Isolation of *Arcobacter* spp. from poultry carcasses, in Brazil. *Ciencia Rural*. 2001, vol. 31, s. 639-643.
- [20] ICMSF – INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. *Microorganisms in Foods 6*. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. 763 s. ISBN 0-306-48675-X.
- [21] BLACBURN, C. *Food Spoilage Microorganisms*. 1st ed. New York: CRC Press, 2006. 712 s. ISBN 0-8493-9156-3.
- [22] GÖRNER, F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho*

- pôvodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami.* 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [23] HINTON, A., CASON, J.A., INGRAM, K.D. Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, vol. 91, s. 155-165.
- [24] EGAN, A.F. Lactic acid bacteria of meat and meat products. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1983, vol. 49, s. 327-336.
- [25] ISMAIL, S.A.S., DEAK, T., ABD EL-RAHMAN, H.A., YASSIEN, M.A.M., BEUCHAT, L.R. Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, vol. 62, s. 113-121.
- [26] FOLEY, S.L., LYNNE, A.M., NAYAK, R. Salmonella challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *J. Anim. Sci.* 2008, vol. 86, s. E149-162.
- [27] BRADEN, C.R. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 2006, vol. 43, s. 512-517.
- [28] ANTUNES, P., RÉU, C., SOUSA, J.C., PEIXE, L., PESTANA, N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, vol. 82, s. 97-103.
- [29] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot.* 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [30] KARMALI, M.A. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. microbiol. rev.* 1989, vol. 2, s. 15-38.
- [31] GRIFFIN, P.M., TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 1991, vol. 13, s. 60-98.
- [32] KAPLAN, B.S., MCGOWAN, K.L. Hemolytic uremic syndrome. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 1994, vol. 7, s. 351-357.
- [33] LUKÁŠOVÁ, J., ABRAHAM, B., CUPÁKOVÁ, Š. Occurrence of *Escherichia coli* O157 in raw material and food in Czech Republic. *J. Vet. Med.* 2004, vol. B 51, s. 77-81.
- [34] VOTAVA, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální.* 1. vyd. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
- [35] WILLERT, C.M. *E. coli* meningitis: K1 antigen and virulence. *Annu. Rev. Med.* 1978, vol. 29, s. 129-136.

- [36] DOZOIS, C.M., CLEMENT, S., DESAUTELS, C., OSWALD, E., FAIRBROTHER, J.M. Expression of P, S, and F1C adhesins by cytotoxic necrotizing factor 1-producing *Escherichia coli* from septicemic and diarrheic pigs. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, vol. 152, s. 307-312.
- [37] LI, G., LATURNUS, C., EWERS, C., WIELER, L.H. Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis. *Infect. Immun.* 2005, vol. 73, s. 2818-2827.
- [38] BEDNÁŘ, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996. 558 s.
- [39] LOCHMANN, O. *Základy antimikrobní terapie*. 2. vyd. Praha: Triton, 1999. 127 s. ISBN 80-7254-005-X.
- [40] ROSYPAL, S. *Úvod do molekulární biologie*. Díl třetí. 3. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000. 297 s. ISBN 80-902562-2-8.
- [41] *Keep Antibiotics Working. Significant Science on Antibiotic Resistance: An Annotated Bibliography* [online]. [cit. 17. dubna 2009]. Dostupné z: <http://www.keepantibioticsworking.com/new/indepth_keyevid.cfm#farmersatrisk>
- [42] THRELLFALL, E.J., FISHER, I.S., BERGHOLD, C., GERNER-SMIDT, P., TSCHÄPE, H., CORMICAN, M., LUZZI, L., SCHNEIDER, F., WANNET, W.J., MACHADO, J., EDWARDS, G. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro. Surveill.* 2003, vol. 8(2):pii=400 [online]. [cit. 21. února 2009]. Dostupné z: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=400>>
- [43] MBATA, T.I. Poultry meat pathogens and its control. *Internet J. Food Saf.* 2005, vol. 7, s. 20-28.
- [44] ROBICSEK, A., JACOBY, G.A., HOOPER, D.C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.* 2006, vol. 6, s. 629-640.
- [45] JOHNSON, J.R., MURRAY, A.C., GAJEWSKI, A., SULLIVAN, M., SNIPPES, P., KUSKOWSKI, M.A., SMITH, K.E. Isolation and molecular characterization of nalidix acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, vol. 47, s. 2161-2168.
- [46] KOLÁŘ, M., PANTUČEK, R., BARDOŇ, J., VÁGNEROVÁ, I., TYPOVSKÁ, H., DOŠKAŘ, J., VÁLKA, I. Occurrence of antibiotic-resistant bacterial strains isolated in poultry. *Vet. Med. Czech.* 2002, vol. 47, s. 52-59.

- [47] *European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) interactive database* [online]. [cit. 21. února 2009]. Dostupné z: <<http://www.rivm.nl/earss/database>>
- [48] BRUINSMA, N., EARSS. Trends in antimicrobial resistance in Europe: report from EARSS. *Euro Surveill.* 2004, vol. 8(51):pii=2603 [online]. [cit. 31. ledna 2009]. Dostupné z: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2603>>
- [49] *The European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS)* [online]. [cit. 31. ledna 2009]. Dostupné z: <<http://www.earss.rivm.nl>>
- [50] LEE, J.H. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, vol. 69, s. 6489-6494.
- [51] FELTEN, A., GRANDRY, B., LAGRANGE, P. H., CASIN, I. Evaluation of Three Techniques for Detection of Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a Disc Diffusion Method with Cefoxitin and Moxalactam, the Vitek 2 System, and the MRSA-Screen Latex Agglutination Test. *J. Clin. Microbiol.* 2002, vol. 40, s. 2766-2771.
- [52] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin – United States, 2002. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2002, vol. 51, s. 565-567.
- [53] ŠMARDA, J., ŠMAJS, D. Colicins – exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol.* 1998, vol. 43, s. 563-582.
- [54] ŠMARDA, J., ŠMAJS, D., LHOTOVÁ, H. Three recently acknowledged *Escherichia* species strikingly differ in the incidence of bacteriocinogenic and lysogenic strains. *J. Basic Microbiol.* 2002, vol. 42, s. 429-433.
- [55] ŠMARDA, J., OBDRŽÁLEK, V. Incidence of colicinogenic strains among human *Escherichia coli*. *J. Basic Microbiol.* 2001, vol. 41, s. 367-374.
- [56] GUASCH, J.F., ENFEDAQUE, J., FERRER, S., GARGALLO, D., REGUÉ, M. Bacteriocin 28b, a chromosomally encoded bacteriocin produced by most *Serratia marcescens* biotypes. *Res. Microbiol.* 1995, vol. 146, s. 477-483.
- [57] CASCALES, E., BUCHANAN, S.K., DUCHÉ, D., KLEANTHOUS, C., LLOUBÈS, R., POSTLE, K., RILEY, M., SLATIN, S., CAVARD, D. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2007, vol. 71, s. 158-229.

- [58] SEVERINOV, K., SEMENOVA, E., KAZAKOV, A., KAZAKOV, T., GELFAND, M.S. Low-molecular-weight post-translationally modified microcins. *Mol. Biol.* 2007, vol. 65, s. 1380-1394.
- [59] POEY, M.E., AZPIROZ, M.F., LAVIÑA, M. Comparative analysis of chromosome-encoded microcins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, vol. 50, s. 1411-1418.
- [60] PONS, A., DELALANDE, F., DUARTE, M., BENOIT, S., LANNELUC, I., SABLÉ, S., VAN DORSSELAER, A., COTTENCEAU, G. Genetic analysis and complete primary structure of microcin L. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, vol. 48, s. 505-513.
- [61] ŠMAJS, D., DOLEŽALOVÁ, M., MACEK, P., ŽÍDEK, L. Inactivation of colicin Y by intramembrane helix-helix interaction with its immunity protein. *FEBS J.* 2008, vol. 275, s. 5325-5331.
- [62] VAN DER WAL, F.J., LUIRINK, J., OUDEGA, B. Bacteriocin release proteins: mode of action, structure, and biotechnological application. *FEMS Microbiol. Rev.* 1995, vol. 17, s. 381-399.
- [63] ALTENHOEFER, A., OSWALD, S., SONNENBORN, U., ENDERS, C., SCHULZE, J., HACKER, J., OELSCHLAEGER, T.A. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteoinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2004, vol. 40, s.223-229.
- [64] CHUMCHALOVÁ, J., ŠMARDÁ, J. Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. *Folia Microbiol.* 2003, vol. 48, s. 111-115.
- [65] PATTON, B.S., DICKSON, J.S., LONERGAN, S.M., CUTLER, S.A., STAHI, C.H. Inhibitory activity of colicin E1 against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protection.* 2007, vol. 70, s. 1256-1262.
- [66] GORDON, D.M., O'BRIEN, C.L. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology.* 2006, vol. 152, s. 3239-3244.
- [67] TSEN, H.Y., LIN, C.K., CHI, W.R. Development and use of 16S rRNA gene targeted PCR primers for the identification of *Escherichia coli* cells in water. *J. Appl. Microbiol.* 1998, vol. 85, s. 554-560.
- [68] LEHNER, A., TASARA, T., STEPHAN, R. 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. *BMC Microbiol.* 2004, vol. 4, art. no. 43.
- [69] LEISTNER, L., GORRIS, L.G.M. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.* 1995, vol. 6, s. 41-46.

- [70] PIPEK, P., HOUŠKA, M., JELENÍKOVÁ, J., KÝHOS, K., HOKE, K., ŠIKULOVÁ, M. Microbial decontamination of beef carcasses by combination of steaming and lactic acid spray. *J. Food Eng.* 2005, vol. 67, s. 309-315.
- [71] PIPEK, P., HOUŠKA, M., HOKE, K., JELENÍKOVÁ, J., KÝHOS, K., ŠIKULOVÁ, M. Decontamination of pork carcasses by steam and lactic acid. *J. Food Eng.* 2006, vol. 74, s. 224-231.
- [72] JAMES, C., GÖKSOY, E. O., CORRY, J. E. L., JAMES, S. J. Surface pasteurisation of poultry meat using steam at atmospheric pressure. *J. Food Eng.* 2000, vol. 45, s. 111-117.
- [73] FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 1998, vol. 44, s. 189-204.
- [74] AYMERICH, T., PICOUET, P.A., MONFORT, J.M. Decontamination technologies for meat products. *Meat Sci.* 2008, vol. 78, s. 114-129.
- [75] CORRY, J.E.L., JAMES, C., JAMES, S.J., HINTON, M. *Salmonella*, *Campylobacter* and *Escherichia coli* O157:H7 decontamination techniques for the future. *Int. J. Food Microbiol.* 1995, vol. 28, s. 187-196.
- [76] SUKOVÁ, I. *Alternativní technologie výroby sterilovaných nekyselých potravin* [online]. [cit. 20. září 2008]. Dostupné z: <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=&typ=1&val=27124&ids=421>>
- [77] JAY, J.M. *Modern Food Microbiology*. 6th ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. 627 s. ISBN 0-8342-1671-X.
- [78] ANANG, D.M., RUSUL, G., BAKAR, J., LING, F.H. Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in chicken breast stored at 4 °C. *Food Control*. 2007, vol. 18, s. 961-969.
- [79] PIPEK, P., FÍLA, P., JELENÍKOVÁ, J., BRYCHTA, J., MIYAHARA, M. Technological aspects of acid decontamination of carcasses. *Chemické Listy*. 2004, vol. 98, s. 865-869.
- [80] VIRTO, R., SANZ, D., ÁLVAREZ, I., CONDÓN, RASO, J. Inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* by citric and lactic acid at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 2005, vol. 103, s. 251-257.
- [81] STIVARIUS, M.R., POHLMAN, F.W., McELYEA, K.S., APPLE, J.K. The effects of acetic acid, gluconic acid and trisodium citrate treatment

- of beef trimmings on microbial, color and odor characteristics of ground beef through simulated retail display. *Meat Sci.* 2002, vol. 60, s. 245-252.
- [82] HINTON, A. JR, INGRAM, K.D. Use of oleic acid to reduce the population of the bacterial flora of poultry skin. *J. Food Prot.* 2000, vol. 63, s. 1282-1286.
- [83] NAIR, M.K.M., VASUDEVAN, P., HOAGLAND, T., VENKITANARAYANAN, K. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in milk by caprylic acid and monocaprylin. *Food Microbiol.* 2004, vol. 21, s. 611-616.
- [84] 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, vol. 70, s. 3506 – 3511.
- [85] PIPEK, P., BŘEZINA, P., JELENÍKOVÁ, J., BRYCHTA, J., Aditiva a údržnost. *Maso.* 1997, č. 6, s. 45 – 48.
- [86] KOLSARICI, N., CANDOGAN, K. The effects of potassium sorbate and lactic acid on the shelf-life of vacuum-packed chicken meats. *Poult. Sci.* 1995, vol. 74, s. 1884-1893.
- [87] PIPEK, P., BOUCHNER, P., KADAŇOVÁ, V., BAČO, B. Použití kyseliny mléčné k dekontaminaci povrchu masa. *Maso.* 1996, č. 5, s. 40 – 44.
- [88] GREER, G.G., DILTS, B.D. Lactic acid inhibition of the growth of spoilage bacteria and cold tolerant pathogens on pork. *Int. J. Food Microbiol.* 1995, vol. 25, s. 141-151.
- [89] RAZAVI-ROHANI, S.M., GRIFFITHS, M.W. Antifungal effects of sorbic acid and propionic acid at different pH and NaCl conditions. *J. Food Saf.* 1999, vol. 19, s. 109–120.
- [90] MENDONCA, A.F., MOLINS, R.A., KRAFT, A.A., WALKER, H.W. Effects of potassium sorbate, sodium acetate, phosphates and sodium chloride alone or in combination on shelf life of vacuum-packaged pork chops. *J. Food Sci.* 2006, vol. 54, s. 302-306.
- [91] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin.* 1. vyd. Praha: SNTL; Bratislava: ALFA, 1983. 629 s. ISBN 04-815-83.
- [92] KYZLINK, V. *Teoretické základy konzervace potravin.* 1. vyd. Praha: SNTL, 1998. 512 s.

- [93] RÍO, 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. *Int. J. Food Microbiol.* 2007, vol. 115, s. 268-280.
- [94] RÍO, E., CASO, B.G., PRIETO, M., ALONSO-CALLEJA, C., CAPITA, R. Effect of poultry decontaminants concentration on growth kinetics for pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiol.* 2008, vol. 25, s. 888-894.
- [95] SMITH, S., WATTS, R., DILS, R. Quantitative gas-liquid chromatographic analysis of rodent milk triglycerides. *J. Lipid Res.* 1968, vol. 9, s. 52-57.
- [96] *Liber Herbarum Minor* [online]. [cit. 15. dubna 2009]. Dostupné z: <<http://www.liberherbarum.com/Minor/CZ/In2298.HTM>>
- [97] VAN DER STEEN, M., STEVENS, C., EECKHOUT, Y., DE BUYCK, L., GHELFI, F., RONCAGLIA, F. Undecylenic acid: A valuable renewable building block on route to Tyromycin A derivatives. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2008, vol. 110, s. 846-852.
- [98] KABARA, J.J., MARSHALL, D.L. *Antimicrobials in Food*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. Chapter 11, Medium-Chain Fatty Acids and Esters, s. 327-360.
- [99] HAMPL, F., PALEČEK J. *Farmakochemie*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. 415 s. ISBN 80-7080-495-5.
- [100] KNAPP, H.R., MELLY M.A. Bactericidal effects of polyunsaturated fatty acids. *J. Infect. Dis.* 1986, vol. 154, s. 84-94.
- [101] RŮŽIČKA, J. VELCLOVÁ, K., JANIŠ, R., KREJČÍ, J. Antimicrobial effects of 1-monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids. *Eur. Food Technol.* 2003, vol. 217, s. 329-331. ISSN 1438-2377.
- [102] NAIR, M.K.M., JOY, J., VASUDEVAN, P., HINCKLEY, L., HOAGLAND, T.A. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 2005, vol. 88, s. 3488-3495.
- [103] KITAHARA, T., KOYAMA, N., MATSUDA, J., AOYAMA, Y., HIRAKATA, Y., KAMIHIRA, S., KOHNO, S., NAKASHIMA, M., SASAKI, H. Antimicrobial activity of saturated fatty acids and fatty amines against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.* 2004, vol. 27, s. 1321-1326.
- [104] BERGSSON, G., ARNFINNSSON, J., STEINGRÍMSSON, Ó., THORMAR, H. In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and

- monoglycerides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, vol. 45, s. 3209-3212.
- [105] BARTOŠOVÁ, E., ŠPIČKOVÁ, Z., POSPÍŠILOVÁ, O., ŠMIDRKAL, J., FILIP, V. The influence of fatty acids and their derivatives on the growth of *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, and *Candida* species. *Chimia.* 2005, vol. 59, s. 732-734.
- [106] BERGSSON, G., STEINGRÍMSSON, Ó., THORMAR, H. Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerids on *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2002, vol. 20, s. 258-262.
- [107] MAROUNEK, M., SKŘIVANOVÁ, E., RADA, V. Susceptibility of *Escherichia coli* to C₂ – C₁₈ fatty acids. *Folia Microbiol.* 2003, vol. 48, s. 731-735.
- [108] PETSCHOW B.W., BATEMA R.P., FORD L.L. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to bactericidal properties of medium – chain monoglycerides and free fatty acids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996, vol. 40, s. 302-306.
- [109] JAMES, C., JAMES, S.J., HANNAY, N., PURNELL, G., BARBEDO-PINTO, C., YAMAN, H., ARAUJO, M., GONZALES, M.L., CALVO, J., HOWELL, M., CORRY, J.E.L. Decontamination of poultry carcasses using steam or hot water in combination with rapid cooling, chilling or freezing of carcass surfaces. *Int. J. Food Microbiol.* 2007, vol. 114, s. 195-203.
- [110] LECOMPTE, J.Y., KONDOYAN, A., SARTER, S., PORTANGUEN, S., COLLIGNAN, A. Effects of steam and lactic acid treatments on inactivation of *Listeria innocua* surface-inoculated on chicken skins. *Int. J. Food Microbiol.* 2008, vol. 127, s. 155-161.
- [111] MOLINOS, A.C., ABRIOUEL, H., OMAR, N.B., VALDIVIA, E., LÓPEZ, R.L., MAQUEDA, M., CAÑAMERO, M.M., GÁLVEZ, A. Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, vol. 71, s. 7781-7787.
- [112] YUSTE, J., MOR-MUR, M., GUAMIS, B., PLA, R. Combination of high pressure with nisin or lysozyme to further process mechanically recovered poultry meat. *High Pressure Res.* 2000, vol. 19, s. 85-90.
- [113] CARNEIRO DE MELO, A.M.S., CASSAR, C.A., MILES, R.J. Trisodium phosphate increases sensitivity of gram-negative bacteria to lysozyme and nisin. *J. Food Protection.* 1998, vol. 61, s. 839-843.

- [114] SINHAMAHAPATRA, M., BISWAS, S., DAS, A.K., BHATTACHARYYA, D. Comparative study of different surface decontaminants on chicken quality. *Br. Poult. Sci.* 2004, vol. 45, s. 624-630.
- [115] NAZER, A.I., KOBILINSKY, A., THOLOZAN, J.L., DUBOIS-BRISSENET, F. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? *Food Microbiol.* 2005, vol. 22, s. 391-398.
- [116] ISMAIL, S.A.S., DEAK, T., ABD EL-RAHMAN, H.A., YASSIEN, M.A.M., BEUCHAT, L.R. Effectiveness of immersion treatments with acids, trisodium phosphate, and herb decoctions in reducing population of *Yarrowia lipolytica* and naturally occurring aerobic microorganisms on raw chicken. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, vol. 64, s. 13-19.
- [117] ČSN EN ISO 4833, Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C, Český normalizační institut, 2003, 16 s.
- [118] ČSN EN ISO 11290-1, Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* – Část 1: Metoda průkazu, Český normalizační institut, 1999, 28 s.
- [119] ČSN EN ISO 11290-2, Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* – Část 2: Metoda stanovení počtu, Český normalizační institut, 1999, 2005, 28 s.
- [120] ČSN EN ISO 21528-2, Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metody pro průkaz a stanovení počtu bakterií čeledi Enterobacteriaceae – Část 2: Technika počítání kolonií, Český normalizační institut, 2006, 12 s.
- [121] ČSN EN ISO 17410, Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu psychrotrofních mikroorganismů, Český normalizační institut, 2003, 12 s.
- [122] ČSN ISO 7954, Mikrobiologie – Všeobecné pokyny pro stanovení počtu kvasinek a plísňí, Technika počítání kolonií vykultivovaných při 25 °C, Český normalizační institut, 1994, 8 s.
- [123] SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 s. ISBN 978-087969577-4 (v.1-3).
- [124] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), *Performance Standards for Antimicrobial Disc and Dilution*

Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard – M31-A2. Wayne, 2002, vol. 19, s. 8.

- [125] THOMAS, P. Isolation of *Bacillus pumilus* from in vitro grapes as a long-term alcohol-surviving and rhizogenesis inducing covert endophyte. *J. Appl. Microbiol.* 2004, vol. 97, s. 114–123.
- [126] SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS.* 1977, vol. 74, p. 5463–5467.
- [127] NCBI Database. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). 2008. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>
- [128] POT, B., VANDAMME, P., KERSTERS, K. Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints, 1994, s. 493-522. *In: Goodfellow M. and O'Donnell A.G. (ed.), Modern Microbial Methods. Chemical Methods in Prokaryotic Systematics.* John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- [129] KIRKEBY, S., MOE, D., BOG-HANSEN, T.C. The silver staining procedure of sodium dodecyl sulfate gels may be accelerated by shortening fixation time. *Electrophoresis.* 1993, vol. 14, s. 51-55.
- [130] JANIŠ, R., KLÁSEK, A., BOBÁLOVÁ, J. Chromium(III) acetate hydroxide – an efficient catalyst of the glycidol - fatty acids reaction. *J. Food Lip.* 2006, vol. 13, s. 199-209. ISSN 1065-7258.
- [131] HUGHEY, V.L., JOHNSON, E.A. Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987, vol. 53, s. 2165-2170.
- [132] ČSN ISO 8586-1, Senzorická analýza - Obecná směrnice pro výběr, výcvik a sledování činnosti posuzovatelů - Část 1: Vybraní posuzovatelé, Český normalizační institut, 2003, 24 s.
- [133] ČSN ISO 8589, Senzorická analýza. Obecná směrnice pro uspořádání senzorického pracoviště, Český normalizační institut, 1993, 16 s.
- [134] ČSN ISO 8587, Senzorická analýza – Metodologie – Pořadová zkouška, Český normalizační institut, 2008, 24 s.
- [135] DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control.* 2006, vol. 17, s. 474-483.
- [136] GEORNARAS, I., DE JESUS, A. E., VAN ZYL, E., VON HOLY, A. Bacterial populations associated with poultry processing in a South African abattoir. *Food Microbiol.* 1996, vol. 13, s. 457-465.
- [137] GIBBS, P.S., KASA, R., NEWBREY, J.L., PETERMANN, S.R., WOOLEY, R.E., VINSON, H.M., REED, W. Identification, antimicrobial resistance profiles, and virulence of members from the

- family Enterobacteriaceae from the feces of yellow-headed blackbirds (*Xanthocephalus xanthocephalus*) in North Dakota. *Avian Dis.* 2007, vol. 51, s. 649-655.
- [138] DE CHAMPS, C., LE SEAUX, S., DUBOST, J.J., BOISGARD, S., SAUVEZIE, B., SIROT, J. Isolation of *Pantoea agglomerans* in two cases of septic monoarthritis after plant thorn and wood sliver injuries. *J. Clin. Microbiol.* 2000, vol. 38, s. 460-461.
- [139] FARMER III, J.J., *et al.* Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1985, vol. 21, s. 46-76.
- [140] KHAN, A.A., NAWAZ, M.S., SUMMAGE WEST, C., KHAN, S.A., LIN, J. Isolation and molecular characterization of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* from poultry litter. *Poult. Sci.* 2005, vol. 84, s. 61-66.
- [141] KOLÁŘ, M., BARDONĚ, J., SAUER, P., KESSELOVÁ, M., ČEKANOVÁ, L., VÁGNEROVÁ, I., KOUKALOVÁ, D., HEJNAR, P. Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* and *Proteus vulgaris* in poultry of Middle Moravia, Czech Republic. *Acta Vet. Brno.* 2005, vol. 74, 249-253.
- [142] DE KRAKER, M., VAN DE SANDE-BRUIJNSMA, N. Trends in antimicrobial resistance in Europe: update of EARSS results. *Euro Surveill.* 2007, vol. 12(11):pii=3156 [online]. [cit. 4. února 2009]. Dostupné z: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3156>>
- [143] JAMES, C., VINCENT, C., ANDRADE LIMA, T.I., JAMES, S.J. The primary chilling of poultry carcasses – a review. *Int. J. Refrig.* 2006, vol. 29, s. 847-862.
- [144] LAHELLEC, C., MEURIER, C., BENNEJEAN, G., CATSARAS, M. A study of 5920 strains of psychrotrophic bacteria isolated from chickens. *J. Appl. Bact.* 1975, vol. 38, s. 89-97.
- [145] ARNAUT-ROLLIER, I., DE ZUTTER, L., VAN HOOFF, J. Identities of the *Pseudomonas* spp. in flora from chilled chicken. *Int. J. Food Microbiol.* 1999, vol. 48, s. 87-96.
- [146] DOORES, S. *Antimicrobials in Food*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. Chapter 4, Organic Acids, s. 91-142.
- [147] THORMAR, H., HILMARSSON, H. The role of microbicidal lipids in host defense against pathogens and their potential as therapeutic agents. *Chem. Phys. Lipids.* 2007, vol. 150, s. 1-11.
- [148] ALTIERI, C., CARDILLO, D., BEVILACQUA, A., SINIGAGLIA, M. Inhibition of *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by fatty acids and their monoglycerides. *J. Food Prot.* 2007, vol. 70, s. 1206-1212.

- [149] KABARA, J.J., VRABLE, M., JIE, L.K. Antimicrobial lipids-natural and synthetic fatty acids and monoglycerides. *Lipids*. 1977, vol. 9, s. 753- 759.
- [150] GILL, C.O., NEWTON, K.G. Effect of lactic acid concentration on growth on meat of Gram-negative psychrotrophs from a meatworks. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982, vol. 43, s. 284-288.
- [151] ROBACH, M. C. Effect of potassium sorbate on the growth of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Food Sci.* 1978, vol. 43, s. 1886–1887.
- [152] GONZÁLES-FANDOS, E., DOMINGUEZ, J.L. Effect of potassium sorbate washing on the growth of *Listeria monocytogenes* on fresh poultry. *Food Control*, 2007, vol. 18, s. 842-846.
- [153] SMULDERS, F.J.M., BARENSEN, P., VAN LOGTESTIJN, J.G., MOSSEL, D.A.A., VAN DER MAREL, G.M. Review: Lactic acid: considerations in favour of its acceptance as a meat decontaminant. *J. Food Technol.* 1986, vol. 21, s. 419–436.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADO	tvorba kyseliny z adonitolu
ARG	důkaz arginin dihydrolázy
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (nástroj pro vyhledávání a srovnávání DNA a proteinových sekvencí)
CA	kyselina citronová
CEL	tvorba kyseliny z cellobiózy
CPM	celkové počty aerobních a fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů
DNA	hydrolýza DNA
DUL	tvorba kyseliny z dulcitolu
ESL	hydrolýza eskulinu
GEL	hydrolýza želatiny
H ₂ S	tvorba H ₂ S
IND	tvorba indolu
INO	tvorba kyseliny z inositolu
KAT	produkce enzymu kataláza (EC 1.11.1.6)
LA	kyselina mléčná
LYS	dekarboxylace lyzinu
M17	agarová půda pro kultivaci bakterií mléčného kvašení
MAG	monoacylglycerol
MAL	utilizace malonátu
MAN	tvorba kyseliny z mannitolu
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MPA	masopeptonový agar
MPB	masopeptonový bujón
MRS	Lactobacillus deMan Rogosa Sharpe agar
MRSA	meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MSA	Mannitol Salt Agar
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Národní centrum pro biotechnologické informace)
ONP	průkaz β -galaktozidázy
ORN	dekarboxylace ornitinu
OXI	produkce enzymu cytochromoxidáza (EC 1.9.3.1)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PHE	deaminace fenylalaninu
PS	sorban draselný
RHA	tvorba kyseliny z ramnózy
SCI	Simmons-citrát test na utilizaci citrátu
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným
SOR	tvorba kyseliny ze sorbitolu

SUC	tvorba kyseliny ze sacharózy
TRE	tvorba kyseliny z trehalózy
TSP	fosforečnan sodný (trisodium phosphate)
TWE	hydrolýza Tweenu80
URE	tvorba ureázy
VPT	Voges-Proskauerův test, test na tvorbu acetoinu
VRBA	Violet Red Bile Agar (violet' červen žlučový agar s laktózou)
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate agar (xylóza lyzin deoxycholátový agar)
YGA	Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (kvasničný agar s glukózou a chloramfenikolem)

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1.** Spotřeba vepřového, hovězího a drůbežího masa v ČR v letech 1948-2006 (kg/obyvatel/rok)..... 7
- Obr. 2.** Přehled izolátů *Escherichia coli* rezistentních k fluorochinolonům v letech 2000-2003 13
- Obr. 3.** Půda pro růst kvasinek (YGA) po aplikaci výplachu z kuřecí kůže a následné kultivaci při 20 °C (a). Izolované kmeny kvasinek produkující různobarevné pigmenty (b)..... 34
- Obr. 4.** Graf procentuálního zastoupení sledovaných skupin mezi 235 bakteriálními izoláty 35
- Obr. 5.** SDS-PAGE profil celobuněčných proteinů 11 kmenů se shodnými makroskopickými, mikroskopickými a biochemickými znaky 37
- Obr. 6.** Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů, psychrotrofních bakterií, koliformních bakterií a kvasinek na povrchu kuřecí kůže před a po chlazení ve výrobě a po zakoupení z obchodní sítě..... 42
- Obr. 7.** Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů izolovaných z povrchu drůbeže během roku 2006 a vliv doby skladování na mikroflóru povrchu drůbeže uskladněné při chladírenské teplotě..... 43
- Obr. 8.** Celkové počty koliformních bakterií izolovaných z povrchu drůbeže během roku 2006 a vliv doby skladování na mikroflóru povrchu drůbeže uskladněné při chladírenské teplotě..... 44
- Obr. 9.** Hodnoty absorbance (OD₅₅₀) po 24 hodinové kultivaci *Escherichia coli* 66 s různými koncentracemi kyseliny citronové, octové, sorbové a sorbanu draselného..... 46
- Obr. 10.** Hodnoty absorbance (OD₅₅₀) po 24 hodinové kultivaci *Pseudomonas fragi* 19 s různými koncentracemi kyseliny citronové, octové, sorbové a sorbanu draselného..... 46
- Obr. 11.** Hodnoty absorbance (OD₅₅₀) po 24 hodinové kultivaci *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* 7 s různými koncentracemi kyseliny citronové, octové, sorbové a sorbanu draselného 47

- Obr. 12.** Počet bakterií (log CFU/ml) po 24 hodinové kultivaci s různými koncentracemi olejové..... 48
- Obr. 13.** Srovnání makrokolonií rodu *Phoma* na Czapek Dox agaru bez přídavku MAG (a) a s přídavkem 250 mg/l MAG C_{11:1} (b) po 14 denní kultivaci při pokojové teplotě..... 50
- Obr. 14.** Množství stafylokoků na drůbeží kůži v průběhu chladírenského skladování po aplikaci směsi kyseliny mléčné a sorbanu draselného s lysozymem nebo bez lysozymu..... 65

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Hraniční koncentrace antibiotik pro stanovení MIC u <i>E. coli</i> dle NCCLS	25
Tab. 2. Seznam použitých primerů pro PCR typizaci	26
Tab. 3. Charakteristika vybraných izolátů z kuřecí kůže	30
Tab. 4. Seznam mikrobiálních kmenů použitých pro testování antimikrobiálních účinků monoacylglycerolů.....	31
Tab. 5. Identifikace 103 bakteriálních izolátů z kůže chlazené drůbeže	36
Tab. 6. Biochemická charakteristika kmenů č. 35 a 63	38
Tab. 7. Výsledky testování rezistence kmenů <i>E. coli</i> k antibiotikům a hodnoty MIC50 a MIC90 (mg/l)	39
Tab. 8. Kombinace typů bakteriocinů u produkčních kmenů a jejich počet.....	40
Tab. 9. Frekvence výskytu jednotlivých typů bakteriocinů.....	41
Tab. 10. Počty mikroorganismů (logCFU/g kůže) na kuřecí kůži chlazené drůbeže na výrobní lince před chlazením, po chlazení a z obchodní sítě (průměr±směrodatná odchylka)	42
Tab. 11. Přehled stanovených minimálních inhibičních koncentrací.....	47
Tab. 12. Přehled minimálních inhibičních koncentrací (MIC) a minimálních baktericidních koncentrací (MBC) u testovaných bakterií a kvasinek	50
Tab. 13. Růst plísní na pevné půdě (Czapek-Dox agar) s přídatkem MAG C _{11:0} vyjádřen jako velikost kolonií v centimetrech (LSM ± SE)	52
Tab. 14. Růst plísní na pevné půdě (Czapek-Dox agar) s přídatkem MAG C _{11:1} vyjádřen jako velikost kolonií v centimetrech (LSM ± SE)	53
Tab. 15. Rozdíly ve velikosti kolonií plísní (cm) vztažené k různé době kultivace a použitým monoacylglycerolům (LSM±SE)....	54

Tab. 16. Přírůstek mikroorganismů vztažený ke kontrolnímu vzorku v hodině 0 (log CFU/g kůže) po aplikaci kyseliny citronové (průměr ± směrodatná odchylka).....	56
Tab. 17. Hodnoty pH kuřecí kůže během 72 hodin skladování při 4 ± 2 °C (průměr± směrodatná odchylka) po aplikaci kyseliny citronové.....	57
Tab. 18. Přírůstek mikroorganismů vztažený ke kontrolnímu vzorku v hodině 0 (log CFU/g kůže) po aplikaci kyseliny mléčné a sorbanu draselného (průměr± směrodatná odchylka).....	59
Tab. 19. Přírůstek mikroorganismů vztažený ke kontrolnímu vzorku v hodině 0 (log CFU/g kůže) po aplikaci kyseliny mléčné a sorbanu draselného (průměr± směrodatná odchylka) – porovnání dvou metod – ponor, postřik	61
Tab. 20. Hodnoty pH kuřecí kůže během 72 hodin skladování při 4 ± 2 °C (průměr ± směrodatná odchylka) po aplikaci kyseliny mléčné, sorbanu draselného a jejich kombinací	64
Tab. 21. Pearsonův korelační koeficient – vztah mezi množstvím mikroorganismů na kuřecí kůži a hodnotou pH ovlivněnou organickými kyselinami	64
Tab. 22. Celkové počty mezofilních bakterií, koliformních bakterií a kvasinek během 72 hodin skladování při 4 ± 2 °C po aplikaci kyseliny kaprylové.....	66
Tab. 23. Hodnoty pH kuřecí kůže během 72 hodin skladování při 4 ± 2 °C (průměr± směrodatná odchylka) po aplikaci kyseliny kaprylové.....	66
Tab. 24. Počty mikroorganismů (log CFU/g kůže) po aplikaci MAG C _{11:0} a MAG C _{11:1} (průměr± směrodatná odchylka) v průběhu 72 hodin skladování při 4 ± 2 °C.....	67
Tab. 25. Hodnoty pH kuřecí kůže během 72 hodin skladování při 4 ± 2 °C (průměr± směrodatná odchylka) po aplikaci MAG C _{11:0} a MAG C _{11:1}	68
Tab. 26. Sensorická analýza ošetřených kuřecích stehien.....	69

PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Články v mezinárodních časopisech

ŠMAJS, D., DOLEŽALOVÁ, M., MACEK, P., ŽÍDEK, L. Inactivation of colicin Y by intramembrane helix-helix interaction with its immunity protein. *FEBS J.* 2008, vol. 275, s. 5325-5331. (IF=3,396 (2007), ISSN: 1742-464X).

DOLEŽALOVÁ, M., MOLATOVÁ, Z., BUŇKA, F., BŘEZINA, P., MAROUNEK, M. Effect of organic acids on growth of chilled chicken skin microflora. *J. Food Saf.* 2009 – in press.

Příspěvky v recenzovaném sborníku z konferencí ve světovém jazyce

JANALÍKOVÁ M., ŠMAJS D., ŠMARDA J. Molecular recognition of colicin U and Y pore-forming domains by their cognate immunity proteins. Supplement Abstracts of 12th European Conference on Bacterial Protein Toxins. Canterbury: ETOX 12. 25. – 29. 6. 2005, s. P25.

JANALÍKOVÁ, M., ŠTEKLOVÁ V., KRAMÁŘOVÁ D., LUKÁŠKOVÁ E., ČECHOVÁ L. Antimicrobial effect of caprylic acid on chicken skin. Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie. Bezpečnosť a kontrola potravín. Nitra: SPU v Nitre. 5. – 6. 4. 2006, s. 337-339, ISBN 80-8069-682-9.

JANALÍKOVÁ, M., SEDLÁČEK, I., BŘEZINA, P., MAROUNEK, M. Biochemical characterization of chicken skin microflora. Sborník příspěvků. XI. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů. Brno: Masarykova univerzita v Brně. 2007, s. 27, ISBN 978-80-210-4234-6.

MUCHOVÁ, M., RŮŽIČKA, J., JULINOVÁ, M., DOLEŽALOVÁ, M. Obtaining and properties of bacteria utilizing some carbohydrates. Abstrakty - 24. Kongres Československé společnosti mikrobiologické, Bulletin Československé společnosti mikrobiologické. Liberec: Československá společnost mikrobiologická. 2. – 5. 10. 2007, s. 213, ISSN 0009-0646.

DOLEŽALOVÁ, M., KRAMÁŘOVÁ, D., BŘEZINA, P., MAROUNEK, M. Decontamination of chicken skin by selected organic acids. Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie. Bezpečnosť a kontrola potravín. Nitra: SPU v Nitre. 2. – 3. 4. 2008, s. 39-43, ISBN 978-80-552-0027-9.

RAHULA J., VLTAVSKÁ, P., DOLEŽALOVÁ, M., KAŠPÁRKOVÁ, V., KREJČÍ, J., SEDLAŘÍKOVÁ, J. Microbicidal properties of nontraditional monoacylglycerols. Book of abstracts – 6th Euro Fed Lipid Congress. Oils, fats and lipids in the 3rd millenium: Challenges, Achievements and Perspectives. Athens. 7. – 10. 9. 2008. s. 383.

Příspěvky v recenzovaných sbornících z konferencí v jiném než světovém jazyce

JANALÍKOVÁ, M., ŠMAJS, D. Molekulární interakce mezi kolicinem U a jeho imunitním proteinem. Sborník příspěvků. IX. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů. Brno: Masarykova univerzita v Brně. 2005, s. 7. ISBN 80-210-3635-4.

JANALÍKOVÁ, M., ŠMAJS, D. Molekulární rozpoznávání kolicinů U a Y svými imunitními proteiny. Sborník abstraktů. XIV. konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2005. Brno: Lékařská fakulta LF MU. 2005, s. 21.

JANALÍKOVÁ, M., ŠMAJS, D. Molekulární interakce kolicinu U se svým imunitním proteinem. 5th Interdisciplinary Meeting of Young Biologists, Biochemists, and Chemists. *Chem. Listy*. 2005, vol. 99, s. 364.

JANALÍKOVÁ M., MOLATOVÁ Z., MAROUNEK M. Inhibice bakteriální flóry povrchu chlazených kuřat kyselinou citronovou. Sborník XV. Konference mladých mikrobiologů, Tomáškovy dny 2006. Brno: Lékařská fakulta LF MU. 7. - 9. 6. 2006, s. 18-19.

LUKEŠOVÁ M., ČECHOVÁ L., JANALÍKOVÁ M., KRAMÁŘOVÁ D. Vliv kyseliny mléčné na vybrané druhy mikroorganismů. Sborník XV. Konference mladých mikrobiologů, Tomáškovy dny 2006. Brno: Lékařská fakulta LF MU. 7. - 9. 6. 2006, Brno, s. 25-26.

ŠTEKLOVÁ V., JANALÍKOVÁ M., LUKÁŠKOVÁ E. Antimikrobiální účinky kyseliny kaprylové na mikroflóru chlazené drůbeže. Sborník XV. Konference mladých mikrobiologů, Tomáškovy dny 2006. Brno: Lékařská fakulta LF MU. 7. - 9. 6. 2006, Brno, s. 41-42.

JANALÍKOVÁ M., LUKÁŠKOVÁ E., MOLATOVÁ Z., ŠTEKLOVÁ V., MAROUNEK M. Aplikace organických kyselin na povrch chlazené drůbeže a jejich vliv na mikroflóru. 58. sjezd Asociací českých a slovenských chemických společností, 4. - 7. 9. 2006, *Chem. listy*, vol. 100, s. 735, ISSN 0009-2770.

ČECHOVÁ L., KRAMÁŘOVÁ D., JANALÍKOVÁ M., KAŠPÁRKOVÁ E., LUKEŠOVÁ M. Účinek organických kyselin na vybrané mikroorganismy. 58. sjezd Asociací českých a slovenských chemických společností, 4. - 7. 9. 2006, *Chem. listy*, vol. 100, s. 734, ISSN 0009-2770.

ČECHOVÁ L., JANALÍKOVÁ M., KULEDOVÁ L., MIKULCOVÁ M., KREJČÍ J. Vliv monoacylglycerolů na inhibici nežádoucí mikroflóry potravin. 58. sjezd Asociací českých a slovenských chemických společností, 4. - 7. 9. 2006, *Chem. listy*, vol. 100, s. 735, ISSN 0009-2770.

JANALÍKOVÁ M., ČECHOVÁ L., BŘEZINA P., MAROUNEK M. Sledování mikroflóry povrchu chlazené drůbeže z obchodní sítě v průběhu roku

2006. Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie. Bezpečnosť a kontrola potravín. Nitra: SPU v Nitre. 28. - 29. 3. 2007, s. 58-61, ISBN 978-80-8069- 860-7.

JANALÍKOVÁ M., KRAMÁŘOVÁ D., KAŠPÁRKOVÁ E., HOZA I. Antibakteriální účinek kyseliny kaprylové na *Escherichia coli*. Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie. Bezpečnosť a kontrola potravín. Nitra: SPU v Nitre. 28. - 29. 3. 2007, s. 62-65, ISBN 978-80-8069- 860-7.

ČECHOVÁ L., KULEDOVÁ L., JANALÍKOVÁ M., KREJČÍ J. Vliv vybraných 1-monoacylglycerolu na inhibici růstu *Saccharomyces cerevisiae*. Zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie. Bezpečnosť a kontrola potravín. Nitra: SPU v Nitre. 28. - 29. 3. 2007, s. 43-47, ISBN 978-80-8069- 860-7.

JANALÍKOVÁ, M., ŠMAJS, D., ČECHOVÁ, L., MAROUNEK, M. Bakteriocinotypizace kmenů *Escherichia coli* izolovaných z masa. Sborník XVI. Konference mladých mikrobiologů, Tomáškovy dny 2007. Brno: Lékařská fakulta LF MU. 7. - 8. 6. 2007, s. 26-27.

SVOBODOVÁ, H., JANALÍKOVÁ, M., JANIŠ, R. Mikrobicidní vlastnosti netradičních monoacylglycerolů. Sborník XVI. Konference mladých mikrobiologů, Tomáškovy dny 2007. Brno: Lékařská fakulta LF MU. 7. - 8. 6. 2007, s. 50-51.

DOLEŽALOVÁ, M., MAROUNEK, M., BŘEZINA, P., SEDLÁČEK, I., ŠMAJS, D. Charakteristika mikroflóry povrchu chlazené drůbeže. Abstrakty - 24. Kongres Československé společnosti mikrobiologické, Bulletin Československé společnosti mikrobiologické. Liberec: Československá společnost mikrobiologická. 2. – 5. 10. 2007, s. 185. ISSN 0009-0646.

VAŇÁTKOVÁ, Z., BUŇKOVÁ, L., DOLEŽALOVÁ, M., OTŘÍSAL, P., BUŇKA, F. Produkce biogenních aminů u vybraných bakterií izolovaných z povrchu drůbeže. Abstrakty - 24. Kongres Československé společnosti mikrobiologické, Bulletin Československé společnosti mikrobiologické. Liberec: Československá společnost mikrobiologická. 2. – 5. 10. 2007, s. 200. ISSN 0009-0646.

DOLEŽALOVÁ, M., BUŇKOVÁ, L., MAROUNEK, M. Možnosti snižování mikrobiální kontaminaci povrchu chlazené drůbeže. Sborník z mezinárodní konference, Poultry – Techagro 2008. Brno: Mendelova lesnická a zemědělská univerzita v Brně. 8. 4. 2008, s. 28-30. ISBN 978-80-7375-165-4.

Učební texty

ČECHOVÁ, L., JANALÍKOVÁ, M. *Obecná mikrobiologie* [skripta], 1. vyd. Zlín: UTB, 2007, 190 s. ISBN 978-80-7318-516-9.

CURRICULUM VITAE

Jméno: Mgr. Magda Doležalová (roz. Janalíková)
Adresa: Družby 1294, 769 01 Holešov
Telefon: +420 576 031 020
E-mail: mdolezalova@ft.utb.cz
Datum narození: 27. prosince 1979
Stav: vdaná

Vzdělání:

1991 – 1999 Gymnázium L. Jaroše Holešov
1999 – 2004 Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, obor
Obecná biologie, specializace Mikrobiologie
2005 – doposud Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta
technologická, Ústav potravinářského inženýrství,
doktorský studijní program Technologie potravin

Pracovní zkušenosti:

III/2005 – VIII/2005 Masarykova univerzita, Lékařská fakulta
IX/2005 – doposud Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta
technologická, Ústav potravinářského inženýrství,
asistent

Absolvované pracovní stáže:

srpen 2006 Česká sbírka mikroorganismů, Přírodovědecká fakulta,
Masarykova univerzita v Brně, Brno
červenec 2007 Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova
univerzita v Brně, Brno
2. – 6. 6. 2008 Oddelenie mikrobiológie a molekulárnej biológie,
Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, Slovenská
republika

Dovednosti:

- Jazykové znalosti anglický jazyk – aktivně
francouzský jazyk – pasivně
- Práce s PC MC Office (Word, Excel, PowerPoint, Outlook),
Internet Explorer