Účinek reziduí po fungicidech na bakterie

The Effect of fungicidal residual on Bacterial spp.

Jana Vrzáková

Diplomová práce
2005



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Vložit oficiální zadání diplomové/bakalářské práce

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mojí diplomové práce RNDr. Miroslavu Grossmannovi za odborné vedení, podstatné rady a trvalý zájem při vypracovávání této diplomové práce.

Dále mé díky patří Ing. Františku Buňkovi PhD. a celému ústavu potravinářského inženýrství a chemie za pomoc při statistickém zpracování dat a vytvoření velmi dobrých pracovních podmínek.

Rovněž děkuji rodičům, přátelům a kolegům za všestrannou pomoc při studiu.

Prohlašuji, že jsem na celé diplomové práci pracoval/a samostatně a použitou literaturu jsem citoval/a.

Ve Zlíně, 15. 05. 2005 .....

jméno diplomanta

Abstrakt

V dnešní době stále ještě zemědělská výroba používá řadu chemických prostředků na zvýšení či udržení výnosů. Na významu však získává produkce ekologického zemědělství zvláště v zahraničí ve vyspělých státech, kde spotřebitel je dokonale informován o zdravotních rizicích vyplývajících z reziduí chemických přípravků v potravinách. Celá řada potravinářských výrobků obsahuje chemické přídavky za účelem prodloužení trvanlivosti, senzorické, nutriční, biologické aj. hodnoty výrobku. Práce se zabývá rezidui fungicidních přípravků v potravinách a jejich účinku na citlivé bakterie. Zaměřuje se také na chování a reakci střevní mikroflóry po použití fungicidních přípravků na vybrané druhy ovoce.

Today the agricultural production always use series of a chemical substance to the elevation or the preservation of the produce. However the production of the ecological agriculture is obtaining on signification especially abroad in the advanced countries, where consumer is totally informed about health hazards sequented upon the residue of the chemical preparations in foodstuff. Many food products contain the chemical bonuses, nutritional, biological at al. value of the product. My work is dealing with the residue of the fungicidal preparations in foodstuff and their effecton the sensitive bacterias. It is bending on the behaviour and the reaction of the enteric microflora after the using of fungicidal preparations on the selected fruits too.

OBSAH

ÚVOD **6**

1 TEORETICKÁ ČÁST **8**

1.1 CIZORODÉ LÁTKY V POTRAVINÁCH 8

1.1.1 Ochranářské prostředky pro rostliny 8

1.1.2 Přísady 10

1.2 FUNGICIDNÍ LÁTKY 14

1.2.1 Houby a mykotoxiny 14

1.2.2 Škodlivost fungicidních prostředků 16

1.2.3 Současná legislativa 20

1.3 METODICKÉ ASPEKTY STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY SLOUČENIN IN VITRO 23

1.3.1 Stanovení antimikrobiální aktivity 24

1.3.2 Vliv ovocných koncentrátů a ovoce na bakterie 29

2 PRAKTICKÁ ČÁST **32**

2.1 STANOVENÍ CÍLŮ 32

2.2 METODIKA PRÁCE 33

2.3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 34

2.3.1 Antimikrobiální účinky různých druhů ovoce na citlivé bakterie 34

2.3.2 Pokus o infekci plodů smíšenou mykoflórou 50

2.3.3 Samotný účinek fungicidů a účinek po jejich aplikaci 53

2.4 DISKUSE VÝSLEDKŮ 57

ZÁVĚR **60**

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ **62**

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK **67**

SEZNAM OBRÁZKŮ **71**

SEZNAM TABULEK **72**

SEZNAM PŘÍLOH **74**

ÚVOD

Tradice ošetřování kultur rostlin chemickými prostředky je prastará. Naši předkové odedávna z praxe znali např. oligodynamické účinky kovů - postřikování vinné révy skalicemi má doslova staletou tradici. Pokud jde o postřiky proti hmyzím škůdcům, spoléhalo se spíše na jejich odpudivý účinek než na přímé hubení. Přímo revoluční obrat nastal koncem druhé světové války, kdy v potírání škodlivého hmyzu v nejširším smyslu dominovaly halované deriváty cyklických uhlovodíků, zobecnělých jako "dédété", později "hácéhá". Později byla nalezena řada poznatků o jejich zprvu netušených vedlejších účincích, jako bylo hromadění toxických nerozpustných metabolátů v mateřském mléce a vůbec v živočišných tucích.

Chrousti později zmizeli na desítky let - a vlastně dodnes. Byli totiž vytráveni přehnojováním půd průmyslovými hnojivy. Hnulo se humusem a detritem, protože zastavením hnojení chlévskou mrvou byl odňat mladým larvám se slabými kusadly potravní zdroj. Podobný, nyní už rutinovaný velkoplošný postup hnojení měl odpovídající následky: z lučních potůčků a okolí postupně vymizely blatouchy, pryskyřníky, rdesna, kohoutek, toten atd., ale také hořavky a žáby.

V zemědělství a lesnictví je třeba se naučit pracovat v přírodě a s přírodou. Doby "boje za vysokou úrodu" jsou pryč (1).

Já se ve své diplomové práci zaměřuji na účinek reziduí po fungicidech na citlivé bakterie. Proč vlastně používáme fungicidy? Na ochranu proti houbám.

Mikroskopické houby jsou rozšířené po celém světě. Jejich stáří se odhaduje na 300 miliónů let a lidstvo se s nimi setkává od nepaměti. Díky svému enzymatickému vybavení jsou velmi adaptabilní pro kontaminaci téměř jakéhokoliv substrátu. Velká morfologická rozmanitost a schopnost přizpůsobit se nejrůznějším ekologickým podmínkám umožňuje houbám osídlit řadu rozdílných biotopů. V životním prostředí jsou spory mikroskopických hub přítomny v ovzduší, půdě, vodě, na povrchu živých a odumřelých organismů, předmětech, plochách, v potravinových surovinách rostlinného původu, v potravinách i krmivech. V životním a pracovním prostředí člověka se v posledních letech stále více objevuje škodlivé působení mikroskopických hub. Je dáno zejména vhodnými podmínkami, které v současné době mikroskopické houby mají pro svůj růst, rozmnožování a produkci mykotoxinů. Zvýšený výskyt jejich spor či fragmentů houbových vláken v ovzduší závisí

mimo jiné na klimatických podmínkách, které jsou zvláště na jaře a na podzim příznivější. Vlivem narušeného životního prostředí dochází k posunu biologické rovnováhy směrem ke zvýšenému výskytu mikroskopických hub. Problémy z hlediska výskytu mikroskopických hub v pracovním a životním prostředí mohou přinášet i nově zaváděné technologie (špatně provedené zateplování budov,…) a chování člověka (nepravidelné větrání, vynášení odpadků,…) (2).

Parazitické houby a druhy specializující se na požírání užitkových rostlin jsou náchylné v důsledku enormní nabídky potravy k masovému přemnožení a vyvíjejí se ve škůdce. Současně soutěží s užitkovými rostlinami o světlo, vodu a živiny divoce rostoucí rostliny přizpůsobené danému stanovišti jako plevel. Použitím vhodných pesticidů zkouší zemědělství chránit svůj porost užitkových rostlin. Herbicidy, insekticidy a fungicidy činí přes 90 % produkce pesticidů, zbytek produkce se zaměřuje proti ostatním škodlivým organismům (3).

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Cizorodé látky v potravinách

1.1.1 Ochranářské prostředky pro rostliny

Obecně lze konstatovat, že používání pesticidů a příbuzných biologicky aktivních sloučenin se dnes již stalo neodmyslitelným prostředkem intenzifikace zemědělské produkce. Použití těchto agrochemikálií zajišťuje nejenom vyšší výnosy, ale promítá se velmi často i do vyšší nutriční, senzorické či technologické jakosti pesticidy ošetřených produktů.

Kromě nesporných pozitivních aspektů vyplývajících z používání pesticidů existují i negativní dopady chemizace. Potenciální přítomnost reziduí pesticidů v potravinách je zvláště citlivě vnímána konzumenty a je jednou z hlavních příčin vzrůstajícího zájmu o produkty tzv. ekologického zemědělství, při jejichž produkci je použití syntetických pesticidních sloučenin vyloučeno.

Podle definice FAO se jako pesticidy označují všechny sloučeniny nebo jejich směsi určené pro prevenci, ničení, potlačení, odpuzení či kontrolu škodlivých činitelů, to znamená nežádoucích mikroorganismů, rostlin a živočichů během produkce, skladování, transportu, distribuce a zpracování potravin, zemědělských komodit a krmiv. Termín pesticidy zahrnuje též sloučeniny podávané zvířatům pro kontrolu ektoparazitů a látky používané jako regulátory růstu, desikanty a inhibitory klíčení aplikované na plodiny před či po jejich sklizni.

Pesticidy jsou látky reprezentující širokou škálu chemických sloučenin často velmi složité struktury. Pro usnadnění komunikace se většina chemických pesticidů označuje triviálními názvy. Daná biologicky účinná látka může být v pesticidním přípravku přítomna sama či ve směsi s dalšími pesticidy, může být také obsažena v různých typech přípravků lišících se označením (komerčním názvem).

V současné době je v celosvětovém měřítku registrováno zhruba 800 sloučenin, které se využívají ve smyslu výše uvedené definice (především k ochraně rostlin). Běžným kritériem používaným pro jejich klasifikaci je cílový (nejčastěji škodlivý) organismus. Z tohoto pohledu uvádí nejvýznamnější typy pesticidních sloučenin tab.1 (4)

Tabulka I. Klasifikace pesticidů podle cílových škodlivých činitelů

Skupina pesticidů	**Cílový škodlivý činitel**
insekticidy	hmyz
akaricidy	pavoukovití
fungicidy	plísně, cizopasné houby
herbicidy	plevelné rostliny
moluskocidy	měkkýši
rodenticidy	hlodavci
regulátory růstu rostlin	kulturní rostliny

Ve skupině houbomorných přípravků (fungicidů) se obyčejně vyčleňují látky, které se používají k ochraně semen a nazývají se mořidla.. V současné době se některé přípravky proti chorobám a škůdcům používají víceúčelově – k ochraně rostlin i k moření nebo preparaci semen.

Ochranu rostlin před houbami lze rozčlenit do skupin podle toho, které rostlinné orgány nebo části houby napadají:

- ochrana rostlin proti množárenským plísním a ostatním půdním houbám,
- ochrana rostlin proti houbám parazitujícím uvnitř stonků,
- ochrana rostlin proti padlí,
- ochrana rostlin proti rzím,
- ochrana rostlin proti perenosporám,
- ochrana rostlin proti plísním rodu *Botrytis* (5).

Pro účely vyhlášky 158/2004 se rozumí

a) rezidui pesticidů zbytková množství pesticidů a jejich metabolitů a rozkladných nebo reakčních produktů, které se nacházejí v potravinách nebo na potravinách;

b) maximálním limitem reziduí pesticidů nejvyšší přípustné, toxikologicky přijatelné množství pesticidů, které je výsledkem použití pesticidů v souladu se správnou zemědělskou praxí při ochraně rostlin během vegetace a skladování, nebo je výsledkem kontaminace životního prostředí dnes již nepoužívanými pesticidy (6).

Fyzikální a fyzikálně-chemické děje jako je vstřebávání, distribuce, vylučování xenobiotik jsou projevem organismu na cizorodou látku, která může být zabudována nebo vyloučena. U většiny xenobiotik dochází přitom k více či méně rozsáhlým chemickým změnám,

souborně označovaným jako biotransformace; produkty této látkové přeměny jsou metabolity s chemickou strukturou proti původní látce pozměněnou. Biotransformaci a vylučování je možno přijímat jako finální fázi působení organismu na xenobiotika. Jsou však i takové cizorodé látky včetně léčiv, které biotransformaci nepodléhají a jsou vylučovány z organismu v původních formách. Jsou označovány jako látky biochemicky inertní, přičemž však mohou být biologicky aktivní (7).

1.1.2 Přísady

Ke komerčně zpracovaným potravinám se přidávají různé substance. Tato aditiva (přísady) nejsou vždy přírodního původu, jsou vyráběná synteticky a v některých případech dokonce pomocí genové technologie. Aditiva byla používána již mnohem dříve a nutno přiznat, že užívání aditiv v současné době při průmyslové výrobě potravin má z hlediska technologických výrobních postupů svoje opodstatnění. Přítomnost aditiv ve výrobku bývá deklarována na obalu (8,10).

Základní rozdělení aditiv:

- látky upravující skladovatelnost potravin – konzervační látky, antioxidanty a jejich synergisté,
- látky upravující vzhled potravin – barviva, bělidla,
- látky upravující vůni a chuť potravin – aromata, esence, náhradní sladidla, okyselující látky, látky hořké, intenzifikátory a modifikátory chuti,
- látky upravující fyzikální vlastnosti potravin – zahušťovadla, želírující látky, emulgátory a stabilizátory emulzí, čiřidla, komplexotvorné látky, stabilizátory,
- látky upravující biologickou hodnotu potravin – vitaminy a jejich prekursory, esenciální aminokyseliny, mastné kyseliny, mikroelementy,
- další technologicky významné látky – např. minerální látky,
- enzymy.

Skupiny aditivní látek se upravují v souladu s měnícími se předpisy. Např. podle u nás platných vyhlášek látky upravující biologickou hodnotu potravin a další technologicky

významné látky mezi aditiva nepatří. Podobně se do samostatné skupiny řadí aromatické látky (9).

Barviva jako aditiva

Azobarviva byla v potravinářské výrobě u nás zakázána pro svou kancerogenitu. Tartrazin (E 102) byl v roce 1992 zakázán v Německu, Rakousku, Skandinávii, Švýcarsku. Amaranth (E 123) je v USA zakázán, jinak je povolen jen k barvení lihovin a aperitivů, erythrosin (E 127) je povolen pouze u koktejlů, azorubin (E 122) k barvení nápojů, pudingů a cukrovinek a červeň 2G (E 128) k barvení mas. Návrat azobarviv umožňuje směrnice EU. Neškodné přírodní barvivo je zelený chlorofyl (E 140), příp. obohacený o měď (E 141), je vyráběn extrakcí z kopřiv. Barví se jím některé likéry, deserty, nápoje a cukrovinky.

Konzervační látky

K neškodným se řadí kyselina sorbinová (E 200) a její sloučeniny (soli) se sodíkem, draslíkem a vápníkem (E 201, E 202, E 203). Aditiva od E 210 do E 219 mohou vyvolávat alergie, další až po E 228 také migrény. Postupně se upouští od používání kyseliny benzoové (E 210) a dává se přednost vakuovému balení. Oxid siřičitý (E 220) působí současně jako antioxidant, má negativní vliv na obsah vitaminu B1 v potravinách, stejný účinek mají i jeho sloučeniny E 221 až 228. Nisin (E 234) a natamycin (E 235), slouží jako antibiotikum, pro tyto vlastnosti se používá k ošetření sýrů a mnohých uzenářských výrobků. K ošetření povrchu citrusových plodů slouží difenyl, bifenyl (E 230) přesto, že je to fungicid. Dusitan a dusičnan sodný (E 250, E 251), příp. i dusičnan draselný (E 252) se používají k výrobě uzenářských výrobků, z nichž vzniklý oxid dusnatý dává masu stálou červenou barvu, která se udrží i po tepelném zpracování. Kromě toho mají tyto látky výrazně baktericidní vlastnosti, mimo jiné ničí i *Clostridium botulinum*.

Okyselující prostředky

Kyselina octová (E 260) a její sloučeniny acetáty draslíku, sodíku, vápníku (E 261, E 262, E 263) a kyselina mléčná (E 270) nejsou škodlivé, působí také jako konzervační látky. Kyselina propionová (E 280) má taktéž konzervační vlastnosti. Koncem osmdesátých let

bylo její použití zakázáno v Německu, Rakousku a Švýcarsku, stejně tak i jejích sloučenin (solí) se sodíkem, vápníkem a draslíkem (E 281, E 282, E 283), v současné době je v zemích EU povolena.

Antioxidanty

Látky s protiokysličujícími vlastnostmi od E 300 do E 309 jsou nezávadné. Jsou to kyselina askorbová - vitamin C (E 300) a její sloučeniny se sodíkem, vápníkem (E 301, E 302) a sloučeniny s estery mastných kyselin askorbylpalmitát a askorbylstearát (E 304) a vitamin E - tokoferol (E 306) přírodního původu a tokoferoly syntetické alfa-, gama- a delta- (E 307, E 308, E 309). Syntetické tokoferoly v potravinách omezují pozvolné žluknutí tuků. Propylgalát (E 310), octylgalát (E 311) mohou vyvolávat alergie, event. i migrénu, stejně jako butylhydroxyanisol - BHA (E 320) butylhydroxytoluol - BHT, které se přidávají do žvýkaček, výrobků z brambor, fritovacích olejů. Také lecitin (E 322) údajně může vyvolávat alergické reakce i migrénu. Kyselina ortofosforečná (E 338) a fosfáty mají navíc okyselující, stabilizační a emulgační vlastnosti. Vyšší dávky údajně vedou k omezení příjmu vápníku, hořčíku a železa organismem, a podílejí se na vzniku "syndromu hyperaktivity dětí". V nápojích typu Cola je E 338 jako okyselující aditivum. Umělé antioxidanty E 385 kalcium-dinatriumethylen-diamintetraacetát (ETA nebo také EDTA), může vyvolávat alergie. V potravinách je toto aditivum škodlivé pro malé děti.

Zahušťovací a gelírovací přísady

Zahušťovací a gelírovací přísady od E 406 do E 415, nevyvolávají vážnější potíže, pouze vysoké dávky působí projímavě. Totéž platí i pro další aditiva této kategorie.

Emulgátory

Látky ze skupiny polysorbátů (E 432 až E 436) u některých osob vyvolávají alergické reakce. Pektin (E 440a) je látka přírodní bez rizika. Amoniumfosfatid (E 442) působí také jako stabilizátor. Difosfát (E 450), trifosfát (E 451) a polyfosfát (E 452) jsou emulgátory i stabilizátory kyselosti a mohou nepříznivě ovlivnit metabolismus minerálních látek v kostech. Celulóza přírodního původu (E 460) a z ní umělá aditiva (E 461 až E 466) jsou

považovány za neškodné, stejně jako estery kyseliny octové (E 472a), kyseliny mléčné (E 472b) a kyseliny citronové (E 472c). Natrium karbonát - soda (E 500) ve vysokých dávkách zvyšuje kyselost žaludečních šťáv. Potraviny obsahující aditivum hliník a jeho sloučeniny (E 520 až E 523) nejsou vhodné pro osoby trpící nemocemi ledvin, nicméně hliník (aluminium) je podezírán z podílení se na vzniku Alzheimerovy choroby. Antiaglomerační činidla (zabraňují "hrudkovatění", spékání sypkých látek) - pro kuchyňskou sůl jsou natrium-, kalium- a kalcium-ferokyanid (E 535, E 536, E 538) - obsahují prudce jedovatý kyanovodík, ovšem v zcela bezrizikovém množství. E 536 (kaliumferokyanid) u pokusných zvířat poškodil ledviny. Kyselina glukonová - glukonát (E 574), regulátor kyselosti a stabilizátor, ve vyšších dávkách působí projímavě, je aditivum v limonádách a některých cukrovinkách.

Aditiva zvýrazňující či zesilující chuťové vlastnosti

Od E 620 po E 640, dále pak E 901, E 904 a E 927. Kyselina glutaminová (E 620) a její sloučeniny (soli) se sodíkem, draslíkem, vápníkem, amoniakem a hořčíkem (E 621 až E 625) patří mezi aditiva riziková, podílí se na vzniku migrény a údajně také u některých osob na vzniku "syndromu čínské restaurace". Přidávají se do výrobků z masa, ryb, do polévek, omáček, polévkového koření a kostek, desertů, cukrovinek i do nápojů. Kyselina gualynová (E 626), kyselina inosinová - inositát (E 630) a jejich chemické sloučeniny zesilují účinek glutamátů. Glutamáty (E 621 až E 625) vyvolávají u pokusných zvířat změny na játrech a mozku.

Sladidla

Aspartam (E 951) se vyrábí z fenylalaninu a z kyseliny asparagové, vyvolává migrénu a alergické reakce, je nevhodný pro nemocné fenylketonurií. Aspartam je přidáván do nápojů, žvýkaček, mléčných výrobků. Cyklamát (E 952) je běžně používané sladidlo pro diabetiky. Snesitelná dávka činí 11 mg/kg/den. Umělá sladidla jsou obvykle prostá kalorií - nápoje a sirupy jimi slazené jsou prezentovány jako LIGHT.

Škodlivé projevy aditiv se mohou u lidí dostavit až po delší době nepřetržitého užívání, třeba až po desetiletích či dokonce až po generacích. Chemické zatěžování i malými dávkami vede k jejich kumulativnímu účinku (10).

Od roku 1989, kdy Evropská unie vydala směrnice pro používání přísad do potravin, jsou tato aditiva taktéž na obalech uváděna. Pro jejich označení je užíváno písmeno E s tří- až čtyřmístným číslem, popř. název a jejich účelová funkce (emulgátor, apod.). U nás je celá oblast bezpečnosti potravin ošetřena příslušnými zákony, které "harmonizují" s legislativou EU.

Aditiva pro potravinářství mají různý původ, v textu je vyjadřován zkratkami: přír. (přírodní), rost. (rostlinný), živ. (živočišný), uměl. (umělý), synt. (syntetický), gen-tech. (původ v genetických technologiích). Místo slovního komentáře a pro jednoduchost následují symboly, které vyjadřují:

- (X) látka, jejíž použití je obecně nebezpečné (s rizikem)
- (0) látka, jejíž použití není nebezpečné (bez rizika)
- (0-) látka není nebezpečná, ale nemá být používána často
- (A) látka může být alergen a vyvolat alergii
- (Rs) látka pro jedince z tzv. "rizikových skupin" nevhodná (např. pro alergiky, astmatiky)
- (?) riziko zatím nejasné (11).

1.2 Fungicidní látky

Fungicidní látky byly vyvinuty proti houbám.

1.2.1 Houby a mykotoxiny

Škodlivé houby se vyvíjejí především nad zemí na listech, stoncích a plodech rostlin. Pronikají buď zevnitř přes kořeny a stonky, nebo zvenčí přes listy a plody. Vlhkost a dusné horko poskytují houbovým sporám zvlášť příznivé podmínky k rozmnožování (12).

Jejich základním zdrojem je půda a tlející vlhká organická hmota. Četné plísně mají k dispozici hydrolytické enzymy – amylasy, celulasy, pektinasy, protenasy, které vylučují do

prostředí. Řada druhů vláknitých plísní je schopna degradovat četné organické cizorodé látky, zejména některé pesticidy, a poměrně široké spektrum ropných uhlovodíků; uvádí se ponejvíce *Mucor sp., Rhizopus sp., Cunninghamella sp., Cladosporium herbarum, Cladosporium resinae, Oxysporus sp.* a mnohé další. *Aspergillus niger* je průmyslově využíván k produkci kyseliny citronové a glukonové na principu neúplných oxidací. *Aspergillus terreus* je průmyslovým producentem kyseliny itakonové. *Rhizopus nigricans* je průmyslovým producentem kyseliny fumarové, *Aspergillus niger* a *A.oryzae* jsou průmyslově používány jako producenti pektinas a celulas. Při rovnováze mezi bakteriemi a plísněmi je význam plísní v aktivovaných kalech pozitivní – podílejí se na rozkladu přítomných organických látek. Pokud je jejich růst nadměrný, např. při poklesu pH nebo převaze dusičnanového zdroje dusíku, pak mohou způsobovat technologické obtíže až bytnění kalu. Výskyt tohoto jevu je však velmi řídký (13).

Strupovitost jablka je choroba způsobená houbou *Venturia inaequalis*. Patří mezi nejrozšířenější a nejnebezpečnější choroby jablka. *Monilioza* je hniloba způsobená houbou *Sclerotinia fructigena*. Napadá i hrušky, třešně, švestky, angrešt, hrozny révy vinné. *Hořká hniloba* je choroba způsobená houbou *Gleosporium fructigenum.*. *Jádřincová a okrajová hniloba fusariová* vzniká působením *fusarií* většinou na okraji poraněného plodu a infekcí se šíří do poraněného místa plodu. *Zelená hniloba penicilinová* je způsobena plísněmi *Penicillium expansum* a *Penicillium glaucum*. *Perenospora* révy vinné je způsobená houbou *Plasmopara viticola*. *Padlí* révy vinné způsobuje houba *Uncinula necator*. *Plíseň šedá* (*Botrytis cinerea*) napadá bobule zejména v době zrání, více ve vlhkém počasí (14).

Vláknité plísně jsou poněkud jinak citlivé na desinfekční a konzervační látky než bakterie, což je dáno odlišným typem buněk a metabolickými rozdíly. Výrazný je tento jev u antibiotik.

Mnohé druhy plísní jsou závažnými producenty toxických látek, vylučovaných do prostředí. Tyto látky jsou označovány jako mykotoxiny a jsou často toxické již ve velmi nízkých koncentracích, jsou i karcinogenní (15).

Za nejnebezpečnější ze zdravotního hlediska jsou považovány aflatoxiny, produkované plísněmi *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus*, také druhem *A. nomius.* Dále trichotheceny a zearalenon, produkované některými druhy rodu *Fusarium* případně ještě dalšími plísněmi a produkty některých *penicilií a aspergilů*. Patulin je produkován řadou druhů mikroskopických hub rodů *Aspergillus, Byssochlamys a Penicillium*. Vyskytuje se na

kazícím se ovoci, velice často v jablkách. V ovoci se vyskytují ochranné látky (např. vitamin C), které zabrání rozkladu patulinu při tepelném opracování kompotů, dření i moštů. Ochratoxin A je ze skupiny ochratoxinů nejdůležitější a nejtoxičtější. Je produkován některými druhy rodů *Aspergillus* a *Penicillium*. Hlavním účinkem ochratoxinu A na úrovni organismu je útlum imunity. Dále jsou mykotoxiny produkovány některými příslušníky rodů *Rhizopus, Mucor, Alternaria, Aureobasidium* a *Cladosporium*. Dnes je známo na 200 druhů plísní, produkujících za určitých podmínek mykotoxiny a více než 100 různých mykotoxinů (16,17).

1.2.2 Škodlivost fungicidních prostředků

Rozšíření environmentálních problémů včetně toxicity způsobují vlastnosti sloučenin, jež zpomalují biodegradaci a schopnost bioakumulace uvnitř organismů. Patří sem tyto organické látky:

- pesticidy, zvláště ty, které obsahují chlor,
- polychlorované bifenyly,
- dioxiny (18).

Byla studována schopnost přeměny a metabolismus PCB v rostlinných buňkách pěstovaných in vitro. Přeměna PCB byla sledována měřením úbytku kongenerů PCB s různým stupněm chlorace obsažených v komerční směsi označené Delor 103 a individuálních kongenerů mono- a dichlorbifenylů. Úbytek PCB po biodegradaci byl analyzován na plynovém chromatografu s EC detektorem. Schopnost přeměňovat PCB byla testována u 21 in vitro kultur různých rostlinných druhů a u vybraných druhů byl sledován vliv morfologické diferenciace. Vyšší schopnost metabolizovat PCB byla naměřena u diferencovaných a/nebo kultur transformovaných plasmidem půdní bakterie u *Agrobacterium*. Tyto kultury též lépe reagovaly na toxické působení PCB, což se projevilo vyšším nárůstem buněk. Nejvyšší konverze monochlorbifenylů byla prokázána u kultury tabáku. Kongener PCB 4 (2,2´-dichlorbifenyl) byl za daných podmínek metabolizován na zůstatek 84 %, PCB 10 (2,6-dichlorbifenyl) a kongener PCB 6 (2,3´-dichlorbifenyl), byly metabolizovány na zůstatkové množství 87 %, resp. 89 %. Kongenery PCB 13, 14 a 15 nebyly metabolizovány vůbec. Další pokusy byly zaměřeny na sledování schopnosti

vybraných rostlin odstraňovat PCB z reálné kontaminované půdy, současně byl sledován vliv kultivace rostlin na přítomnost a růst mikroorganismů žijících v rhizosféře a na povrchu kořenů. V půdě osázené lilkem a tabákem byl po 5 měsících stanoven poměrně významný pokles PCB v půdě, obě rostliny se osvědčily i v pokusech s kontaminovanou půdou v kultivačních nádobách (lilek 78 %, tabák – zůstatek 76 %). Z výsledků je zřejmý pozitivní vliv přítomnosti rostlin na růst indigenní, rhizosférní mikroflóru včetně mikroorganismů schopných využívat bifenyl jako jediný zdroj uhlíku a energie. V nevegetované půdě se vyskytovalo jen minimální množství těchto bakterií, u nichž je předpoklad, že mohou být také schopny odbourávat PCB. Celkové počty bakterií, izolované z rhizosférní oblasti byly srovnatelné, pouze u tabáku byl izolován počet vyšší, stejně jako v příp. bakterií rodu *Pseudomonas* a mikroorganismů rostoucích na bifenylu. Analýza hlavních produktů byla zaměřena na hydroxychlorbifenyly. Analýza a srovnání toxicity monochlorbifenylů a hydroxychlorbifenylů jako prvých vznikajících produktů metabolismu u rostlin ukázaly, že vznikající intermediány – hydroxychlorderiváty jsou toxičtější pravděpodobně díky vyšší rozpustnosti, než původní sloučeniny. Z tohoto důvodu následuje v rostlinných buňkách další krok přeměny hydroxychlorderivátů např. na konjugáty s cukry nebo zabudování do buněčné stěny. Z výsledků je zřejmé, že působením rostlin dochází ke snížení obsahu PCB v kontaminované půdě, částečně vlivem degradujících mikroorganismů, jejichž růst rostlina podporuje a částečně příjmem PCB do rostliny s následnými metabolickými přeměnami (19).

Nitrofen

Synonyma: 1836-75-5; 2,4-dichloro-1-(4-nitrophenoxy)benzene; 2,4-dichlorophenyl p-nitrophenyl ether; FW925; Mezotox-; Niclofen-; Nitrofen-; Nitrophen-; TOK-; Triziliu-

Jedná se o nepovolený herbicid na bázi difenyleterů, který byl zaveden společností Rohm a Haas v roce 1964. Používal se v boji proti jednoletým plevelům v brukvovitých plodinách a ozimé pšenici asi v 25 zemích světa. Aplikoval se v množství asi 3.4-4.5 kg/ha. Pro tento herbicid Codex Alimentarius nestanoví limity MRL ani ADI.

Byla popsána jako látka vyvolávající nádorová onemocnění, databáze IRIS však nestanoví OSF ani RfD pro orální příjem a nekarcinogenní efekt. Akutní toxicita se pohybuje na úrovni LD50= 300-1620 mg/kg t.hm. Rezidua nitrofenu lze nalézt v mnoha

tkáních těla zvířat exponovaných látce. Biodegradace v prostředí je poměrně rychlá. Biokoncetrační faktor BCD = 9.46 - je tedy možná, nejvyšší koncentrace jsou v tuku (20).

Dioxiny, dibenzofurany a PCB s dioxinovým efektem

Dietární expozice toxickým kongenerům dioxinů (PCDD), dibenzofuranů (PCDF) a polychlorovaných bifenylů (PCB) s dioxinovým efektem je rámcově zjišťována od roku 2000. PCB se ukládají v tělesných tucích, odkud se jen velmi pomalu vylučují. Při chronickém působení způsobují ekzém, dermatitidy, jsou neurotoxické, hepatotoxické a patří mezi podezřelé karcinogeny. Jejich spalováním vznikají ještě mnohem toxičtější látky, polychlorované dibenzo-p-dioxiny (PCDD) a dibenzofurany (PCDF) (21,22).

Persistentní (stabilní) organické znečišťující sloučeniny – POPs

POPs vstupují do potravního řetězce a kumulují se v tukových tkáních, přecházejí i do mléka. Zpravidla jsou to organické sloučeniny obsahující chlor. Rizikovým faktorem je jejich vysoká stabilita, tj. jejich poločas životnosti v prostředí se pohybuje v desítkách až stovkách let (22).

Rakovinotvorné prostředky k ošetřování rostlin

V únoru roku 1986 vypukl jeden z mnoha skandálů: ALACHLOR, vyráběný americkou firmou Monsanto, a také prodávaný pod označením LASSO, byl dán do spojitosti se vznikem rakoviny. Zároveň byly pesticidy na bázi CYANIZINU, ale také v Itálii a celé Evropě velmi rozšířené prostředky BLADEX, FORTROL a ZEPEX označeny za teratogenní - vyvolávali poškození plodu v těle matky. Teratogenní účinky jsou všeobecně také spojovány s rakovinotvornými účinky.

Zde je krátký seznam rakovinotvorných pesticidů, které byly v posledních letech předmětem sporů:

EDB (Etylen olibromo), obsažený ve více jako stovce potravin na bázi obilí, v ovoci a zelenině. V roce 1948 uveden na trh a v roce 1970 amerických národním Institutem pro rakovinu označen jako možný karcinogen, příčina anomálií a genetických poškození. CAMPHECHLOR, CYPRAZIN, CHLOROBROMURON, DINITRAMIN,

PHOSPHAMIDON (poslední látka vyráběná Ciba-Geigy a do roku 1986 na trhu ve Švýcarsku, poslední tři látky prodávány minimálně do roku 1985 v různých zemích Evropského společenství).

HCB (Hexachlorobenzen), používaný jako ochrana obilí před napadení houbami, je zodpovědný za rakovinu a leukémii; zahubil jen v Turecku (1955 - 1961) asi 600 osob. Tento produkt byl nalezen také v mateřském mléce.

ENDRIN, ALDRIN, CAMPHECLOR, CLORDAN, DIBROMOCHLORAPROPAN (DECP), DIELDRIN, LINDAN, PENTACHLOROPHENYL, PARAQUAT, PARATHION a další látky byly označeny za karcinogenní, silně zamořující a potravinový řetězec otravující pesticidy. PARAGUAT byl ve Švýcarsku v 80. letech na trhu a od roku 1991-92 tento prostředek zmizel ze seznamu.

Škodlivý produkt je stažen z trhu až když způsobí nevratné škody:

Prostředek DECP měl na svědomí v 60. letech pracovníky kalifornské továrny Occidental Petroleum´s Lathrop, kteří se stali neplodní. DECP byl nalezen v ovoci, které jedli Američané a v roce 1977 byl EPA zakázán s jednou výjimkou: plantážích ananasovníku. Dva roky po zákazu používání bylo nalezeno ve spodních vodách San Joaquim Valley (Kalifornie), ze kterých se získávala pitná voda pro lidské příbytky.

V roce 1986 prezentoval italský ministr zdravotnictví parlamentu zprávu o programu a výsledcích Instituto Superiore di Sanita, který prováděl výzkum v oblasti "zbytková množství chloruratenu a polychlorodiphenyl-pesticidů v lidském mléce a dalších látkách". Výzkum ukázal, že ve čtyřiceti vzorcích mateřského mléka odebraného během jednoho roku (říjen 1983 - říjen 1984) bylo obsaženo podstatné množství DDT v porovnání s ostatními pesticidy. Přičemž DDT bylo zakázáno v Itálii roku 1970. Můžeme se jen ptát, zda-li to je následek velice pomalého odbourávání DDT z lidských tkání nebo fakt, že DDT a jeho další analogy se dále používají v zemích třetího světa pro postřik exotického ovoce dováženého do Evropy.

Vzhledem k těmto zneklidňujícím faktům, které hovoří o přibývajícím růstu otrav a nádorů, chemický průmysl popírá skutečný stav věcí. V jednom prospektu německého svazu chemického průmyslu se můžeme například dočíst, že pesticidy se dobře odbourávají, "a proto nezanechávají žádné zbytky v rostlinách" (23).

1.2.3 Současná legislativa

Hodnocení zdravotní nezávadnosti přípravku na ochranu rostlin, jejich klasifikace nebezpečnosti, označování etiket a stanovení MRL pesticidů se posuzuje podle následujících předpisů:

Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích

Uvádění na trh biocidů se provádí podle **Zákona č. 356/2003 Sb.,** o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých dalších zákonů

Hodnocení zdravotní nezávadnosti, jejich klasifikace nebezpečnosti a označování etiket se posuzuje podle následujících předpisů:

Vyhláška č. 164/2004 Sb., kterou se stanoví metody pro zjišťování nebezpečných vlastností chemických látek a přípravků z hlediska hořlavosti a oxidační schopnosti

Vyhláška č. 220/2004 Sb., o náležitostech oznamování nebezpečných chemických látek a vedení jejich evidence

Vyhláška č. 221/2004 Sb., kterou se stanoví seznamy nebezpečných chemických látek a přípravků, jejichž uvádění na trh je zakázáno nebo omezeno

Vyhláška č. 222/2004 Sb., kterou se u chemických látek a chemických přípravků stanoví metody pro zjišťování fyzikálně-chemických a výbušných vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí

Vyhláška č. 223/2004 Sb., kterou se stanoví bližší podmínky hodnocení rizika nebezpečných chemických látek pro životní prostředí

Vyhláška č. 231/2004 Sb., o formě a obsahu bezpečnostního listu k nebezpečné chemické látce a přípravku

Vyhláška 234/2004 Sb., o možném použití alternativního nebo jiného odlišného názvu nebezpečné chemické látky a udělování výjimek na balení a označování nebezpečných chemických látek a přípravků

Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 318/2003 Sb., kterou se stanoví zdravotní požadavky na identitu a čistotu přídatných látek (změnila **Vyhlášku č. 54/2002 Sb**.)

Vyhláška č. 132/2004 Sb., o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení

Vyhláška č. 158/2004 Sb., kterou se stanoví maximálně přípustné množství reziduí jednotlivých druhů pesticidů v potravinách a potravinových surovinách (změna **Vyhláškou č. 68/2005 Sb**.)

Vyhláška č. 304/2004 Sb., kterou se stanoví podmínky a druhy přídatných a pomocných látek

Vyhláška č. 305/2004 Sb., kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustná množství v potravinách

Vyhláška č. 446/2004 Sb., kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky použití látek přídatných, pomocných a potravinových doplňků

Vyhláška č. 447/2004 Sb., kterou se stanoví požadavky na množství a druhy látek určených k aromatizaci potravin, podmínky jejich použití, požadavky na jejich zdravotní nezávadnost a podmínky použití chininu a kofeinu (24,25,26)

Nařízení 178/2002/ES stanovující obecné principy a požadavky na potravinové právo, zřizující Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) a stanovující postupy v záležitostech závadnosti potravin

Nařízení 852/2004/ES o hygieně potravin

Nařízení 853/2004 o specifických pravidlech pro hygienu potravin

Nařízení 2232/96/ES stanovující postup pro vonné a chuťové látky určené pro použití do potravin.

Nařízení 1565/2000/ES s opatřeními pro použití vyhodnocovacího programu pro aplikaci nařízení 2232/96 týkajícího se aromatických látek.

Nařízení 2298/2001/ES stanovující podrobná pravidla pro export výrobků dodávaných jako pomocný prostředek pro potraviny.

Nařízení 622/2002/ES stanovující termín pro poskytování informací pro vyhodnocení chemicky definovaných ochucovacích látek v potravinách.

Nařízení 1217/2002/ES o informacích, jež mají poskytovat dovozci nebo výrobci některých látek Einecs, a o provádění některých testů podle nařízení č. 793/93.

Nařízení 2065/2003/ES o kouřových aromatech používaných nebo vhodných k použití v potravinách.

Nařízení 358/2005/ES o časově neomezeném povolení některých doplňkových látek a povolení nových použití doplňkových látek, které jsou již povoleny v krmivech

Nařízení 2377/90/EHS stanovující postupy Společenství pro stanovení maximálních limitů reziduí veterinárních léčiv v potravinách živočišného původu.

Nařízení 315/93/EHS, které stanovuje postupy Společenství týkající se kontaminantů v potravinách.

Nařízení 645/2000/ES stanovící podrobná prováděcí pravidla nutná pro rychlou funkci některých opatření čl. 7 směrnice 90/642 týkající se systému monitoringu reziduí maximálních limitů pesticidů v a na obilovinách a výrobcích rostlinného původu včetně ovoce a zeleniny.

Nařízení 466/2001/ES stanovící max. hladiny některých kontaminantů v potravinách.

Nařízení 396/2005/ES o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu a o změně směrnice

Rozhodnutí [2005/233/ES], kterým se mění rozhodnutí [2004/432/ES] o schválení plánů monitoringu reziduí předložených třetími zeměmi podle směrnice Rady 96/23/ES (27,28)

Nařízení 208/2005/ES poprvé stanovuje mezní hodnoty pro polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), tzn. doplňuje nařízení 466/2001/ES týkající se kontaminantů. S tím souvisí nová **směrnice 2005/10/ES** týkající se metod stanovení benzo[a]pyrenu v potravinách. Dále se podle **doporučení 2005/108/ES** požaduje další sledování obsahu PAU; žádá členské státy o dodání výsledků vlastních sledování do 31. 10. 2006. Mají být zjišťovány hodnoty PAU v potravinách, pro které jsou stanoveny limity v nařízení 208/2005, dále v sušeném ovoci, potravinových doplňcích, kakaovém másle a dalších potravinách, které by mohly PAU obsahovat. Pozornost má být také věnována metodám používaným při výrobě tuků a olejů, pro uzení a sušení potravin. Nařízení 208/2005/ES doplňuje přílohu nařízení 466/2001/ES s požadavky týkajícími se kontaminantů v potravinách o oddíl 7, v němž jsou uvedeny *maximální limity obsahu benzo/a/ pyrenu* v některých druzích potravin (29).

Dosud byly MRL pro rezidua pesticidů stanoveny na úrovni Společenství asi pro 150 pesticidů. Neharmonizované pesticidy (tj. pesticidy bez EU MRL) jsou podchyceny legislativou členských států. Pokud neexistuje platná EU legislativa, nýbrž MRL pro specifický pesticid/komoditu na národní úrovni, pak lze komoditu importovanou do této země uvést na trh. Importéři se mohou setkat s problémy, pokud chtějí uvést na trh v členském státu Společenství výrobek, který nemá národní MRL.

V roce 2005 Evropská komise vypracuje seznam plodin, pro které by se měly v rámci EU stanovit MRL. Pro každou z těchto plodin budou shromážděny všechny současné národní MRL a bude vybrána nejvhodnější MRL, která se bude používat na úrovni EU. Budou rovněž identifikovány pesticidy, pro které není nezbytné MRL stanovovat. Očekává se, že tato práce potrvá do poloviny roku 2006. Poté bude nařízení plně aplikovatelné, přičemž se připouští, že k úplné harmonizaci může dojít po určitém přechodném období.

V roce 1992 Evropská komise zahájila náročný program hodnocení všech aktivních přísad používaných v pesticidech v rámci EU. Tento proces hodnocení je založen na vědeckém posuzování a prověřování nezávadnosti každé substance z hlediska lidského zdraví, životního prostředí, ekotoxikologie a reziduí v potravinovém řetězci. Jakmile je aktivní přísada zhodnocena, rozhoduje se, zda bude zařazena do pozitivního seznamu či ne. Tento program bude dokončen v roce 2008 (30).

1.3 Metodické aspekty stanovení antimikrobiální aktivity sloučenin in vitro

Výzkum a vývoj nových antimikrobiálně aktivních látek přírodního, syntetického resp. semisyntetického původu zůstává v popředí zájmu. Antimikrobiálně aktivní látky sehrávají nezanedbatelnou úlohu v potravinářském a kosmetickém průmyslu, kde ve formě aditiv zabraňují rozvoji nežádoucí mikroflóry ve finálních výrobcích.

Vzhledem na rozsáhlý rozvoj rezistence proti účinným skupinám antibiotik je žádoucí neustálý výzkum nových antimikrobiálně aktivních sloučenin. Nezanedbatelnou úlohu v něm sehrává i vývoj nových testovacích technik a studium teoretických poznatků o přírodních a syntetických komponentech.

1.3.1 Stanovení antimikrobiální aktivity

Stanovení antimikrobiální aktivity sloučenin in vitro

Kritérium pro posouzení antimikrobiálního účinku může být jev kvantového charakteru. Intenzitu růstu můžeme vyjádřit v délkových jednotkách, v objemových jednotkách, v jednotkách váhových (biomasa – sušina) nebo v jednotkách jiného druhu, vyjadřujících nepřímo intenzitu růstu (vyjádření růstu podle intenzity zákalu kultivačního média…).

Na sledování účinku látek na mikroorganismy můžeme používat metody přímé nebo nepřímé. Jejich výběr je do velké míry určený typem sledovaného mikroorganismu.

Vhodnou metodou na sledování růstu populací jednobuněčných organismů je určení celkového počtu buněk v jednotce objemu, za pomoci sčítávacích komůrek. Sledování růstu jednobuněčných živých organismů se uskutečňuje i roztěrem. Na povrchu média, resp. v médiu vyrostou makroskopicky viditelné a navzájem oddělené kolonie. Za předpokladu, že každá kolonie představuje potomstvo jedné buňky, se zjistí množství živých buněk v objemové jednotce analyzovaného vzorku. Vhodnější variantou je však uvádění počtu kolonietvorných jednotek (KTJ), ne počtu živých buněk, protože jednotlivé kolonie mohou vyrůstat nejen z jednotlivých buněk, ale i z jejich shluků.

Turbidimetrické (nefelometrické) metody se používají na určení celkového mikrobiologického materiálu v suspenzích, přičemž jejich použitelnost se omezuje na jednobuněčné útvary. Když světelný paprsek přechází přes suspenzi, je množství rozptýleného světla přímo úměrné denzitě buněk.

Růst vláknitých hub se obyčejně sleduje na základě měření průměru makrokolonií na agarizovaných živných médiích v závislosti na čase nebo určením suché hmotnosti biologického materiálu je to jediná přímá metoda na sledování hmotnosti buněk. Vyrostlá kultura se přefiltruje přes předem vysušený a odvážený filtrační papír, vysuší a odváží. Inhibiční účinek na růst myceliarních hub je možné sledovat i na základě inhibice klíčení spór. Test se uskutečňuje v malých objemech živného média za neustálého mikroskopického pozorování.

Nepřímo můžeme zjistit účinek na růst tak, že stanovujeme některý chemický komponent buněčného materiálu (uhlík, dusík). Kritérium účinku může být zbrzdění

některých životních pochodů nebo projevů. V případě, že není možné takto stanovit účinek látek na růst a rozmnožování mikroorganismů, ovlivnění růstu a rozmnožování se může stanovit pomocí některých parametrů biochemické činnosti mikroorganismů (tvorba ATP, produkce metabolitů atd.).

Metody stanovení antimikrobiální aktivity

Vlastní testovací techniky na stanovení antimikrobiální účinnosti látek můžeme podle principů, na kterých jsou založené, rozdělit do dvou skupin:

- kvalitativní difúzní agarové metody
- kvantitativní diluční (inkorporační) metody

Při difúzních metodách účinná látka difunduje ze zdroje difúze do agarového média inokulovaného modelovým mikroorganismem. Při výzkumu a vývoji nových antimikrobiálně působících látek přírodního původu, zejména při izolaci účinných složek z komplexu sloučenin (extraktu), se využívá bioautografická metoda.

Jako zdroj difúze se používají nejčastěji papírové disky impregnované testovaným antibiotikem, vyráběné komerčně, případně v jednotlivých laboratořích z vhodných roztoků antibiotik.

Vzhledem k tomu, že výsledek je známý za 24 hodin po odebraní materiálu, je tato metoda výhodná v praxi především svojí rychlostí. Umožňuje určit, zda testovaný kmen je, případně není citlivý na určitou koncentraci antibiotika, obyčejně volenou tak, aby citlivost *in vitro* udávala ovlivnitelnost léčbou. Zrychlená metoda s modelovým mikroorganismem *Bacillus stearotermophilus ATCC 12980* se zakládá na skutečnosti, že vhodnými barevnými indikátory je možné vidět změny v živném médiu, které jsou důsledkem metabolické aktivity rostoucích mikroorganismů. Léčebný účinek lze dosáhnout, nebo zvýšit kombinací antibiotik. Difúzní metody se v tomto případě využívají na zjištění vhodné kombinace antibiotik. Na základě tvaru inhibiční zóny je možné zjistit synergické (v místě výskytu obou antibiotik je větší průměr inhibiční zóny v porovnání se samotnými antibiotikami), resp. antagonistické (v místě výskytu obou antibiotik je menší průměr inhibiční zóny v porovnání se samostatnými antibiotikami) vztahy mezi antibiotikami.

Při dilučních metodách se inkorporuje testovaná sloučenina do kultivačního média kapalného nebo agarizovaného. V přítomnosti různých koncentrací účinné látky v médiu se sleduje její vliv na růst, rozmnožování, resp. intenzitu vybraného životního projevu modelového mikroorganismu. Všeobecně je možné konstatovat, že intenzita růstu je úměrná koncentraci antimikrobiálně aktivní látky v živném médiu. Využívají se různé modifikace dilučních metod přes sklíčkové, platňové, zkumavkové až po ekonomicky výhodné mikrodilučné metody, uskutečňované v malých objemech mikrotitračních destiček. Účinnost antimikrobiálně aktivních látek nejčastěji charakterizujeme pomocí hodnot IC_{50}, MIC a MMC.

Standardizace podmínek testování

Nevýhodou takto získaných výsledků je často nemožnost přímého srovnání účinku s výsledkami jiných autorů. Nejčastější příčinou doposud nevyhovující standardizace a opakovatelnosti testování antimikrobiální aktivity sloučenin je množství různých faktorů ovlivňujících výsledky *in vitro*. Tyto faktory můžeme rozdělit do čtyřech hlavních skupin:

- metodologické (volba metody, způsob hodnocení antimikrobiální aktivity)
- podmíněné testovacím systémem (délka inkubace, teplota inkubace, složení média, pH média)
- podmíněné testovanou látkou (rozpustnost, stabilita)
- podmíněné modelovým mikroorganismem (velikost inokula, citlivost mikroorganismů).

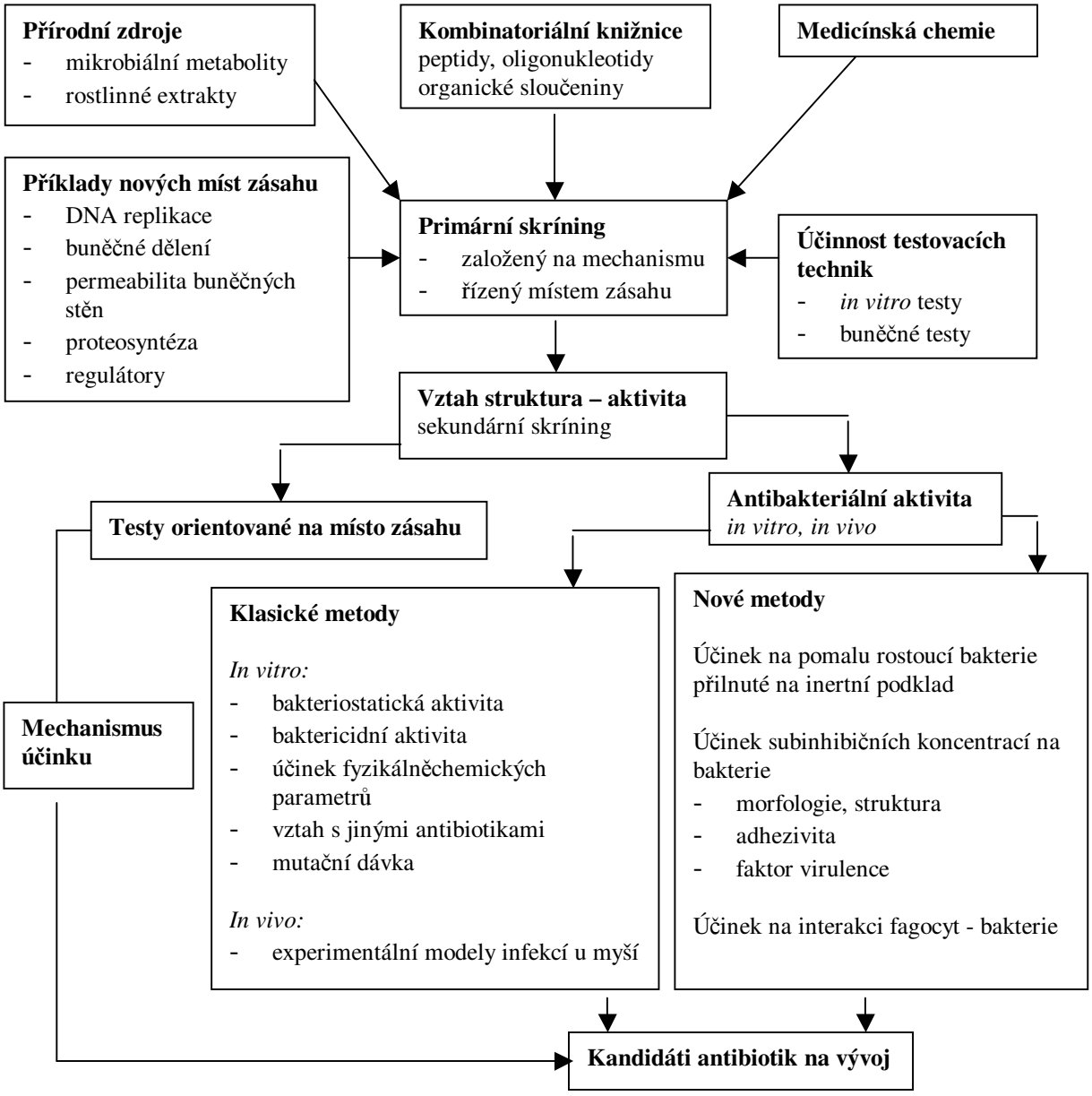
V současnosti jsou za účelem zvýšení reprodukovatelnosti závazné standardní postupy testování mikroorganismů zejména v aplikační sféře.

Nové trendy a strategie pro vývoj nových antimikrobiálních sloučenin

V současnosti existují dva hlavní přístupy pro objevování účinných látek proti patogenům: zdokonalení "klasických" antimikrobiálních látek nebo hledání nových antimikrobiálních látek s novým mechanismem účinku.

Tradiční metodou získávání nových antibiotik byla syntéza analogů existujících léčiv a jejich vývoj vedoucí k zlepšení terapeutické účinnosti použitím *in vitro* a *in vivo* metod

detekujících mikrobistatický a/nebo mikrobicidní účinek. Obr. 1 sumarizuje strategii vývoje nových antibakteriálních sloučenin.



Obr. 1. Strategie vývoje nových antibakteriálních sloučenin

Projektování a vývoj léčiv

Objev nového léčiva zahrnuje testování velkého množství náhodně vybraných sloučenin v sériích biologických pokusů. Po objevení nosné struktury syntetizují chemici její analogy za účelem zvýšení účinnosti a redukování případné toxicity. Tento výzkum je nejen časově,

ale i finančně mimořádně nákladný. Z tohoto důvodu se při výzkumu a vývoji nových léčiv začali intenzivně používat exaktnější metody založené na:

- možnosti matematického opisu vztahu mezi biologickou veličinou, kterou si přejeme optimalizovat a molekulovými vlastnostmi vypočítanými ze struktury látky. Sem patří zejména metody QSAR (Quantitative Structure – Activity relationships)
- poznání struktury místa účinku léčiva na atomové úrovni.

Tyto poznatky využívají zejména metody založené na cyklu plánovaného vývoje nových léčiv. Oblast chemických informačních výpočtových systémů obsahuje velké množství počítačových metod používaných při vývoji léčiv.

Kvantitativní analýza vztahů struktura – aktivita (QSAR)

Koncepce QSAR analýzy spočívá v tom, že je určená závislost struktury na účinku. Na studium kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou se mohou použít víceré typy dat: údaje o aktivitě (vazbové konstanty substrátů nebo receptorů), rychlostní konstanty (např. asociace, disociace), farmakokinetické parametry, hodnoty biologické aktivity in vitro a in vivo.

Je známé, že fyziologická aktivita léčiva je funkcí chemické struktury. Důležitou metodou opisující vztah struktura – aktivita je Hanschova metoda, která koreluje hodnoty biologické aktivity s fyzikálněchemickými parametrami. Z Hanschových rovnic se může též předpovídat hodnota biologické aktivity. Předpovídací schopnost se často přijímá jako kritérium QSAR analýzy. Na objasnění závislosti byli vyvinuté i nelineární matematické modely.

QSAR se stal pomůckou při optimalizování biologické aktivity v rámci určité série sloučenin, zejména v oblasti objevování nových léčiv a agrochemikálií.

Metody molekulového modelování

Molekulové modelování se zaměřuje na pochopení interakcí mezi ligandem a receptorem, i na studium biologické aktivity bez znalosti detailní trojrozměrné informace o receptoru. Významnou úlohu sehrávají NMR spektroskopie a krystalografie, poskytující trojrozměrné struktury izolovaných proteinů (31).

1.3.2 Vliv ovocných koncentrátů a ovoce na bakterie

V USA vědci z Michigenu bylo studováno přežití *Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes* a *Salmonella* v jablečné, pomerančové, ananasové koncentrované šťávě, v koncentrátu z bílého hroznu a v banánové kaši. Sáčky s koncentráty nebo kaší byly naočkovány patogeny v množství větším nebo rovno 10(3) CFU/g a uloženy při teplotě –23 °C. Přežití patogenů bylo sledováno v 6 a 24 hodinových intervalech. Protože patogeny nebyly zjistitelné směrovou tabulí, vzorky byly obohacené univerzálním obohacujícím bujónem po 72 hodin a nakladeny na výběrová media.Výsledky ukázaly, že *Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes* a *Salmonella* byly schopné se vrátit ve všech pěti koncentrátech uskladněných při –23 °C během 12 týdnů (32).

Ve Vashingtonu v USA byla zkoumána inaktivace *Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes* a *Sallmonella* v brusinkových, citronových a citrusových koncentrovaných šťávách. Při produkci tepelně zpracovaných ovocných šťáv se používá dost vysokých teplot, aby dosáhly přinejmenším 5-log zmenšení choroboplodných bakterií, které se mohou vyskytovat v syrových ovocných šťávách. Avšak doprava a uskladnění koncentrátů při nízkých teplotách před konečným balením představuje možné riziko znečištění. Studie byla podniknuta ke zhodnocení možnosti přežití *Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes* a *Salmonella* v brusinkových, citronových a citrusových koncentrátech za teplot (i vyšších) obvykle používaných při dopravě nebo skladování těchto koncentrátů. Tato studie demonstruje, že tyto šťávy mají vnitřní antimikrobiální vlastnosti, které vyloučí uvedené bakteriální patogeny. Bakteriální inaktivace byla provedena za všech podmínek: nejméně 5-log inaktivace *Salmonelly* se projevila při –23 °C, přinejmenším 5-log inaktivace *Escherichia coli O157:H7* se projevila při –11 °C, přinejmenším 5-log inaktivace *Listeria monocyt*ogenes se projevila při 0 °C (33).

Na technologické univerzitě v Berlíně se zabývali aplikací ultrasondy, jež přispívá k tepelnému zpracování pro uchování a udržení kvality rychle se kazících potravin (mléko, ovocné a zeleninové džusy). *Escherichia coli K12 DH 5 alph*a a *Lactobacillus acidophilus* byly použity jako testovací mechanismy. Upravované džusy byly zkoumané pro ztrátu způsobenou žárem nebo ultrasondou způsobující snížení senzorických a nutričních hodnot po úpravě a skladování. Změny v barvě a zničení obsahu kyseliny L-askorbové, byly

zaznamenávány jako index pro měření vlivů zpracovávání. Teplotně a časově závislý proces úmrtnosti byl použit jako základ pro ohodnocení bakteriologického procesu. Tepelné úpravy ultrasondou požadují nižší zpracovatelské teploty než úpravy při tradičním tepelném zpracovávání ve stejných stupních bakteriální inaktivace. Avšak celková energetická spotřeba nebyla snižována ve srovnání s tradičním zahříváním. Údaje vypovídající o pozitivním vlivu na samotný život, se zlepšeními ve stabilitě povrchové barvy a zadržením kyseliny L-askorbové, byly zařazeny mezi parametry hodnotící kvalitu pomerančového džusu (34).

V Argentině byla zkoumána efektivnost 200 a 500 ppm chloru a organických kyselin (0,5%ní kyselina mléčná a 0,5%ní kyselina citronová) v mycích roztocích a UV záření na snižování *Escherichia coli O157:H7* a *Yersinia enterocolitica* na jablkách, která byla kontaminována 2 různými metodami. Významné snížení o 4,67 a 4,58 log bylo pozorováno u jablek naočkovaných *E. coli* a *Y.enterocolitica* a ošetřených 500 ppm chloru s 0,5 %ní kyselinou mléčnou, toto zmenšení se velmi blíží 5-log požadovaným FDA pro desinfekci jablek (35).

Na floridské univerzitě zkoumali přežití *salmonel* (skladovaných při 0, -5, -10, -15 či – 20 °C) naočkovaných v pomerančových a grapefruitových koncentrátech při 42, 50 a 64 stupních Brix po 11 a 50 dnech. Křivky letality byly nelineární a odpovídaly rovnici: $Y = a + bXc$. Konečné log zmenšení v rozsahu 2,3 až 4,8 bylo dosaženo po 50 dnech v pomerančových koncentrátech a 6,0 až 6,9 po 11 dnech v grapefruitových koncentrátech (36).

Ve Španělsku na univerzitě v Lleidě byl zhodnocen účinek vysoce impulzivního elektrického pole (HIPEF) na přežití *Saccharomyces cerevisiae* v pomerančových džusech. Maximální inaktivace 5,1-log (CFU/mililitr) zmenšení bylo dosaženo po vystavení *S. cerevisiae* HIPEF při 1 000 miliontin v 35 kV/cm a 200 Hz v bipolárním režimu. HIPEF způsobilo zničení membrány a ovlivnilo vnitrobuněčnou organizaci *S. cerevisiae* (37).

V USA na univerzitě v Marylandu byly zkoumány bakterie v džusové matrici pomocí FT-NIR spektroskopie a analýzy. Pokus se uskutečnil na *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Bacillus cereus* a *Bacillus thuringiensis*. FT-NIR spolu s multivarietními technikami může být použit k rychlému a přesnému ohodnocení možné bakteriální kontaminace kapalin s minimální manipulací se vzorky (38).

V Japonsku se zaměřili na vliv elektronového paprsku, gamma záření a teplot 85 až 95 °C na spory *Alicyclobacillus acidoterrestris GD3B* druh *(NCIMB 13137)*. Dextrinový prášek spolu s 10(4) CFU/g *A. acidoterrestris* byl předběžně ozářen elektronovým paprskem, citrusový džus obsahující dextrin o koncentraci 10 % (wt/vol) byl celkově sterilizován při 95 °C po 20 min. Kombinace ozáření před zahřátím byla vhodná ke snížení délky tepelného ošetření požadovaného k inaktivaci spor (39).

V USA v Indianě byl studován vliv obnovy a očkovacích metod na počet *Escherichia coli O157:H7* a *Listeria monocytogenes* na jahodách. Jahody byly naočkovány píchnutím nebo ponořením 7 až 8 log CFU/jahodu od každého patogenu, sušeny 2 hodiny, a skladovány 1, 3 a 7 dní při 4 ºC. Naočkované vzorky byly namočené do PBS (pH 7,2) nebo upraveného PBS (pH 8,4). Oba bakteriální druhy mohly přežít na povrchu, ale jejich schopnost obnovy se snížila zvýšením skladovací doby pro obě očkovací metody. Naočkování píchnutím vykazovalo nižší obnovu než naočkování ponořením. Výpočetními metodami lze určit schopnost obnovy a počet *E. coli O157:H7* a *L. monocytogenes* na jahodách poškozených otřesy a vzorcích namočených po dobu 15 minut do 100 ml PBS s 22 º C (40).

2 PRAKTICKÁ ČÁST

2.1 Stanovení cílů

Cílem této práce je odhalit účinek reziduí fungicidů nacházejících se v ovoci na citlivé bakterie střevního traktu. Reziduem fungicidu je každá látka nebo směs látek přítomná v kterémkoliv substrátu (v potravinách) v důsledku použití fungicidu. Tento pojem zahrnuje jednak všechny deriváty původního pesticidu, ale také produkty rozpadu a transformace, metabolity a reakční produkty, které se považují za toxikologicky důležité.

Mikrobiologická transformace reziduí pesticidů v půdě probíhá kometabolismem a komenzalismem. Mezi početnými mikroorganismy, které jsou schopné těmito způsoby napadnout molekuly pesticidů, jsou určité převládající typy, co se týká počtu pesticidů: *Arthrobacter, Aspergillus, Bacillus, Corynebacterium, Flavobacterium, Fusarium, Nocardia, Penicillium, Pseudomonas* a *Trichoderma* (41).

Ve své práci zkoumám účinek plísní rodu *Aspergillus, Mucor a Penicillium* na ovoce postříkané roztokem fungicidu. *Aspergillus* i *Penicillium* patří do kmene *Mycophyta*, podkmene *Eumycophytina* (*Eumyetes*), třídy *Ascomycetes*, podtřídy *Euascomycetes – Plectomycetes*, řádu *Eurotiales* a čeledi *Eurotiaceae* (*Aspergillaceae*). U žádné skupiny hub není otázka antibiotik tak známa a propracována jako u této skupiny plísní. Od objevení penicilinu, metabolického produktu *Penicillium notatum* byly objevovány a zkoušeny stále nové a nové látky. I mezi jednotlivými zástupci jsou vzájemné konkurenční vztahy.

U některých potravin vyvolávají nepříjemnou chuť a zápach a přispívají k jejich zkažení. Jinde jsou právě tyto plísně příčinou dobré chuti a zvláštního aroma. Tzv. ”zelenou hnilobu” hlavně na přezrálých uskladněných citronech a pomerančích způsobuje *Penicillium glaucum*. ”Modrozelenou hnilobu” na citronech a jiném ovoci působí zejména *P. italicum* a *P. digitatum*. Někdy řádí hojně ve skladištích na uskladněném ovoci, hlavně na hruškách, jablkách a na vinných hroznech *P. expansum*; tato hniloba neobycejně rychle pokračuje.

Proti těmto plísním se těžko bojuje; nejvíce pomáhá natírání plesnivých míst slabším roztokem formalinu a fenolu, pokud se jich dá užít vzhledem k substrátu, a nověji se ukázalo, že velmi dobře zastavuje klíčení spor těchto plísní thymol a příbuzné látky

Mechener a Snell (1949) nalezli u *Bacillus subtilis* látku subtilin, která má fungistatické účinky se silnými antibiotickými vlastnostmi proti těmto plísním.

Také někteří zástupci pomocného rodu *Aspergillus* ničí ovoce ve skladištích, hlavně jablka. Na uložené cibuli bývá někdy nalezen *A. niger*.

Plíseň Mucor patří do kmene *Mycophyta*, podkmene *Phycomycophytina* (*Phycomycetes*), třídy *Zygomycetes*, řádu *Mucorales* a čeledi *Mucoraceae*. Mnozí zástupci, zejména rod *Rhizopus*, třebaže je převážně saprofytický, působí za určitých okolností destrukci rostlin nebo jejich částí, zejména plodů. V tom směru je známa činnost *R. nigricans* na hlízách batat v podobě kroužkové hniloby, u nás zejména na různých plodech, třešních a hlavně na zahradních jahodách, kde působí rychlé hnití, zejména při přepravě přezrálých vlhkých plodů; způsobuje roztékání dužniny a je vedle *Botrytis cinerea* hlavním ničitelem zralých jahod (42).

2.2 Metodika práce

Ve své práci jsem zvolila tři metodické přístupy:

1. Zkoumala jsem antimikrobiální účinky různých druhů ovoce na citlivé bakterie. Pokus jsem rozdělila na: a) účinek extraktu z povrchu ovoce na bakterie,

   b) účinek extraktu z dužiny ovoce na bakterie,

   c) účinek vylisované šťávy z ovoce na bakterie.

   Pokusy jsem provedla na těchto druzích ovoce: citron, pomeranč, hrozen, kiwi a banán. Pomocí papírových disků namočených v extraktech a ve vylisované šťávě jsem zkoumala účinky ovoce na citlivé bakterie rodu *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*.

   Účinná látka difunduje ze zdroje difúze do agarového media naočkovaného modelovým mikroorganismem. Zdrojem difúze je papírový disk s testovanou látkou, váleček, příp. jamka v agarovém médiu s roztokem testované látky. Antimikrobiální aktivita látky se projeví vznikem sterilní (inhibiční) zóny okolo jejího centra difúze. Velikost inhibiční zóny je ovlivňovaná především difúzními konstantami látek, jejich

rozpustností v prostředí, hloubkou agarové vrstvy, velikostí inokula… Na základě velikosti inhibiční zóny je možné porovnávat citlivost různých mikroorganismů k jedné testované látce, ne však účinnost látek mezi sebou (31).

2. Zaměřila jsem se na účinek smíšené mykoflóry na různé druhy ovoce, které byly před pokusem postříkány roztokem fungicidu připraveným podle návodu na etiketě. Použila jsem tyto druhy ovoce: mandarinka, citron a kiwi. Toto ovoce jsem postříkala roztokem fungicidu Euparen Multi a následně připraveným roztokem směsi plísní rodů *Mucor, Aspergillus* a *Penicillium*. Celý postup jsem opakovala ještě dvakrát za použití jiných druhů fungicidních přípravků: Karathane LC a Dithane M 45.
3. Studovala jsem samotný účinek fungicidů na citlivé druhy bakterií a jejich účinek po aplikaci na různé druhy ovoce. Použila jsem stejné druhy fungicidních přípravků (Euparen Multi, Karathane LC a Dithane M 45) a pomocí papírového disku namočeného do těchto fungicidních přípravků jsem sledovala vznik inhibiční zóny. Fungicidními přípravky jsem postříkala citron a hrozen, a opět jsem sledovala vznik inhibiční zóny. Pokusy jsem provedla na tyto druhy bakterií: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Escherichia coli*.

2.3 Experimentální část

2.3.1 Antimikrobiální účinky různých druhů ovoce na citlivé bakterie

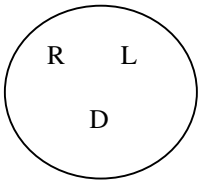
Vzorek: citron, pomeranč, hrozen, kiwi a banán

Pokusné kmeny: *Staphylococcus aureus, Escherichia coli*

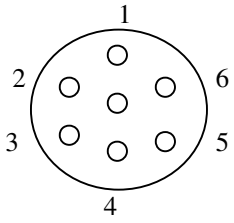
Pomůcky: destilovaná voda, Müller Hilton agar, skleněné baňky se šroubovacím uzávěrem, kádinky, hliníková víčka, autokláv, předvážky, lžička, horkovzdušný sterilizátor, elektrický vařič, petriho misky, petriho misky s nakultivovaným pokusným kmenem, mačkátko na česnek, pipety, očkovací kličky, lihový kahan, zápalky, žiletky, preparační jehla, pinzeta, kovový vykrajovač, sterilované papírové disky, šablona, popisovací fixa.

Postup: Připravila jsem si papírová kolečka, která jsem dala sterilizovat do horkovzdušného sterilizátoru ve skleněné petriho misce, a agar (na předvážkách odvážila Müller Hilton agar do skleněné baňky s trochou destilované vody, doplnila jsem baňku na potřebný objem destilovanou vodou, zašroubovala a dala sterilizovat do autoklávu), vychlazený agar zhruba na 40 °C jsem rozlila do petriho misek – na jeden druh ovoce a pro jeden pokusný kmen bakterií 5 petriho misek. Na ztuhlé agarové půdy jsem rozlila připravený roztok bakterií *Staphylococcus aureus* (do 5 ml sterilního fyziologického roztoku jsem očkovací kličkou nanesla kolonie z petriho misky s předpěstovanými koloniemi bakterií). Takto naočkované petriho misky jsem dala sušit do horkovzdušného sterilizátoru při 37 °C na cca 10 minut. Odvážila jsem si 2 prázdné kádinky a 2 prázdné skleněné baňky bez víček (pro jeden druh ovoce a jeden pokusný kmen bakterií), vždy do jedné kádinky a jedné skleněné baňky jsem sterilní žiletkou odřízla část povrchu ovoce (předtím jsem ho ožehla nad plamenem), a do druhé kádinky a druhé skleněné baňky jsem sterilním vykrajovátkem vyřízla část dužniny (u banánu jsem vyříznutou dužinu rozmačkala mačkátkem), pomáhala jsem si při tom sterilní preparační jehlou. Stejným způsobem jsem si připravila 2 části povrchu a jednu část dužiny na čistou petriho misku. Na jinou petriho misku jsem si vymačkala šťávu z ovoce – u banánu opět mačkátkem na česnek. Kádinky a baňky jsem opět zvážila, rozdíl hmotností (s náplní – prázdná) jsem násobila 5. Kádinky a baňky jsem doplnila destilovanou vodou o váhový poměr 1:5 (o číslo, které mi vyšlo). Baňky jsem zašroubovala víčky a dala sterilizovat do autoklávu na 10 minut, kádinky jsem přikryla hliníkovými víčky a obsah jsem vařila 10 minut. Po zchladnutí jsem sterilní pinzetou namočila papírové disky do extraktů a do čisté šťávy a pokladla jsem tyto disky podle šablony doprostřed jsem kladla čistý disk jako kontrolu, podle jiné šablony jsem pokladla na petriho misku s naočkovaným pokusným kmenem části povrchu (rub a líc) a část dužiny. Celý postup jsem opakovala pro každý druh ovoce. Tuto celou sérii pokusů jsem zopakovala znova pro všechny druhy ovoce na pokusný kmen *Escherichia coli*.

materiál přímo



výluh varem a tlakem



1, 2… povrch
3, 4… dužnina
5, 6… šťáva
uprostřed
kontrola

Obr. 2. Šablony

Výsledky:

Tabulka II. Extrakce tlakem s pokusným kmenem ***Staphylococcus aureus***

Vzorek	**P. č.**	**Extrakce tlakem v mm**						
		1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek	**průměr**
Citron	1	0	0	0	0	0	0	**0**
	2	0	0	0	0	0	0	**0**
	3	17	20	18	16	19	17	**17,8**
	4	20	16	17	19	15	18	**17,5**
	5	20	20	19	21	22	18	**20**
	6	19	21	20	19	20	21	**20**
Pomeranč	1	0	0	0	0	0	0	**0**
	2	0	0	0	0	0	0	**0**
	3	0	0	0	0	0	0	**0**
	4	0	0	0	0	0	0	**0**
	5	11	0	0	12	0	10	**5,5**
	6	12	0	14	10	0	0	**6**
Hrozen	1	7	0	8	0	6	0	**3,5**
	2	6	0	0	7	0	9	**3,7**
	3	0	0	0	0	0	0	**0**
	4	0	0	0	0	0	0	**0**
	5	0	0	0	0	0	0	**0**
	6	0	0	0	0	0	0	**0**
Kiwi	1	0	0	0	0	0	0	**0**
	2	0	0	0	0	0	0	**0**
	3	0	0	0	0	0	0	**0**
	4	0	0	0	0	0	0	**0**
	5	0	0	0	0	0	0	**0**
	6	0	0	0	0	0	0	**0**
Banán	1	0	0	0	0	0	0	**0**
	2	0	0	0	0	0	0	**0**
	3	0	0	0	0	0	0	**0**
	4	0	0	0	0	0	0	**0**
	5	0	0	0	0	0	0	**0**
	6	0	0	0	0	0	0	**0**

Tabulka III. Extrakce varem s pokusným kmenem ***Staphylococcus aureus***

Vzorek	**P. č.**	**Extrakce varem v mm**						
		1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek	**průměr**
Citron	1	0	0	0	0	0	0	**0**
	2	0	0	0	0	0	0	**0**
	3	0	0	0	0	0	0	**0**
	4	0	0	0	0	0	0	**0**
	5	19	23	20	22	23	19	**21**
	6	16	20	19	17	20	16	**18**
Pomeranč	1	0	0	0	0	0	0	**0**
	2	0	0	0	0	0	0	**0**
	3	0	0	0	0	0	0	**0**
	4	0	0	0	0	0	0	**0**
	5	11	10	10	11	12	9	**10,5**
	6	10	12	11	13	9	11	**11**
Hrozen	1	6	0	8	0	7	0	**3,5**
	2	6	0	8	7	0	6	**4,5**
	3	0	0	0	0	0	0	**0**
	4	0	0	0	0	0	0	**0**
	5	6	0	7	6	0	0	**3,2**
	6	8	0	7	0	9	0	**4**
Kiwi	1	0	0	0	0	0	0	**0**
	2	0	0	0	0	0	0	**0**
	3	0	0	0	0	0	0	**0**
	4	0	0	0	0	0	0	**0**
	5	0	0	0	0	0	0	**0**
	6	0	0	0	0	0	0	**0**
Banán	1	0	0	0	0	0	0	**0**
	2	0	0	0	0	0	0	**0**
	3	0	0	0	0	0	0	**0**
	4	0	0	0	0	0	0	**0**
	5	0	0	0	0	0	0	**0**
	6	0	0	0	0	0	0	**0**

Tabulka IV. Extrakce tlakem s pokusným kmenem ***Escherichia coli***

Vzorek	**P. č.**	**Extrakce tlakem v mm**						
		1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek	**průměr**
Citron	1	0	0	0	0	0	0	**0**
	2	0	0	0	0	0	0	**0**
	3	10	8	7	11	9	12	**9,5**
	4	6	10	7	9	10	6	**8**
	5	18	17	16	19	17	18	**17,5**
	6	16	17	15	17	16	19	**16,7**
Pomeranč	1	0	0	0	0	0	0	**0**
	2	0	0	0	0	0	0	**0**
	3	9	0	8	7	0	10	**5,7**
	4	10	0	8	0	6	9	**5,5**
	5	10	8	8	10	7	11	**9**
	6	12	8	9	11	12	8	**10**
Hrozen	1	7	0	7	9	0	0	**3,8**
	2	7	8	8	7	6	9	**7,5**
	3	0	9	7	8	0	6	**5**
	4	10	10	9	11	12	8	**10**
	5	15	17	13	16	19	14	**15,7**
	6	15	18	17	16	15	18	**16,5**
Kiwi	1	0	0	0	0	0	0	**0**
	2	0	0	0	0	0	0	**0**
	3	7	8	8	7	9	6	**7,5**
	4	10	0	8	0	7	9	**5,7**
	5	8	8	7	9	7	9	**8**
	6	8	11	9	10	11	8	**9,5**
Banán	1	0	8	7	9	0	8	**5,3**
	2	8	8	9	7	7	9	**8**
	3	8	12	9	10	10	11	**10**
	4	10	10	12	8	10	10	**10**
	5	11	18	13	15	14	14	**14,2**
	6	13	16	15	14	15	14	**12,8**

Tabulka V. Extrakce varem s pokusným kmenem ***Escherichia coli***

Vzorek	**P. č.**	**Extrakce varem v mm**						
		1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek	**průměr**
Citron	1	0	0	0	0	0	0	**0**
	2	0	0	0	0	0	0	**0**
	3	12	12	10	14	11	13	**12**
	4	7	10	9	8	10	7	**8,5**
	5	18	18	16	20	19	17	**18**
	6	20	18	17	21	20	18	**19**
Pomeranč	1	0	0	0	0	0	0	**0**
	2	0	0	0	0	0	0	**0**
	3	0	0	0	0	0	0	**0**
	4	0	0	0	0	0	0	**0**
	5	8	9	10	7	9	8	**8,5**
	6	10	10	12	8	11	9	**10**
Hrozen	1	7	8	8	7	7	8	**7,5**
	2	7	8	7	7	8	8	**7,5**
	3	8	11	10	9	11	8	**9,5**
	4	12	10	13	9	10	12	**11**
	5	20	15	16	17	18	19	**17,5**
	6	18	16	15	19	16	18	**17**
Kiwi	1	0	0	0	0	0	0	**0**
	2	0	0	0	0	0	0	**0**
	3	0	12	11	10	0	0	**5,5**
	4	0	9	0	10	0	8	**4,5**
	5	8	8	7	9	8	8	**8**
	6	8	8	8	9	8	7	**8**
Banán	1	8	0	7	0	9	8	**5,3**
	2	10	0	9	0	11	8	**6,3**
	3	11	0	10	9	0	0	**3,3**
	4	11	11	10	9	9	10	**10**
	5	11	15	13	12	14	13	**13**
	6	8	15	10	13	12	11	**11,5**

Tabulka VI. Zkouška povrchu a dužiny s pokusným kmenem ***Staphylococcus aureus***

Vzorek	Rub v mm				Líc v mm				Dužina v mm			
	1.vz.	2.vz.	3.vz.	**ø**	1.vz.	2.vz.	3.vz.	**ø**	1.vz.	2.vz.	3.vz.	**ø**
Citron	0	0	0	**0**	0	0	0	**0**	30	28	33	**30,3**
Pomeranč	0	0	0	**0**	0	0	0	**0**	18	19	16	**17,7**
Hrozen	0	0	0	**0**	0	0	0	**0**	15	16	18	**16,3**
Kiwi	0	0	0	**0**	0	0	0	**0**	0	0	0	**0**
Banán	0	0	0	**0**	0	0	0	**0**	0	0	0	**0**

Tabulka VII. Zkouška povrchu a dužiny s pokusným kmenem ***Escherichia coli***

Vzorek	**Rub v mm**				**Líc v mm**				**Dužina v mm**			
	1.vz.	2.vz.	3.vz.	**ø**	1.vz.	2.vz.	3.vz.	**ø**	1.vz.	2.vz.	3.vz.	**ø**
Citron	0	0	0	**0**	0	0	0	**0**	35	34	28	**32,3**
Pomeranč	0	0	0	**0**	0	0	0	**0**	20	21	15	**18,7**
Hrozen	25	24	18	**22,3**	0	0	0	**0**	15	17	20	**17,3**
Kiwi	0	0	0	**0**	0	0	0	**0**	22	20	16	**19,3**
Banán	25	26	20	**23,7**	0	0	0	**0**	34	34	27	**31,7**

Vyhodnocení výsledků jsem provedla pomocí Wilcoxonova testu pro srovnání hodnot 2 nezávislých výběrů na PC. Hladinu významnosti jsem zvolila 5 %.

Tabulka VIII. Srovnání hodnot u extrakce tlakem na *Staphylococcus aureus* pomocí Wilcoxonova testu

Srovnávané vzorky	**Předpoklady**	**Hodnoty**	**Vyhodnocení**
Citron dužina + citron šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 96$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty dužiny statisticky významně menší než hodnoty šťávy.
Citron šťáva + pomeranč šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 222$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty citron. šťávy statisticky významně větší než hodnoty pomeranč. šťávy.

Pozn.: μ_1 se týká prvního srovnávaného vzorku, μ_2 souvisí s druhým srovnávaným vzorkem

Tabulka IX. Srovnání hodnot u extrakce tlakem a varem na *Staphylococcus aureus* pomocí Wilcoxonova testu

Srovnávané vzorky	**Předpoklady**	**Hodnoty**	**Vyhodnocení**
Citron šťáva + citron šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 161$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn stat. významný rozdíl mezi vzorky.
Pomeranč šťáva + pomeranč šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 124$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn stat. významný rozdíl mezi vzorky.
Hrozen povrch + hrozen povrch	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 147$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.

Pozn.: μ_1 se týká prvního srovnávaného vzorku (extrakce tlakem), μ_2 souvisí s druhým srovnávaným vzorkem (extrakce varem)

Tabulka X. Srovnání hodnot u extrakce varem na *Staphylococcus aureus* pomocí Wilcoxonova testu

Srovnávané vzorky	**Předpoklady**	**Hodnoty**	**Vyhodnocení**
Citron šťáva + pomeranč šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 222$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty citrónové šťávy statisticky významně větší než hodnoty pomeranč. šťávy.
Hrozen povrch + hrozen šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 153$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn stat. významný rozdíl mezi vzorky.
Citron šťáva + hrozen šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 222$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty citrónové šťávy statisticky významně větší než hodnoty hroznové šťávy.
Pomeranč šťáva + hrozen šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 221$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty pomeranč. šťávy statisticky významně větší než hodnoty hroznové šťávy.

Pozn.: μ_1 se týká prvního srovnávaného vzorku, μ_2 souvisí s druhým srovnávaným vzorkem

Tabulka XI. Srovnání hodnot u extrakce tlakem na *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* pomocí Wilcoxonova testu

Srovnávané vzorky	**Předpoklady**	**Hodnoty**	**Vyhodnocení**
Citron šťáva + citron šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 194$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty citron. šťávy zkoušené na *Staph. aureus* statisticky významně větší než hodnoty citron. šťávy zkouš. na *Escherichia coli*.
Pomeranč šťáva + pomeranč šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 180$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty pomeranč. šťávy zkoušené na *Staph. aureus* stat. významně větší než hodnoty pom. šťávy zkouš. na *Escherichia coli*.
Hrozen šťáva + hrozen šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 78$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty hrozn. šťávy zkoušené na *Staph. aureus* statisticky významně menší než hodnoty hrozn. šťávy zkouš. na *Escherichia coli*.
Hrozen povrch + hrozen povrch	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 126$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.

Pozn.: μ_1 se týká prvního srovnávaného vzorku (na *Staph. aureus*), μ_2 souvisí s druhým srovnávaným vzorkem (na *Escherichia coli*)

Tabulka XII A. Srovnání hodnot u extrakce tlakem na *Escherichia coli* pomocí Wilcoxonova testu

Srovnávané vzorky	**Předpoklady**	**Hodnoty**	**Vyhodnocení**
Citron dužina + citron šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 78$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty citron. dužiny statisticky významně menší než hodnoty citron. šťávy.
Pomeranč dužina + pomeranč šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 109,5$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty pomeranč. dužiny statisticky významně menší než hodnoty pomerančové šťávy.
Hrozen povrch + hrozen dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 121,5$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Hrozen povrch + hrozen šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 78$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty hrozn. povrchu statisticky významně menší než hodnoty hroznové šťávy.
Hrozen dužina + hrozen šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 78$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty hrozn. dužiny statisticky významně menší než hodnoty hroznové šťávy.
Kiwi dužina + kiwi šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 117,5$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty kiwové dužiny statisticky významně menší než hodnoty kiwové šťávy.

Pozn.: μ_1 se týká prvního srovnávaného vzorku, μ_2 souvisí s druhým srovnávaným vzorkem

Tabulka XII B. Srovnání hodnot u extrakce tlakem na *Escherichia coli* pomocí Wilcoxonova testu

Srovnávané vzorky	**Předpoklady**	**Hodnoty**	**Vyhodnocení**
Banán povrch + banán dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 89,5$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty banán. povrchu statisticky významně menší než hodnoty banán. dužiny.
Banán povrch + banán šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 78$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty banán. povrchu statisticky významně menší než hodnoty banánové šťávy.
Banán dužina + banán šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 80,5$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty banán. dužiny statisticky významně menší než hodnoty banánové šťávy.
Citron dužina + pomeranč dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 180$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty citron. dužiny statisticky významně větší než hodnoty pomeranč. dužiny.
Citron dužina + hrozen dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 158$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Citron dužina + kiwi dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 178$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Citron dužina + banán dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 122,5$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Pomeranč dužina + hrozen dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 130$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Pomeranč dužina + kiwi dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 147$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Pomeranč dužina + banán dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 97$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty pomeranč. dužiny statisticky významně menší než hodnoty banánové šťávy.
Hrozen dužina + kiwi dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 169$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Hrozen dužina + banán dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 117,5$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty hroznové dužiny statisticky významně menší než hodnoty banánové dužiny.
Kiwi dužina + banán dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 92$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty kiwové dužiny statisticky významně menší než hodnoty banánové dužiny.
Citron šťáva + pomeranč šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 222$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty citron. šťávy statisticky významně větší než hodnoty pomerančové šťávy.

Pozn.: μ_1 se týká prvního srovnávaného vzorku, μ_2 souvisí s druhým srovnávaným vzorkem

Tabulka XII C. Srovnání hodnot u extrakce tlakem na *Escherichia coli* pomocí Wilcoxonova testu

Srovnávané vzorky	**Předpoklady**	**Hodnoty**	**Vyhodnocení**
Citron šťáva + hrozen šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 174,5$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Citron šťáva + kiwi šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 222$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty citron. šťávy statisticky významně větší než hodnoty kiwové šťávy.
Citron šťáva + banán šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 209$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty citron. šťávy statisticky významně větší než hodnoty banánové šťávy.
Pomeranč šťáva + hrozen šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 78$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty pomeranč. šťávy statisticky významně menší než hodnoty hroznové šťávy.
Pomeranč šťáva + kiwi šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 167,5$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Pomeranč šťáva + banán šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 81$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty pomeranč. šťávy statisticky významně menší než hodnoty banánové šťávy.
Hrozen šťáva + kiwi šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 222$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty hroznové šťávy statisticky významně větší než hodnoty kiwové šťávy.
Hrozen šťáva + banán šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 188,5$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty hroznové šťávy statisticky významně větší než hodnoty banánové šťávy.
Kiwi šťáva + banán šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 79$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty kiwové šťávy statisticky významně menší než hodnoty banánové šťávy.
Hrozen povrch + banán povrch	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 132$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.

Pozn.: μ_1 se týká prvního srovnávaného vzorku, μ_2 souvisí s druhým srovnávaným vzorkem

Tabulka XIII. Srovnání hodnot u extrakce varem na *Staphylococcus aureus a Escherichia coli* pomocí Wilcoxonova testu

Srovnávané vzorky	**Předpoklady**	**Hodnoty**	**Vyhodnocení**
Citron šťáva + citron šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 168$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Pomeranč šťáva + pomeranč šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 191,5$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty pomeranč. šťávy zkoušené na *Staph. aureus* stat. významně větší než hodnoty pom. šťávy zkouš. na *Escherichia coli*.
Hrozen šťáva + hrozen šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 78$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty hrozn. šťávy zkoušené na *Staph. aureus* statisticky významně menší než hodnoty hrozn. šťávy zkouš. na *Escherichia coli*.
Hrozen povrch + hrozen povrch	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 102$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty hrozn. povrchu zkoušené na *Staph. aureus* stat. významně menší než hodnoty hrozn. povrchu zkouš. na *Escherichia coli*.

Pozn.: μ_1 se týká prvního srovnávaného vzorku (na *Staph. aureus*), μ_2 souvisí s druhým srovnávaným vzorkem (na *Escherichia coli*)

Tabulka XIV. Srovnání hodnot u extrakce tlakem a varem na *Escherichia coli* pomocí Wilcoxonova testu

Srovnávané vzorky	**Předpoklady**	**Hodnoty**	**Vyhodnocení**
Citron dužina + citron dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 122,5$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Citron šťáva + citron šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 112,5$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty citron. šťávy extrahované tlakem statisticky významně menší než hodnoty citron. šťávy extrahované varem.
Pomeranč šťáva + pomeranč šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 155$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Hrozen povrch + hrozen povrch	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 132$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Hrozen dužina + hrozen dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 115$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty hrozn. dužiny extrahované tlakem statisticky významně menší než hodnoty hrozn. dužiny extrahované varem.
Hrozen šťáva + hrozen šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 124$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Kiwi dužina + kiwi dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 151,5$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Kiwi šťáva + kiwi šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 173$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Banán povrch + banán povrch	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 148,5$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Banán dužina + banán dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 168$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Banán šťáva + banán šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 191$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty banán. šťávy extrahované tlakem statisticky významně větší než hodnoty banán. šťávy extrahované varem.

Pozn.: μ_1 se týká prvního srovnávaného vzorku (extrakce tlakem), μ_2 souvisí s druhým srovnávaným vzorkem (extrakce varem)

Tabulka XV A. Srovnání hodnot u extrakce varem na *Escherichia coli* pomocí Wilcoxonova testu

Srovnávané vzorky	**Předpoklady**	**Hodnoty**	**Vyhodnocení**
Citron dužina + citron šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 78$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty citron. dužiny statisticky významně menší než hodnoty citron. šťávy.
Citron šťáva + pomeranč šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 222$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty citron. šťávy statisticky významně větší než hodnoty pomerančové šťávy.
Hrozen povrch + hrozen dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 84$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty hrozn. povrchu statisticky významně menší než hodnoty hroznové dužiny.
Hrozen povrch + hrozen šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 78$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty hrozn. povrchu statisticky významně menší než hodnoty hroznové šťávy.
Hrozen dužina + hrozen šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 78$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty hrozn. dužiny statisticky významně menší než hodnoty hroznové šťávy.
Kiwi dužina + kiwi šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 143$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Banán povrch + banán dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 123$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Banán povrch + banán šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 86$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty banán. povrchu statisticky významně menší než hodnoty banánové šťávy.
Banán dužina + banán šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 94,5$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty banán. dužiny statisticky významně menší než hodnoty banánové šťávy.
Citron dužina + hrozen dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 150$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Citron dužina + kiwi dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 188,5$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty citron. dužiny statisticky významně větší než hodnoty kiwové dužiny.
Citron dužina + banán dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 172,5$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Hrozen dužina + kiwi dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 189$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty hrozn. dužiny statisticky významně větší než hodnoty kišové dužiny.
Hrozen dužina + banán dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 172,5$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.

Pozn.: μ_1 se týká prvního srovnávaného vzorku, μ_2 souvisí s druhým srovnávaným vzorkem

Tabulka XV B. Srovnání hodnot u extrakce varem na *Escherichia coli* pomocí Wilcoxonova testu

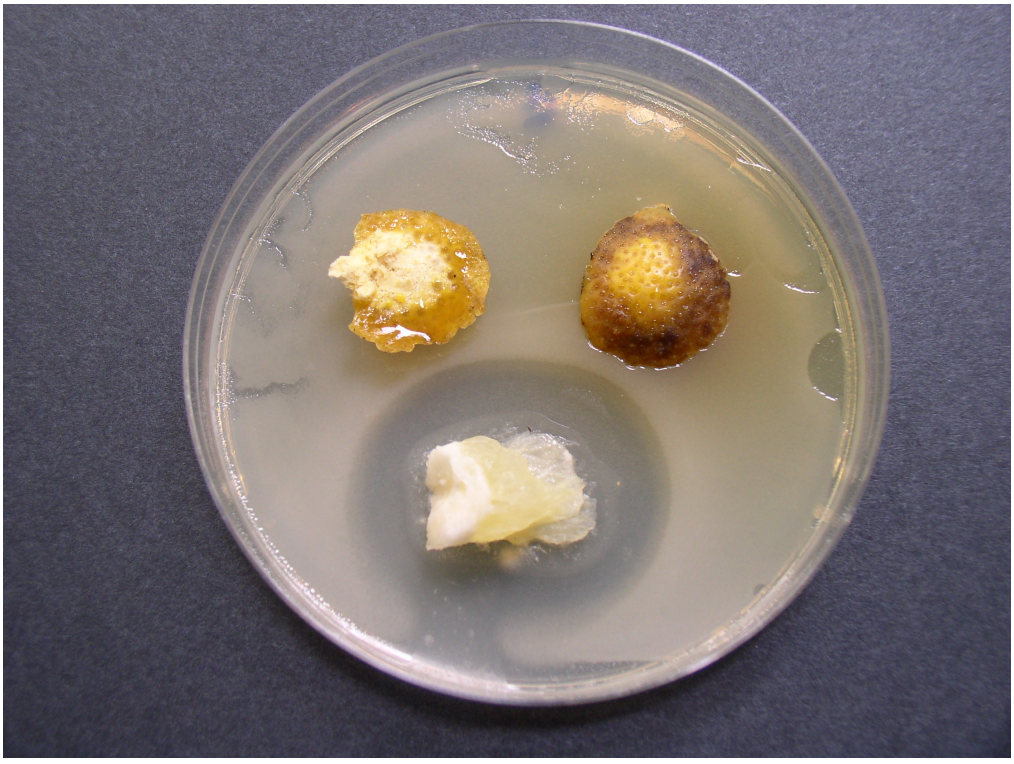
Srovnávané vzorky	**Předpoklady**	**Hodnoty**	**Vyhodnocení**
Kiwi dužina + banán dužina	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 132$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Citron šťáva + hrozen šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 172,5$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.
Citron šťáva + kiwi šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 222$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty citron. šťávy statisticky významně větší než hodnoty kiwové šťávy.
Citron šťáva + banán šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 222$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty citron. šťávy statisticky významně větší než hodnoty banánové šťávy.
Pomeranč šťáva + hrozen šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 78$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty pomeranč. šťávy statisticky významně menší než hodnoty hroznové šťávy.
Pomeranč šťáva + kiwi šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 190$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty pomeranč. šťávy statisticky významně větší než hodnoty kiwové šťávy.
Pomeranč šťáva + banán šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 95$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty pomeranč. šťávy statisticky významně menší než hodnoty banánové šťávy.
Kiwi šťáva + hrozen šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 78$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty kiwové šťávy statisticky významně menší než hodnoty hroznové šťávy.
Hrozen šťáva + banán šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 > \mu_2$	$S_w = 220$ $S_{0,95} = 180$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty hroznové šťávy statisticky významně větší než hodnoty banánové šťávy.
Kiwi šťáva + banán šťáva	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 84$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí jsou hodnoty kiwové šťávy statisticky významně menší než hodnoty banánové šťávy.
Hrozen povrch + banán povrch	H: $\mu_1 = \mu_2$ A: $\mu_1 < \mu_2$	$S_w = 144$ $S_{0,05} = 120$	S 95% spolehlivostí nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky.

Pozn.: μ_1 se týká prvního srovnávaného vzorku, μ_2 souvisí s druhým srovnávaným vzorkem

Na zvolené 5%ní hladině významnosti se prokázalo, že největší antimikrobiální účinky má čerstvá šťáva z citronu na oba testované druhy bakterií. U vymačkané šťávy z ovoce byly tyto účinky jednoznačně větší u všech druhů ovoce na oba druhy bakterií oproti extraktům z povrchu a dužiny. Extrakty z povrchu vykazovaly nejnižší antimikrobiální účinnost. U kiwi a banánu se nepodařily prokázat antimikrobiální účinky na bakterie *Staphylococcus aureus*. Významné účinky se projevily u banánu a hroznového vína na bakterie *Escherichia coli*.



Obr. 3. Antimikrobiální účinek citronu (rub, líc, dužina) na *Staphylococcus aureus*



Obr. 4 Antimikrobiální účinek citronu (rub, líc, dužina) na *Escherichia coli*

2.3.2 Pokus o infekci plodů smíšenou mykoflórou

Vzorek: citron, mandarinka, kiwi

Plísně: *Mucor mihei, Aspergillus nigera, Penicillium frizogenum, Penicillium ?*

Pomůcky: předvážky, Chloramfenicol agar, Minerální látky bez BTM, destilovaná voda, lžička, skleněné baňky se šroubovacím uzávěrem, autokláv, exikátor, zkumavky, držák na zkumavky, petriho misky, Erlenmayerovy baňky, víčka z alobalu, lihový kahan, očkovací kličky, sirky, popisovací fixa, nůž.

Provedení:

- účinek suspenze (směs plísní ve fyziologickém roztoku) na půdách – Chloramfenicol agar, minerální látky bez BTM
- účinek ovoce postříkaného suspenzí a fungicidním přípravkem na půdách.

Postup: Připravila jsem si Chloramfenicol agar a Minerální látky bez BTM a dala sterilizovat spolu s fyziologickým roztokem do autoklávu. Po vychlazení na 40 °C jsem agarové půdy rozlila do petriho misek. Do Erlenmayerových baněk jsem si podle návodu připravila potřebné množství jednotlivých fungicidních přípravků (Euparen Multi 35 g/10 l, Karathane LC 2,5 – 5 ml/10 l, a Dithane M45 30 g/10 l) a přikryla jsem je víčky z alobalu. Do zkumavky jsem nalila 5 ml fyziologického roztoku a očkovací kličkou jsem do ní nanesla jednotlivé plísně. Ovoce jsem rozkrájela na poloviny, které jsem nejprve postříkala směsí plísní ve fyziologickém roztoku, a poté jedním z fungicidních přípravků. Směsí plísní jsem postříkala také petriho misky s agarem. Postup jsem opakovala pro další dva fungicidní přípravky. Jednu polovinu ovoce jsem položila na petriho misku s Chloramfenicol agarem a druhou na petriho misku s Minerální látky bez BTM. Do exikátoru jsem kladla vždy 2 petriho misky s postříkaným ovocem, 2 petriho misky nastříkané pouze suspenzí plísní a 2 petriho misky pouze s agarem jako kontrolní (první ze 2 petriho misek je s Chloramfenicol agarem a druhá z těchto 2 petriho misek je s Minerálními látkami bez BTM).

Výsledky:

Tabulka XVI. Účinek směsi plísní na agar

Vzorek	**Účinek suspenze**					
	1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek
Chloramfenicol agar	+	+	+	+	+	+
Minerální látky bez BTM	+	+	+	+	+	+

Tabulka XVII. Účinek směsi plísní na ovoce postříkané fungicidním přípravkem – kultivace na Chloramfenicol agar

Vzorek	**Účinek ovoce se suspenzí a fungicidním přípravkem Euparen Multi**					
	1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek
Citron	+	+	+	+	+	+
Mandarinka	+	+	+	+	+	+
Kiwi	+	+	+	+	+	+

Tabulka XVIII. Účinek směsi plísní na ovoce postříkané fungicidním přípravkem – kultivace na Minerální látky bez BTM

Vzorek	**Účinek ovoce se suspenzí a fungicidním přípravkem Euparen Multi**					
	1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek
Citron	+	+	+	+	+	+
Mandarinka	+	+	+	+	+	+
Kiwi	+	+	+	+	+	+

Tabulka XIX. Účinek směsi plísní na ovoce postříkané fungicidním přípravkem – kultivace na Chloramfenicol agar

Vzorek	**Účinek ovoce se suspenzí a fungicidním přípravkem Karathane LC**					
	1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek
Citron	+	+	+	+	+	+
Mandarinka	+	+	+	+	+	+
Kiwi	+	+	+	+	+	+

Tabulka XX. Účinek směsi plísní na ovoce postříkané fungicidním přípravkem – kultivace na Minerální látky bez BTM

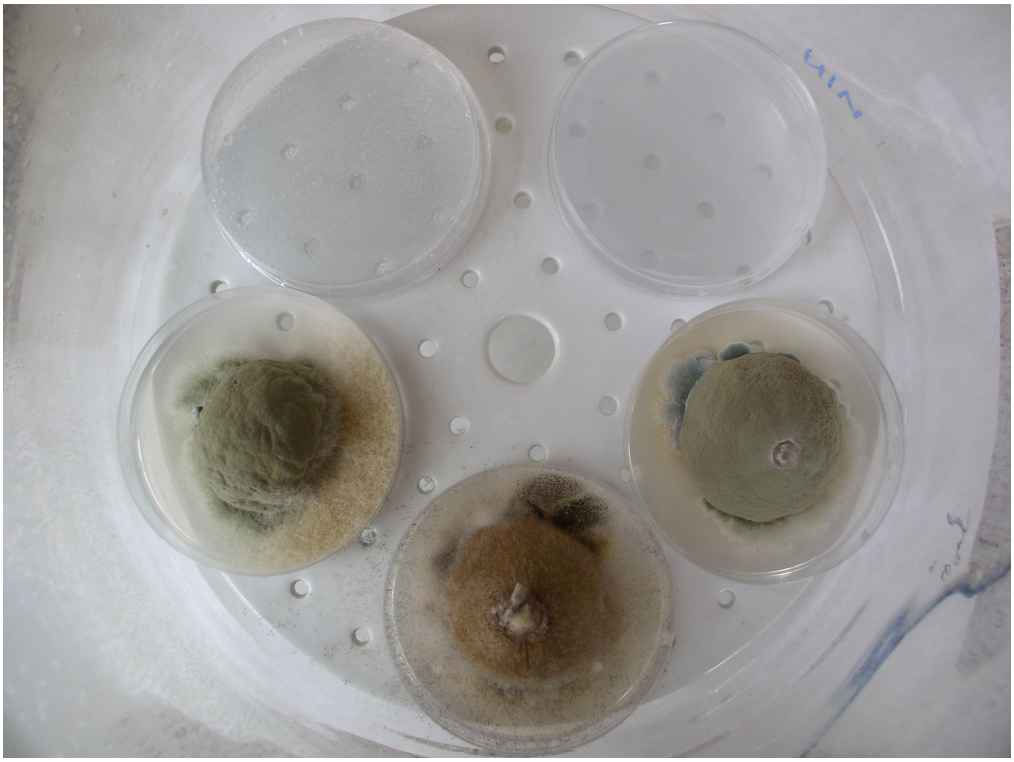
Vzorek	**Účinek ovoce se suspenzí a fungicidním přípravkem Karathane LC**					
	1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek
Citron	+	+	+	+	+	+
Mandarinka	+	+	+	+	+	+
Kiwi	+	+	+	+	+	+

Tabulka XXI. Účinek směsi plísní na ovoce postříkané fungicidním přípravkem – kultivace na Chloramfenicol agar

Vzorek	**Účinek ovoce se suspenzí a fungicidním přípravkem Dithane M45**					
	1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek
Citron	+	+	+	+	+	+
Mandarinka	+	+	+	+	+	+
Kiwi	+	+	+	+	+	+

Tabulka XXII. Účinek směsi plísní na ovoce postříkané fungicidním přípravkem – kultivace na Minerální látky bez BTM

Vzorek	**Účinek ovoce se suspenzí a fungicidním přípravkem Dithane M45**					
	1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek
Citron	+	+	+	+	+	+
Mandarinka	+	+	+	+	+	+
Kiwi	+	+	+	+	+	+



Obr. 5. Exikátor – kultivace na Minerální látky bez BTM



Obr. 6. Exikátor – kultivace na Chloramfenikol agar

2.3.3 Samotný účinek fungicidů a účinek po jejich aplikaci

Vzorek: citron, hrozen

Pokusné kmeny: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
Escherichia coli

Fungicidní přípravky: Euparen Multi
Karathane LC
Dithane M 45

Pomůcky: předvážky, destilovaná voda, Lactobacillus agar, acidofilní mléko, bílý jogurt, Müller Hilton agar, lžička, skleněné baňky se šroubovacím uzávěrem, autokláv, exikátor, horkovzdušný sterilizátor, zkumavky, držák na zkumavky, víčka na zkumavky, petriho misky, Erlenmayerovy baňky, víčka z alobalu, lihový kahan, očkovací kličky, sirky, popisovací fixa, žiletky, pinzeta, sterilní papírové disky, petriho miska s nakultivovaným Escherichia coli.

Provedení:

- přímý účinek fungicidního přípravku – papírové kolečko nasáklé fungicidním přípravkem
- účinek ovoce namočeného ve fungicidním přípravku
- přímý účinek ovoce bez fungicidního přípravku

Postup: Provedla jsem kultivaci *Lactobacilla* – uvařila jsem Lactobacillus agar, vychlazený jsem ho rozlila do petriho misek. Na ztuhlé půdy jsem vatovou tyčinkou nanesla acidofilní mléko a jogurt. Kultivaci jsem provedla aerobně a anaerobně (v exikátorech) při 38 °C v termostatu. Dvakrát jsem přeočkovávala a opět oběma způsoby kultivovala. Podruhé jsem přeočkovávala také na šikmé agary.

Uvařila jsem si Lactobacillus agar, který jsem po vychlazení cca na 40 °C rozlila na 15 petriho misek. Po ztuhnutí jsem na ně kličkou naočkovala Lactobaccilus agar ze šikmých agarů. Připravila jsem si do Erlenmayerových baněk fungicidní přípravky dle návodu na etiketě, přikryla jsem je víčky z alobalu. Vyrobila jsem papírové disky, které jsem vložila do skleněné petriho misky a sterilizovala jsem je v horkovzdušném sterilizátoru.

Do všech 3 Erlenmayerových baněk jsem vložila papírový disk a položila jsem je doprostřed 3 petriho misek s půdou a naočkovaným *Lactobacillem*. Na 3 petriho misky s půdou a *Lactobacillem* jsem vložila kousek hroznového vína. Na zbývajících 9 petriho misek jsem kladla kousky ovoce namočené ve fungicidních přípravcích; z toho 3 kousky namočené v Euparen Multi, 3 kousky namočené v Karathane LC a 3 kousky namočené v Dithane M45. Dala jsem vše kultivovat do termostatu na 37 °C.

Vše jsem zopakovala, ale jako vzorek jsem použila citron. Potom jsem celý postup znova zopakovala na pokusný kmen *Escherichia coli* a pro oba vzorky (hroznové víno a citron).

Výsledky:

Tabulka XXIII. Účinek fungicidního přípravku na pokusný kmen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Vzorek	**Účinek fungicidního přípravku – Euparen Multi v mm**						
	1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek	**průměr**
Papírový disk	14	15	13	16	15	14	**14,5**
Hrozen	0	0	0	0	0	0	**0**
Citron	0	0	0	0	0	0	**0**

Tabulka XXIV. Účinek fungicidního přípravku na pokusný kmen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Vzorek	**Účinek fungicidního přípravku – Karathane LC v mm**						
	1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek	**průměr**
Papírový disk	13	0	13	0	12	14	**8,7**
Hrozen	0	0	0	0	0	0	**0**
Citron	0	0	0	0	0	0	**0**

Tabulka XXV. Účinek fungicidního přípravku na pokusný kmen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Vzorek	**Účinek fungicidního přípravku – Dithane M 45 v mm**						
	1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek	**průměr**
Papírový disk	38	0	24	0	35	32	**21,5**
Hrozen	0	0	0	0	0	0	**0**
Citron	0	0	0	0	0	0	**0**

Tabulka XXVI. Účinek samotného ovoce na pokusný kmen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Vzorek	**Účinek samotného ovoce v mm**						
	1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek	**průměr**
Hrozen	0	0	0	0	0	0	**0**
Citron	0	0	0	0	0	0	**0**

Tabulka XXVII. Účinek fungicidního přípravku na pokusný kmen *Escherichia coli*

Vzorek	**Účinek fungicidního přípravku – Euparen Multi v mm**						
	1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek	**průměr**
Papírový disk	22	20	23	21	24	22	**22**
Hrozen	24	26	31	27	29	25	**27**
Citron	14	26	18	16	20	24	**19,7**

Tabulka XXVIII. Účinek fungicidního přípravku na pokusný kmen *Escherichia coli*

Vzorek	**Účinek fungicidního přípravku – Karathane LC v mm**						
	1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek	**průměr**
Papírový disk	0	18	0	20	19	0	**9,5**
Hrozen	0	0	26	18	0	20	**10,7**
Citron	0	0	0	19	0	0	**3,2**

Tabulka XXIX. Účinek fungicidního přípravku na pokusný kmen *Escherichia coli*

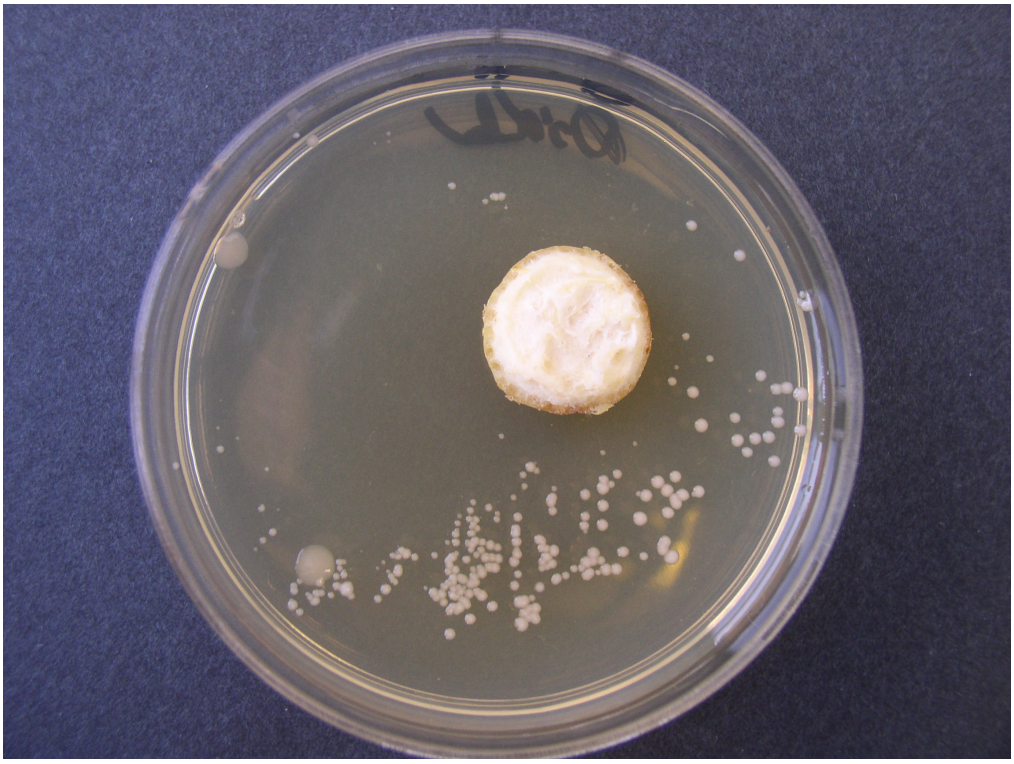
Vzorek	**Účinek fungicidního přípravku – Dithane M 45 v mm**						
	1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek	**průměr**
Papírový disk	32	28	26	34	37	35	**32**
Hrozen	31	25	29	27	30	28	**28,3**
Citron	24	20	26	22	25	24	**23,5**

Tabulka XXX. Účinek samotného ovoce na pokusný kmen *Escherichia coli*

Vzorek	**Účinek samotného ovoce v mm**						
	1.vzorek	2.vzorek	3.vzorek	4.vzorek	5.vzorek	6.vzorek	**průměr**
Hrozen	0	0	0	0	0	0	**0**
Citron	0	0	0	0	0	0	**0**



Obr. 7. Účinek hroznu, který byl postříkán Dithane M 45 na *Lactobacilla*



Obr. 8. Účinek citronu, který byl postříkán Dithane M 45 na *Escherichia coli*

2.4 Diskuse výsledků

Podle Šilhánkové (2002) mají některé látky přítomné v prostředí na mikroorganismy nepříznivý vliv, a to v důsledku svého specifického chemického složení (nikoliv tím, že by ovlivňovaly pH nebo oxidačně redukční potenciál prostředí). Látky s nepříznivými specifickými účinky na mikroorganismy se nazývají antimikrobiální: buď pouze zastavují rozmnožování mikroorganismů (tzv. mikrobistatické látky), nebo je usmrcují (mikrobicidní látky). Působí-li pouze na bakterie, nazývají se látky bakteriostatické nebo baktericidní, ovlivňují-li kvasinky a plísně, jde o látky fungistatické a fingicidní**.** Některé antimikrobiální látky působí v nižších koncentracích mikrobistaticky a ve vyšších koncentracích mikrobicidně, kdežto jiné i ve velmi vysokých koncentracích pouze zastavují růst a jejich účinek je vratný. Většina antimikrobiálních látek má ve velmi nízkých koncentracích účinek stimulační, neboť zrychluje rychlost jejich rozmnožování (43).

Větší antimikrobiální účinky byly statisticky prokázány u ovoce s fytoncidy např. citron, pomeranč oproti kiwi, banánu, hroznovému vínu; a u syrové vymačkané šťávy na rozdíl od

extraktu ze šťávy a povrchu. Nejmenší antimikrobiální účinky vykazovaly extrakty z povrchu ovoce. U kiwi a banánu nebyly prokázány žádné antimikrobiální účinky na pokusný kmen bakterií *Staphylococcus aureus*. Naopak u banánu a hroznového vína se projevily významné účinky na pokusný kmen bakterií *Escherichia coli*, překvapivě byly tyto účinky větší než u pomeranče. Jednoznačně největší antimikrobiální účinky na oba testované kmeny se prokázaly u čerstvé šťávy z citronu. Co se týče účinku samotného ovoce tj. povrchu (rub a líc) a dužiny. Větší antimikrobiální účinky vykazovala dužina oproti povrchu ovoce.

Z výsledků plyne, že nám nemusí být líto, když se ovoce zbavuje povrchu, protože většina antimikrobiálních látek se skrývá pod povrchem ovoce. Dále se potvrdilo antimikrobiální působení citronu, čímž se prokázala účinnost šťávy z citronu v čajích na průběh uzdravování při různých chorobách a nachlazeních.

Postřik ovoce smíšenou mykoflórou byl natolik úspěšný, že fungicidní přípravky neprokázaly žádný účinek.

Podle Obenbergera a Trojana (1976) mají organické fungicidy většinou vyhraněný specifický účinek a jsou velmi dobře mísitelné jak mezi sebou, tak i s insekticidy. Velkou výhodou těchto látek je, že ve většině případů jsou jen velmi málo jedovaté, a tedy relativně bezpečné pro člověka, hospodářská zvířata, včely i ryby, a že v používaných koncentracích nejsou fytotoxické.

Z chemického hlediska jde o velmi rozmanité organické sloučeniny; z praktického hlediska je lze rozdělit do pěti skupin:

- dithiokarbamáty,
- thiuramdisulfidy,
- kaptan a příbuzné látky,
- nitrované látky,
- ostatní organické fugicidy.

Dithiokarbamáty jsou známy jako fungicidy od třicátých let tohoto století. Výhodou těchto organických sloučenin síry je jejich široké spektrum účinnosti, malá fytotoxicita bezpečnost pro teplokrevné organismy (s výjimkou kuřat) a neškodnost pro včely. Většinou

se jich používá v postřikových přípravcích, jen ojediněle jako poprašků. Uplatňují se v zemědělství ovocnářství, vinařství, chmelařství, zelinářství i okrasném zahradnictví. Tyto látky údajně též přispívají k pěknému vybarvení plodů. Podle chemické struktury je můžeme rozdělit na dvě velké skupiny, a to na soli *kyseliny dimethyldithiokarbamové* (sodná sůl = nabam, zinečnatá = ziram, železitá = ferbam) a soli *kyseliny dithiokarbamové* (zinečnatá sůl = zineb, manganatá sůl = maneb, zinečnato-manganatá sůl = mankozeb). Mankozeb je v podstatě směs zinebu a manebu (někdy se považuje za samostatný komplex). V zahraničí se ho používá proti strupovitosti, nepravému padlí, rzím na zelenině a okrasných rostlinách, perenospoře chmelu, perenospoře révy vinné a fytoftoře brambor. V ČR jsou povoleny přípravky Novozir MN 80 (CHZJD) a americký **Dithane M-45** (Rohm & Haas).

Některé nitrované látky mají výrazné fungicidní vlastnosti. Z nitrovaných sloučenin se používá dinokap, který byl objeven roku 1934 (Rohm & Haas, USA) a je účinnou látkou přípravku **Karathane**, který je specifickým fungicidem proti padlí a současně též výborným akaricidem.

Existuje ještě řada dalších fungicidních látek, které se zahrnují do skupiny ostatní organické fungicidy. K nim patří i dichlofluanid, který byl objeven před několika lety a je účinnou látkou západoněmeckého přípravku **Euparen** (Bayer). Euparen je specificky účinný proti padlí na růžích (44).

Na pokusný kmen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* působil samotný fungicidní přípravek, ale po postřiku na ovoce svůj účinek ztratil. Efekt samotného fungicidního přípravku se prokázal vytvořením sterilní zóny kolem papírového disku napuštěného fungicidním přípravkem.

Pokusný kmen *Escherichia coli* vykázal menší odolnost proti fungicidním přípravkům na rozdíl od *Lactobacilla delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Na *Escherichia coli* působily nejen samotné fungicidní přípravky, ale i ovoce postříkané fungicidními přípravky vytvořením větší sterilní zóny než u *Lactobacilla delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Domnívám se větší odolnost pokusného kmene *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* byla způsobena jejich probiotickou schopností.

ZÁVĚR

Co nebezpečného mohou potraviny obsahovat?

Za prvé chemické látky: průmyslové kontaminanty, jedy produkované plísněmi, jedy, které se tvoří přímo v potravinách (například solanin v bramborách), pesticidy a veterinární léčiva, potravinové přísady. Za druhé biologické látky: bakterie, viry a BSE, parazity, mikroskopické houby.

Ovoce a zelenina jsou bezpečnější?

I tady můžete dostat salmonelu, bylo-li pole hnojeno a člověk potravinu dostatečně neumyl. Hodně se mluví o dusičnanech, i když dodnes není jasné, jak závažný je to problém. Ovoce je velmi čisté, ale třeba červená řepa má až tři gramy dusičnanů na kilogram, totéž se týká rychlených zelenin. Jenže zelenina obsahuje řadu ochranných látek, například vitamin C působící proti dusičnanům. Přesný poměr mezi rizikem a ochranou neumíme hodnotit. Na ovoci můžeme najít plísně rodů *Aspergillus, Penicillium, Cladporium, Fusarium, Alternarium, Rhizopus, Mucor, Botritis* a *Oospora*, a bakterie *Bacillus stearotermophilus, Bacillus substilis* a *Staphylococcus aureus*. Na zelenině mohou vegetovat bakterie rodu *Bacillus, Aerobacter, Erwinia, Flavobacterium, Achromobacter, Cellulomonas, Chromobacterium, Streptococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Micrococcus, Pseudomonas, Mycobacterium, Phytomonas, Sarcina, Staphylococcus, Serratia, Vibrio a Escherichia* (45).

Jak lze riziku předejít?

Nekupovat například potraviny jen z jednoho či dvou zdrojů. Omezíte tak nebezpečí, že když koupíte brambory kontaminované pesticidy, budete je jíst celý rok. Zároveň dbejte na co nejpestřejší složení potravin. Jinak platí deset zlatých pravidel Světové zdravotnické organizace, z nichž je snad nejdůležitější provaření a správná manipulace. To téměř zcela omezí riziko většiny bakterií, virů a parazitů. Bohužel s výjimkou BSE (46).

Pokud se na ovoci či zelenině uchytí příliš mnoho plísní, potom ani postřik fungicidními přípravky nepomůže. Potraviny s plísní bychom neměli nikdy konzumovat ani zkrmovat!

Bakterie rodu *Lactobacillus* prokázaly vyšší odolnost proti reziduím pesticidů než *Escherichia coli*.

Byla prokázána vyšší antibakteriální aktivita syrových ovocných šťáv oproti extraktům z povrchu a dužiny. Za pokusný kmen jsem zvolila *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Extrakty z povrchu působily nejméně na tyto bakterie. Největší antimikrobiální aktivitu vykazovala šťáva z citronu. Domnívám se, že to souvisí s obsahem fytoncidů a vitaminem C v citronech. Šťáva z citronu má tedy antimikrobiální účinky a pomáhá léčit nemoci a nachlazení.

Dnes se ke slovu znovu dostává přírodní léčitelství pomocí bylinek a vitaminů. Stejný druh antibiotik nelze brát stále, je známo, že si na ně člověk časem vytvoří rezistenci. Stačí krátký pohled do historie.

Ve třicátých letech minulého století se objevil první účinný lék - sulfonamidy. V roce 1943 penicilin, hned za ním streptomycin, pak chloramfenikol, tetracyklin, erytromycin... a můžeme pokračovat dodnes. Odolnost některých bakteriálních kmenů vůči novému antibiotiku se začala objevovat také už po několika letech. V řadě nemocnic vznikly bakteriální kmeny, které jsou příčinou obávaných, často smrtících nemocničních nákaz. Dědičná informace bakterií i virů se může velmi rychle měnit - mutuje. Jestliže se náhodně objeví nějaký počet příslušníků bakteriálního kmene, které jsou vůči antibiotiku málo citlivé, pak se v prostředí, kde antibiotikum je, dejme tomu v ráně, pomnoží. Svou informaci - třeba necitlivost na penicilin - přenesou do další generace. Na penicilin citliví příslušníci kmene zahynou. Odolní se budou množit dál. Penicilin zapůsobil jako selekční neboli výběrový vliv. Například zlatý stafylokok, mikrob způsobující obávané hnisavé infekce. V roce 1946 byl citlivý na penicilin, v roce 1961 jej začali lékaři hubit meticilinem, neboť lidé a jejich penicilin coby společná evoluční síla za 15 let vyselektovaly odolné kmeny. Historie se opakovala: V roce 1986 musel nastoupit vankomycin a v dalším kole, od roku 1999, zyvox. Nežádoucí evoluci bakterií lidé pomáhali nedostatečnou dávkou antibiotika, případně dostatečnou dávkou, ale užívanou nedostatečně dlouhou dobu. Což je jedna z hlavních příčin vzniku multirezistentních kmenů tuberkulózních bakterií. Infekce takovým kmenem mívá úmrtnost podobnou, jaká byla v době před objevem příčinného léčení - kolem 50 procent. Odolné kmeny různých druhů bakterií se ze stejných důvodů objevují na farmách užívajících antibiotika k ochraně zvířat. Byly zjištěny v jejich odpadových vodách i v místní půdě. To samé se týká jiných živých původců nemocí, například malárie, i komárů, kteří ji přenášejí. Stejné trápení mají lidé užívající herbicidy a pesticidy v rostlinné výrobě (47).

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1) POVOLNÝ, Dalibor: Dvacáté století ve znamení chemizace. Dvacáté první? VERONICA. 2000, roč. 2000, č. 5, str. 9 - 12.

2) OSTRÝ, Vladimír: Vláknité mikroskopické houby (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka. 1. vyd., Praha: Státní zdravotní ústav, 1998. 20 s. ISBN: 80-7071-102-7.

3) HÄBERLE, Gregor a kol.: Technika životního prostředí pro školu i praxi. 1. vyd., Praha: Europa-Sobotáles, 2003. 336 s. ISBN:80-86706-05-2.

4) VELÍŠEK, Jan: Chemie potravin 3. 2. vyd., Tábor: OSSIS, 2002. 368 s. ISBN: 80-86659-03-8.

5) ZAKOPAL, Jaroslav – ŠEDIVÝ, Josef: Chemie na zahrádce. 3. vyd., Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1984. 464 s.

6) Vyhláška 158/2004 Sb., kterou se stanoví max. přípustné množství reziduí jednotlivých druhů pesticidů v potravinách a potravinových surovinách.

7) PROKEŠ, Jaroslav a kol.: Základy toxikologie II. 1. vyd., Praha: Karolinum, 1998. 92 s. ISBN: 80-7184-419-5.

8) HUGHES, James: Velká obrazová všeobecná encyklopedie. 1. vyd., Praha: Svojtka&Co., 1999. 792 s. ISBN: 80-7237-256-4.

9) PÁNEK, Jan a kol.: Základy výživy. 1. vyd., Praha: Svoboda Servis, 2002. 207 s. ISBN: 80-86320-23-5.

10) SURYNEK, Jaroslav. Přísady v potravinách. VERONICA. 2000, roč. 2000, č. 3, s. 26 - 27.

11) SURYNEK, Jaroslav. Přísady v potravinách II. VERONICA. 2000, roč. 2000, č. 4, s. 25 - 26.

12) KREUTER, Marie-Luise: Biologická ochrana rostlin. 1. vyd., Dobřejovice: Rebo Productions, 2002. 96 s. ISBN: 80-7234-234-7.

13) RŮŽIČKA, Jan: Mikrobiologie pro technology životního prostředí. 1. vyd., Vysoké učení technické v Brně, Fakulta technologická ve Zlíně, 1999. 124 s. ISBN: 80-214-1374-3.

14) HRABĚ, Jan – KOMÁR, Aleš: Technologie zbožíznalství a hygiena potravin III. část. 1. vyd., Vyškov: VVŠ PV, 2003. 164 s.

15) FASSATIOVÁ, Olga: Plísně a vláknité houby v technické mikrobiologii. 1. vyd., Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1979. 240 s.

16) ŠIMUNEK, Jan - BŘEZINA, Pavel: Mykotoxiny. 1. vyd., Vyškov: VVŠ PV, 1996. 70 s.

17) ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila: Mikrobiologické zkoumání potravin. 1. vyd., Praha: VŠCHT v Čs. redakci VN MON, 1987. 104 s.

18) REEVE, Roger N.: Environmental Analysis. 1st. ed, Chichester: John Wiley & Sons, 1999. 263 s. ISBN: 0-471-93833-5.

19) KUČEROVÁ, Petra: Studium metabolismu vybraných xenobiotik pomocí rostlinných buněk. Diplomová práce 2001 [online]. [cit. 2004-03-20]. Dostupný z URL: <www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/studium /absolventi/kucerova.pdf>.

20) Nitrofen [online]. [cit. 2004-11-05]. Dostupný z URL: <www.chpr.szu.cz/cgentix/chem/nitrofen.htm>.

21) Dioxiny, dibenzofurany a PCB s dioxinovým efektem [online]. [cit. 2004-11-05]. Dostupný z URL: <www.chpr.szu.cz/monitor/tds02c/5chem/org/DIOXIN02.pdf>.

22) HORÁK, Josef – LINHART, Igor – KLUSOŇ, Petr: Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky. 1. vyd., Praha: VŠCHT, 2004. 188 s. ISBN: 80-7080-548-X.

23) Rakovinotvorné prostředky k ošetřování rostlin [online]. [cit. 2004-03-18]. Dostupný z URL: <www.ohz.cz/Publikace/08.html>.

24) Legislativa ČR [online]. [cit. 2005-04-07]. Dostupný z URL: <www.env.cz/www/zákon.nsf/Categories?OpenView&Start=1&count=30&Expand>.

25) Legislativa ČR [online]. [cit. 2005-04-07]. Dostupný z URL: <www.szpi.gov.cz/cze/legislativa/list.asp?page=2&cat=2166&ts=8ec75>.

26) Legislativa ČR [online]. [cit. 2005-04-25]. Dostupný z URL: <www.guard7.cz/legislativaOK.htm>.

27) Legislativa EU [online]. [cit. 2005-04-07]. Dostupný z URL: <www.bezpecnostpotravin.cz/default.asp?ids=0&ch=68&typ=1&val=34499>.

28) Legislativa EU [online]. [cit. 2005-04-07]. Dostupný z URL: <www.bezpecnostpotravin.cz/default.asp?ids=0&ch=68&typ=1&val=33396>.

29) Legislativa EU [online]. [cit. 2005-04-07]. Dostupný z URL: <www.bezpecnostpotravin.cz/default.asp?ids=0&ch=68&typ=1&val=33585>.

30) Legislativa EU [online]. [cit. 2005-04-07]. Dostupný z URL: <www.bezpecnostpotravin.cz/default.asp?ids=0&ch=68&typ=1&val=33512>.

31) STRIGÁČOVÁ, Jana - HUDECOVÁ, Daniela: Metodické aspekty stanovenie antimikrobiálnej aktivity zlúčenín *in vitro*. Biologické listy. 2001, roč. 66, č. 9, s. 113-124.

32) Survival of Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes, and Salmonella in juice concentrates [online]. [cit. 2004-04-15]. Dostupný z URL: <www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=14503711&dopt=Abstract>.

33) Inactivation of Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes, and Salmonella in cranberry, lemon, and lime juice concentrates [online]. [cit. 2004-04-13]. Dostupný z URL: <www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=14503718&dopt=Abstract>.

34) Application of ultrasound-assisted thermal processing for preservation and quality retention of liquid foods [online]. [cit. 2004-04-09]. Dostupný z URL: <www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=14503719&dopt=Abstract>.

35) Effectiveness of chlorine, organic acids and UV treatments in reducing Escherichia coli O157:H7 and Yersinia enterocolitica on apples [online]. [cit. 2004-05-17]. Dostupný z URL: <www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12884547&dopt=Abstract>.

36) Fate of salmonellae in orange and grapefruit concentrates during cold storage [online]. [cit. 2005-03-02]. Dostupný z URL: <www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract &list_uids=15633670>.

37) Inactivation of Saccharomyces cerevisiae suspended in orange juice using high-intensity pulsed electric fields [online]. [cit. 2005-03-02]. Dostupný z URL: <www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract &list_uids=15553647>.

38) Detection and identification of bacteria in juice matrix with Fourier transform-near infrared spectroscopy and multivariiate analysis [online]. [cit. 2005-03-02]. Dostupný z URL: <www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract &list_uids=15553641>.

39) Radiation-heat synergism for inactivation of Alicyclobacillus acidoterrestris spores in citrus juice [online]. [cit. 2005-03-02]. Dostupný z URL: <www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract &list_uids=15633638>.

40) Effects of recovery, plating, and inoculation methods on quantification of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes from strawberries [online]. [cit. 2005-03-02]. Dostupný z URL: <www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract &list_uids=15553625>.

41) BLAŽEJ, Anton a kol.: Chemické aspekty životného prostredia. 1. vyd., Bratislava: Alfa, 1981, 600 s.

42) CEJP, Karel: Houby I. 1. vyd., Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1957. 496 s.

43) ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 1. vyd. Praha: Academia, 2002. 364 s. ISBN: 80-200-1024-6.

44) OBENBERGER, Jan – TROJAN, Václav: Příručka chemické ochrany rostlin. 2. vyd., Praha: SNTL, 1976. 416 s.

45) HRUBÝ, Jaroslav: Technologie a technika výroby zmrazených potravin. 1. vyd., Praha: SNTL, 1986. 360 s.

46) RIBAUEROVÁ, Martina: ”Více než BSE hrozí obezita” [online]. [cit. 2004-03-05]. Dostupný z URL: <www.zdn.cz (zdroj mfd 18.6.2001)>.

47) KOUKOLÍK, František: ”Evoluce hnaná lidmi” [online]. [cit. 2004-03-05]. Dostupný z URL: <www.zdn.cz (zdroj Hospodářské noviny 28.6.2002)>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADI	animal daily intax (přípustná denní dávka)
aj.	a jiné
atd.	a tak dále
ATP	adenosintrifosfát
BCD	biokoncentrační faktor
BHA	butylhydroxyanisol
BHT	butylhydroxytoluol
BSE	bovinní transmisivní encefalopatie
BTM	bromtimolová modř
CFU	colony forming units (životaschopné jednotky)
cm	centimetr
č.	číslo
DECP	dibromochlorapropan
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
EDB	Etylen olibromo
EHS	Evropské hospodářské společenství
EPA	Environmental Protection Agency (agentura pro ochranu životního prostředí)
ES	Evropské společenství
EU	Evropská unie
FAO	Organizace OSN pro výživu a zemědělství
FDA	Food and Drug Administration (úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
FT-NIR spectroscopy	Fourier transform-near infrared (Fourierova infračervená spektroskopie)

g	gram
ha	hektar
HCB	hexachlorbenzen
HIPEF	high-intensity pulsed electric field (vysoce impulzivní elektrické pole)
Hz	hertz
IC_{50}	incidenční dávka pro 50 % pokusných zvířat
IRIS	integrovaný regionální informační systém
kg	kilogram
KTJ	kolonietvorná jednotka
kV	kilovolt
l	litr
LD50	Letalit Dosis (letální dávka pro 50 % pokusných zvířat)
log	logaritmus
mg	miligram
MIC	minimální inhibiční koncentrace
min	minuta
ml	mililitr
MMC	maximální možná koncentrace
MRL	Maximum Residue Levels (horní legální koncentrace rezidua pesticidu)
např.	například
NMR spektroskopie	nukleárně molekulární spektroskopie
obr.	obrázek
OSF	orální cesta

PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PBS	phosphate-buffered saline (roztok fosforečnanu)
PCB	polychlorované bifenyly
PCDD	polychlorované dibenzo-p-dioxiny
PCDF	polychlorované dibenzofurany
pH	záporně vzatý dekadický logaritmus aktivity H_3O^+ iontů
POPs	persistentní organické znečišťující sloučeniny
Pozn.	poznámka
ppm	miliontina
příp.	případně
QSAR	Quantitative Structure-Activity relationships (kvantitativní analýza vztahů struktura - aktivita)
resp.	respektive
RfD	referenční dávka, která je definována jako denní expozice , která při celoživotní expozici pravděpodobně nezpůsobní poškození zdraví
Sb.	sbírky
sp.	species (druh, j. č.)
spp.	species (druhy, mn. č.)
subsp.	subspecies (poddruh, j. č.)
tab.	tabulka
tj.	tj.
t. hm.	tělesná hmotnost
tzv.	tak zvaný
USA	United States of America (Spojené státy americké)

UV záření	ultrafialové záření
vol	volume (objem)
vz.	vzorek
wt	weight (hmotnost)
°C	stupeň Celsia
%	procento
ø	průměr

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Strategie vývoje nových antibakteriálních sloučenin 27
Obr. 2. Šablony 36
Obr. 3. Antimikrobiální účinek citronu (rub, líc, dužina) na *Staphylococcus aureus* 49
Obr. 5. Exikátor – kultivace na Minerální látky bez BTM 52
Obr. 6. Exikátor – kultivace na Chloramfenikol agar 53
Obr. 7. Účinek hroznu, který byl postříkán Dithane M 45 na *Lactobacilla* 56
Obr. 8. Účinek citronu, který byl postříkán Dithane M 45 na *Escherichia coli* 57

SEZNAM TABULEK

Tabulka I. Klasifikace pesticidů podle cílových škodlivých činitelů.....9
Tabulka II. Extrakce tlakem s pokusným kmenem ***Staphylococcus aureus*** 36
Tabulka III. Extrakce varem s pokusným kmenem ***Staphylococcus aureus*** 37
Tabulka IV. Extrakce tlakem s pokusným kmenem ***Escherichia coli*** 38
Tabulka V. Extrakce varem s pokusným kmenem ***Escherichia coli*** 39
Tabulka VI. Zkouška povrchu a dužiny s pokusným kmenem ***Staphylococcus aureus*** 40
Tabulka VII. Zkouška povrchu a dužiny s pokusným kmenem ***Escherichia coli*** 40
Tabulka VIII. Srovnání hodnot u extrakce tlakem na *Staphylococcus aureus* pomocí Wilcoxonova testu.....40
Tabulka IX. Srovnání hodnot u extrakce tlakem a varem na *Staphylococcus aureus* pomocí Wilcoxonova testu.....41
Tabulka X. Srovnání hodnot u extrakce varem na *Staphylococcus aureus* pomocí Wilcoxonova testu.....41
Tabulka XI. Srovnání hodnot u extrakce tlakem na *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* pomocí Wilcoxonova testu.....42
Tabulka XII A. Srovnání hodnot u extrakce tlakem na *Escherichia coli* pomocí Wilcoxonova testu.....42
Tabulka XII B. Srovnání hodnot u extrakce tlakem na *Escherichia coli* pomocí Wilcoxonova testu.....43
Tabulka XII C. Srovnání hodnot u extrakce tlakem na *Escherichia coli* pomocí Wilcoxonova testu.....44
Tabulka XIII. Srovnání hodnot u extrakce varem na *Staphylococcus aureus a Escherichia coli* pomocí Wilcoxonova testu.....45
Tabulka XIV. Srovnání hodnot u extrakce tlakem a varem na *Escherichia coli* pomocí Wilcoxonova testu.....46
Tabulka XV A. Srovnání hodnot u extrakce varem na *Escherichia coli* pomocí Wilcoxonova testu.....47
Tabulka XV B. Srovnání hodnot u extrakce varem na *Escherichia coli* pomocí Wilcoxonova testu.....48
Tabulka XVI. Účinek směsi plísní na agar.....51
Tabulka XVII. Účinek směsi plísní na ovoce postříkané fungicidním přípravkem – kultivace na Chloramfenicol agar.....51
Tabulka XVIII. Účinek směsi plísní na ovoce postříkané fungicidním přípravkem – kultivace na Minerální látky bez BTM 51
Tabulka XIX. Účinek směsi plísní na ovoce postříkané fungicidním přípravkem – kultivace na Chloramfenicol agar.....51
Tabulka XX. Účinek směsi plísní na ovoce postříkané fungicidním přípravkem – kultivace na Minerální látky bez BTM 51
Tabulka XXI. Účinek směsi plísní na ovoce postříkané fungicidním přípravkem – kultivace na Chloramfenicol agar.....52
Tabulka XXII. Účinek směsi plísní na ovoce postříkané fungicidním přípravkem – kultivace na Minerální látky bez BTM 52
Tabulka XXIII. Účinek fungicidního přípravku na pokusný kmen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 55
Tabulka XXIV. Účinek fungicidního přípravku na pokusný kmen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 55

Tabulka XXV. Účinek fungicidního přípravku na pokusný kmen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 55
Tabulka XXVI. Účinek samotného ovoce na pokusný kmen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 55
Tabulka XXVII. Účinek fungicidního přípravku na pokusný kmen *Escherichia coli*..... 55
Tabulka XXVIII. Účinek fungicidního přípravku na pokusný kmen *Escherichia coli* 56
Tabulka XXIX. Účinek fungicidního přípravku na pokusný kmen *Escherichia coli*..... 56
Tabulka XXX. Účinek samotného ovoce na pokusný kmen *Escherichia coli* 56

SEZNAM PŘÍLOH

P 1 : Antimikrobiální účinek citronu na *Staphylococcus aureus* (extrakce varem)

P 2 : Antimikrobiální účinek citronu na *Staphylococcus aureus* (extrakce tlakem)

P 3 : Antimikrobiální účinek pomeranče na *Staphylococcus aureus* (extrakce varem)

P 4 : Antimikrobiální účinek pomeranče na *Staphylococcus aureus* (extrakce tlakem)

P 5 : Antimikrobiální účinek pomeranče na *Staphylococcus aureus* (rub, líc, dužina)

P 6 : Antimikrobiální účinek kiwi na *Staphylococcus aureus* (rub, líc, dužina)

P 7 : Antimikrobiální účinek kiwi na *Staphylococcus aureus* (extrakce varem)

P 8 : Antimikrobiální účinek kiwi na *Staphylococcus aureus* (extrakce tlakem)

P 9 : Antimikrobiální účinek banánu na *Staphylococcus aureus* (extrakce varem)

P 10 : Antimikrobiální účinek banánu na *Staphylococcus aureus* (extrakce tlakem)

P 11 : Antimikrobiální účinek banánu na *Staphylococcus aureus* (rub, líc, dužina)

P 12 : Antimikrobiální účinek hroznu na *Staphylococcus aureus* (rub, líc, dužina)

P 13 : Antimikrobiální účinek hroznu na *Staphylococcus aureus* (extrakce varem)

P 14 : Antimikrobiální účinek hroznu na *Staphylococcus aureus* (extrakce tlakem)

P 15 : Antimikrobiální účinek citronu na *Escherichia coli* (extrakce varem)

P 16 : Antimikrobiální účinek citronu na *Escherichia coli* (extrakce tlakem)

P 17 : Antimikrobiální účinek pomeranče na *Escherichia coli* (extrakce varem)

P 18 : Antimikrobiální účinek pomeranče na *Escherichia coli* (extrakce tlakem)

P 19 : Antimikrobiální účinek pomeranče na *Escherichia coli* (rub, líc, dužina)

P 20 : Antimikrobiální účinek kiwi na *Escherichia coli* (rub, líc, dužina)

P 21 : Antimikrobiální účinek kiwi na *Escherichia coli* (extrakce varem)

P 22 : Antimikrobiální účinek kiwi na *Escherichia coli* (extrakce tlakem)

P 23 : Antimikrobiální účinek hroznu na *Escherichia coli* (extrakce varem)

P 24 : Antimikrobiální účinek hroznu na *Escherichia coli* (extrakce tlakem)

P 25 : Antimikrobiální účinek banánu na *Escherichia coli* (extrakce varem)

P 26 : Antimikrobiální účinek banánu na *Escherichia coli* (extrakce tlakem)

P 27 : Účinek fungicidních přípravků na směs plísní (kontrolka)

P 28 : Účinek fungicidních přípravků na směs plísní (mandarinka) – kultivace na Chloramfenicol agar

P 29 : Účinek fungicidních přípravků na směs plísní (citron) – kultivace na Chloramfenicol agar

P 30 : Účinek fungicidních přípravků na směs plísní (kiwi) – kultivace na Chloramfenicol agar

P 31 : Účinek fungicidních přípravků na směs plísní – kultivace na Chloramfenicol agar

P 32 : Účinek fungicidních přípravků na směs plísní (mandarinka) – kultivace na Minerální látky bez BTM

P 33 : Účinek fungicidních přípravků na směs plísní (citron) – kultivace na Minerální látky bez BTM

P 34 : Účinek fungicidních přípravků na směs plísní (kiwi) – kultivace na Minerální látky bez BTM

P 35 : Účinek fungicidních přípravků (Dithane M 45) na *Lactobacilla*

P 36 : Účinek fungicidních přípravků (Karathane LC) na *Lactobacilla*

P 37 : Účinek fungicidních přípravků (Euparen Multi) na *Lactobacilla*

P 38 : Účinek samotného hroznu na *Lactobacilla*

P 39 : Účinek fungicidních přípravků (Dithane M 45) nastříkaných na hroznu na *Lactobacilla*

P 40 : Účinek fungicidních přípravků (Karathane LC) nastříkaných na hroznu na *Lactobacilla*

P 41 : Účinek fungicidních přípravků (Euparen Multi) nastříkaných na hroznu na *Lactobacilla*

P 42 : Účinek samotného citronu na *Lactobacilla*

P 43 : Účinek fungicidních přípravků (Dithane M 45) nastříkaných na citronu na *Lactobacilla*

P 44 : Účinek fungicidních přípravků (Dithane M 45) na *Escherichia coli*

P 45 : Účinek fungicidních přípravků (Karathane LC) na *Escherichia coli*

P 46 : Účinek fungicidních přípravků (Euparen Multi) na *Escherichia coli*

P 47 : Účinek samotného hroznu na *Escherichia coli*

P 48 : Účinek fungicidních přípravků (Dithane M 45) nastříkaných na hroznu na *Escherichia coli*

P 49 : Účinek fungicidních přípravků (Karathane LC) nastříkaných na hroznu na *Escherichia coli*

P 50 : Účinek fungicidních přípravků (Euparen Multi) nastříkaných na hroznu na *Escherichia coli*

P 51 : Účinek samotného citronu na *Escherichia coli*

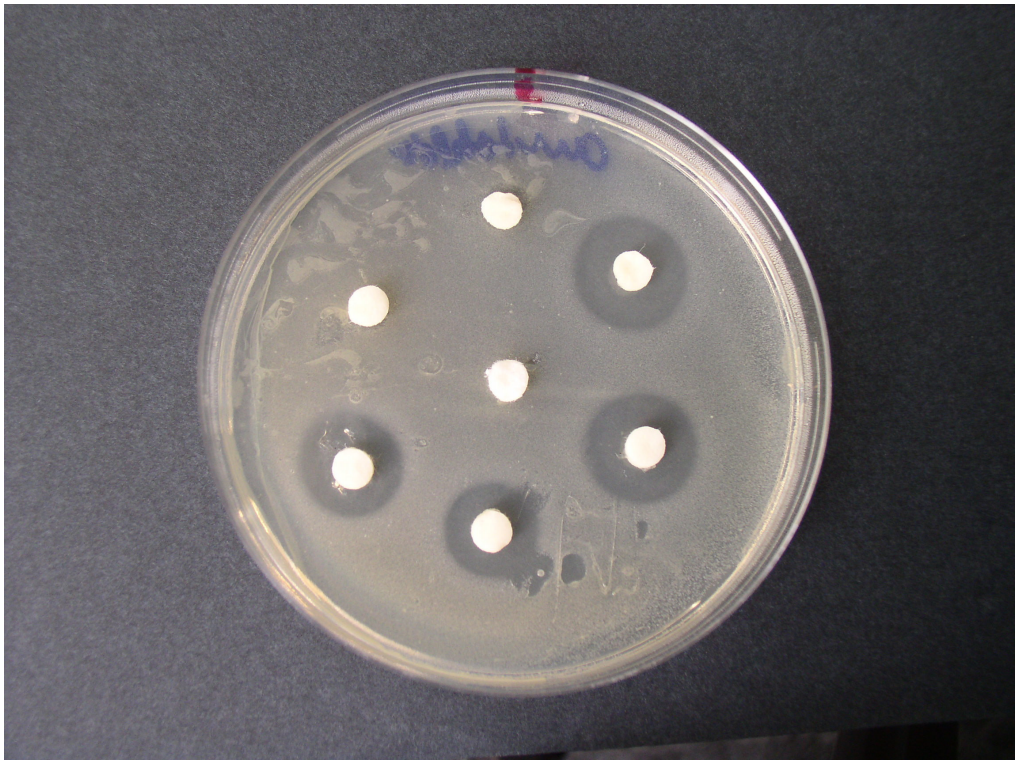
P 52 : Účinek fungicidních přípravků (Dithane M 45) nastříkaných na citronu na *Escherichia coli*

P 53 : Účinek fungicidních přípravků (Karathane LC) nastříkaných na citronu na *Escherichia coli*

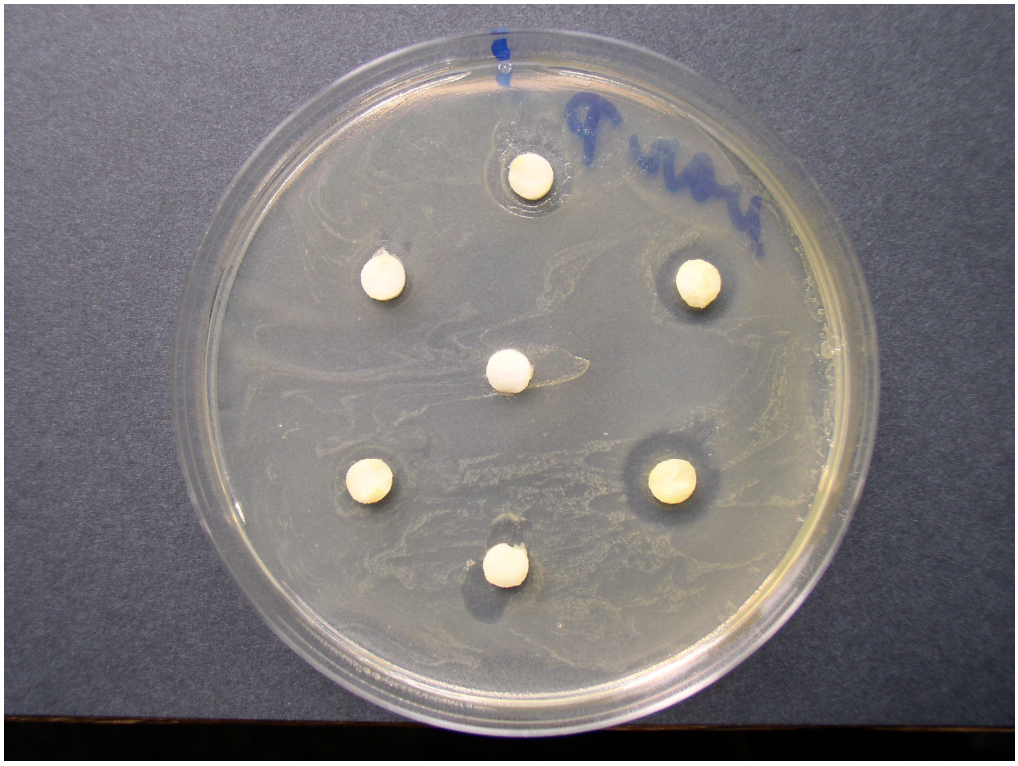
P 54 : Účinek fungicidních přípravků (Euparen Multi) nastříkaných na citronu na *Escherichia coli*



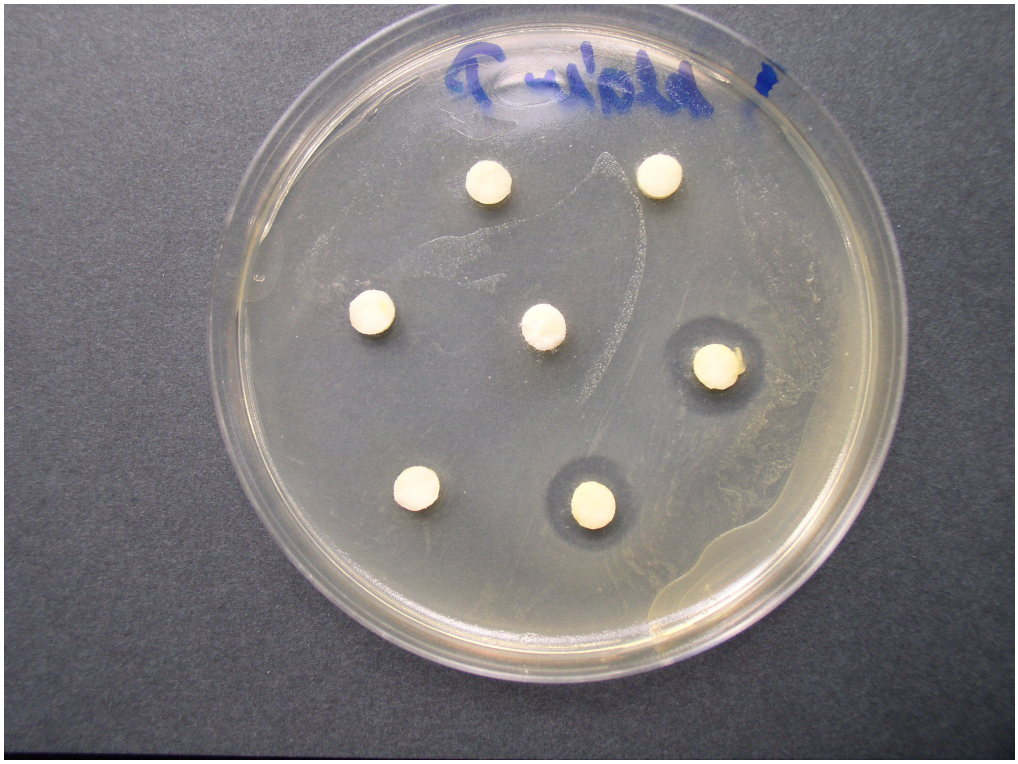
P 1. Antimikrobiální účinek citronu na *Staphylococcus aureus* (extrakce varem)



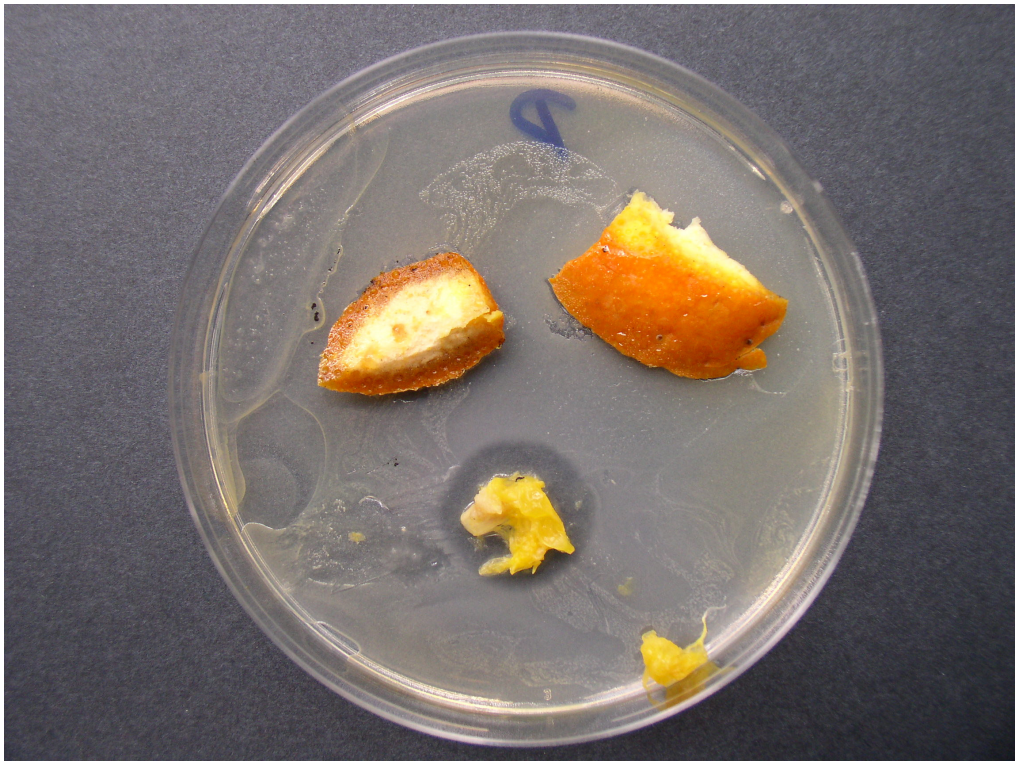
P 2. Antimikrobiální účinek citronu na *Staphylococcus aureus* (extrakce tlakem)



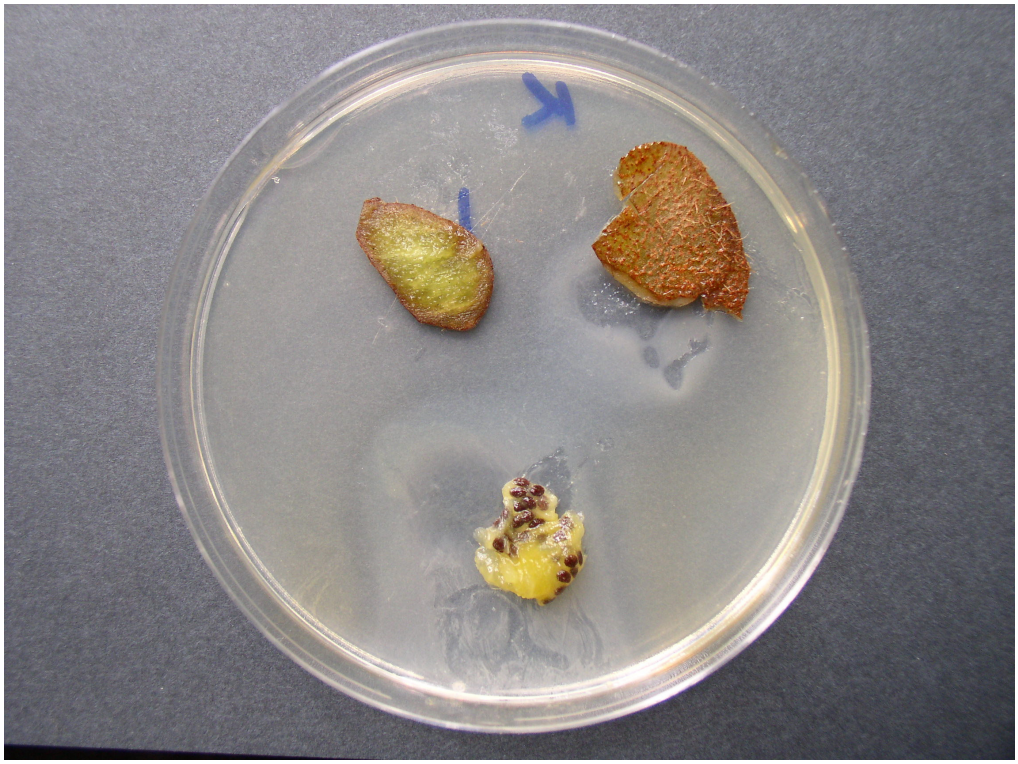
P 3. Antimikrobiální účinek pomeranče na *Staphylococcus aureus* (extrakce varem)



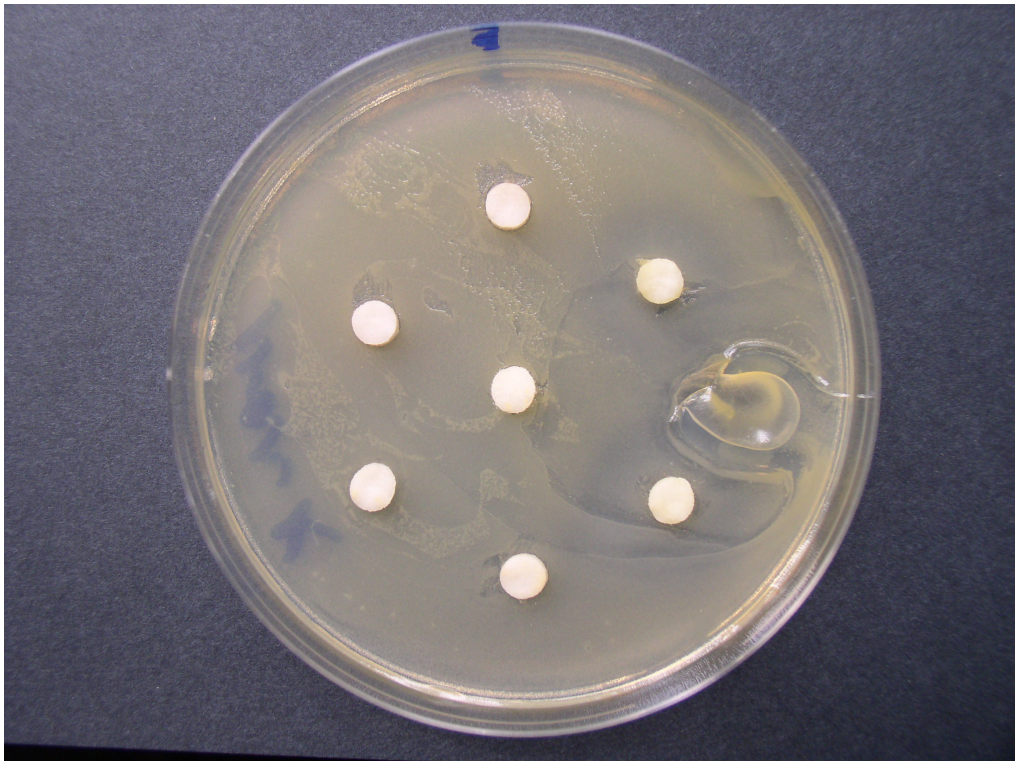
P 4. Antimikrobiální účinek pomeranče na *Staphylococcus aureus* (extrakce tlakem)



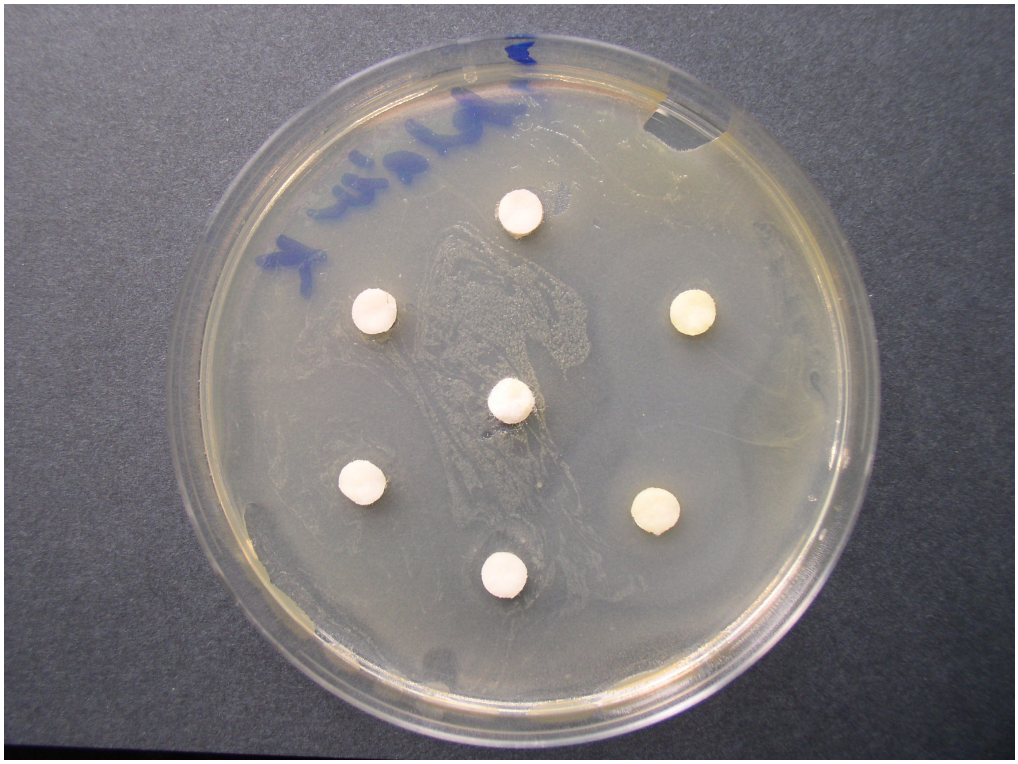
P 5. Antimikrobiální účinek pomeranče na *Staphylococcus aureus* (rub, líc, dužina)



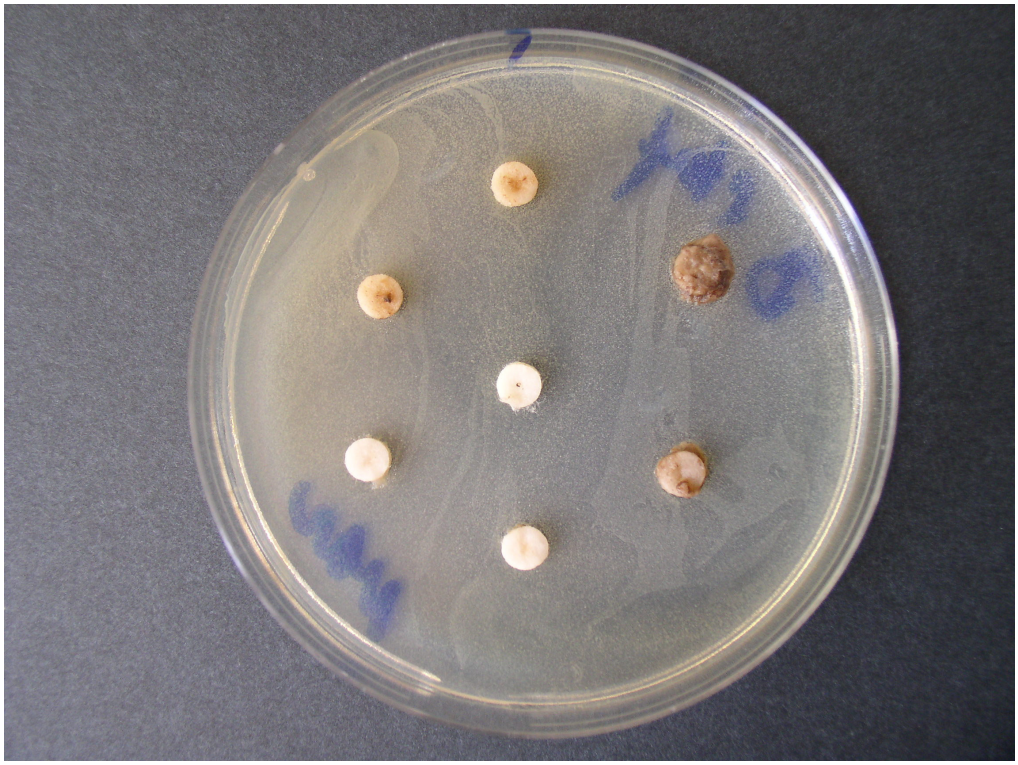
P 6. Antimikrobiální účinek kiwi na *Staphylococcus aureus* (rub, líc, dužina)



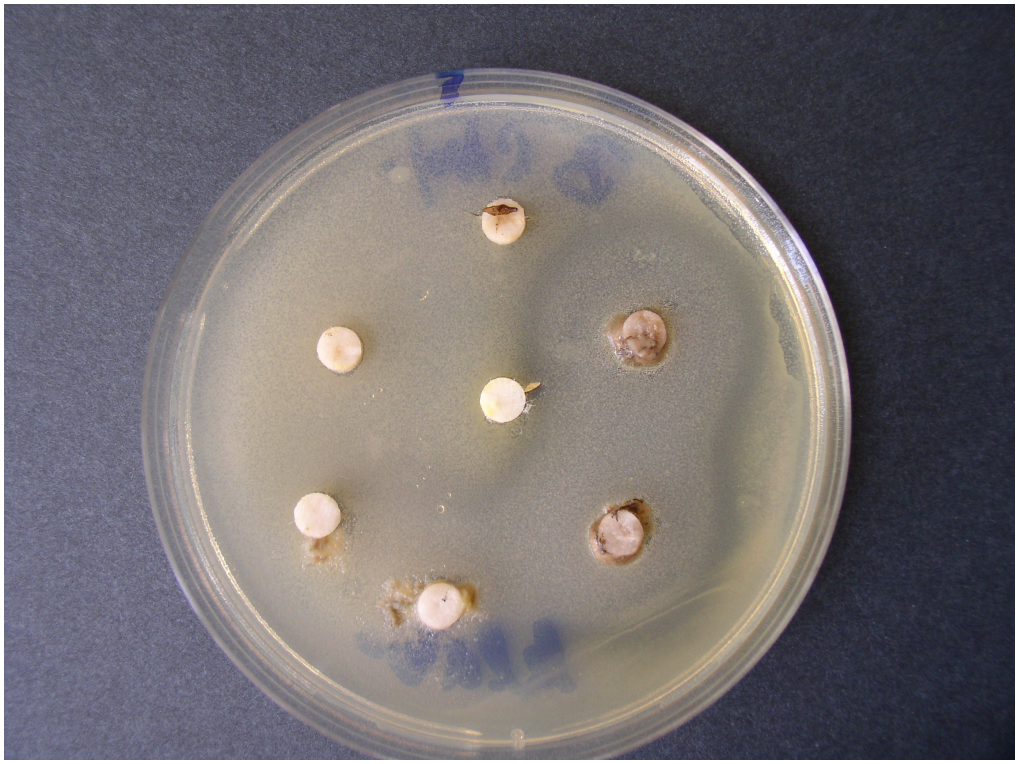
P 7. Antimikrobiální účinek kiwi na *Staphylococcus aureus* (extrakce varem)



P 8. Antimikrobiální účinek kiwi na *Staphylococcus aureus* (extrakce tlakem)



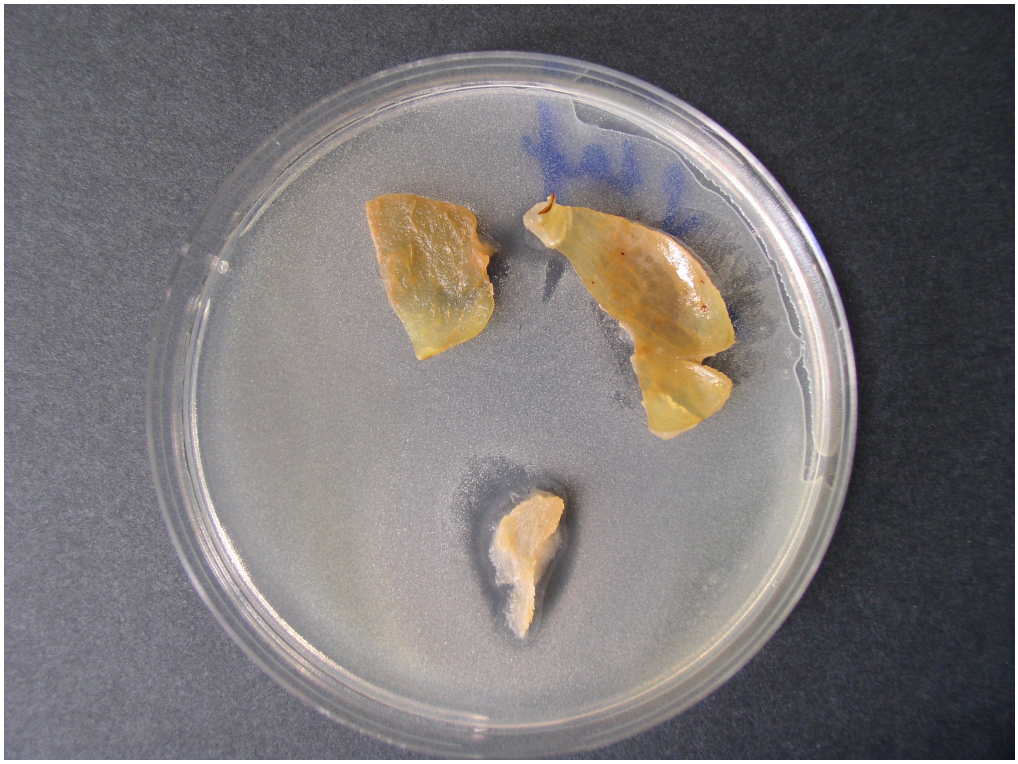
P 9. Antimikrobiální účinek banánu na *Staphylococcus aureus* (extrakce varem)



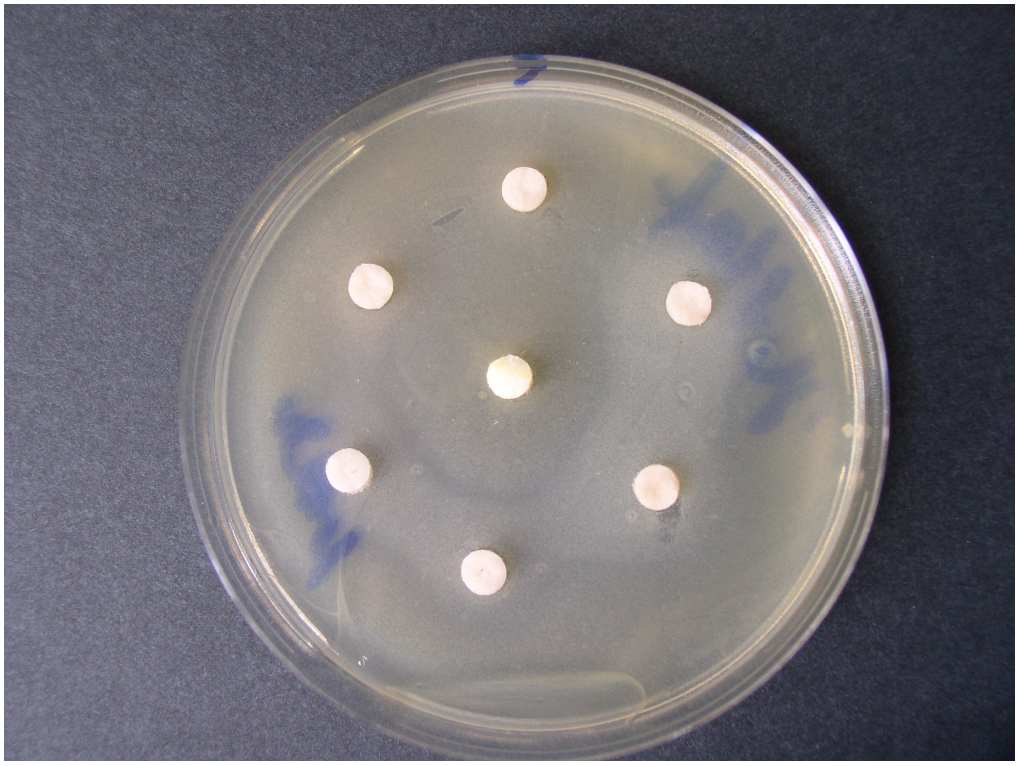
P 10. Antimikrobiální účinek banánu na *Staphylococcus aureus* (extrakce tlakem)



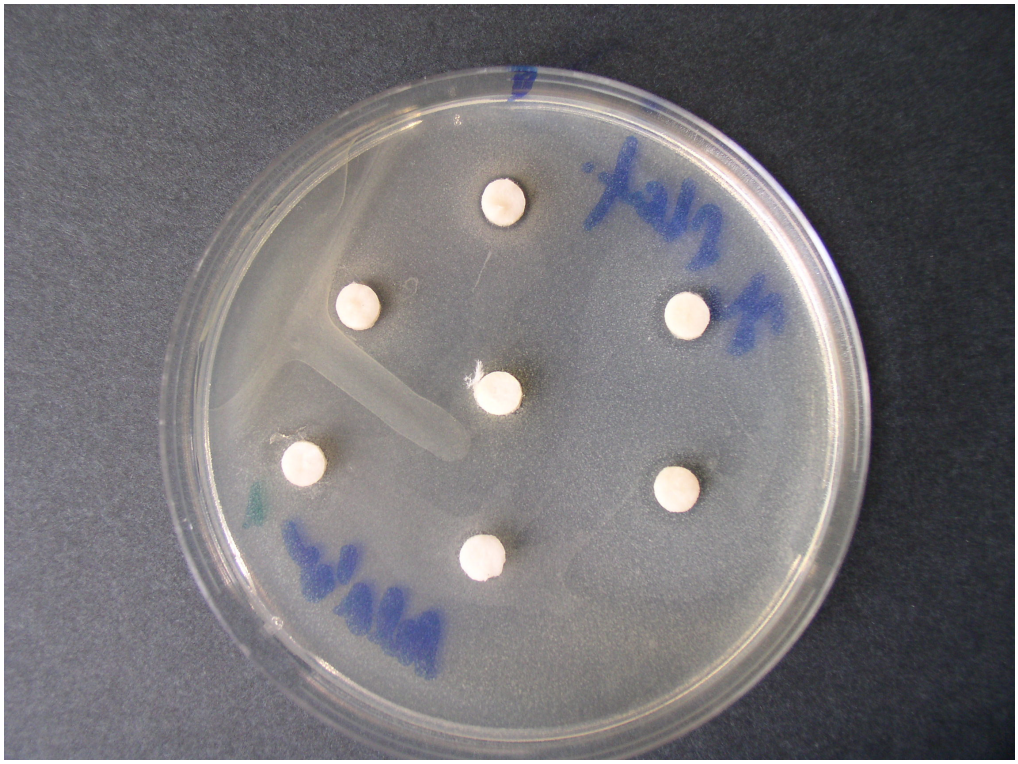
P 11. Antimikrobiální účinek banánu na *Staphylococcus aureus* (rub, líc, dužina)



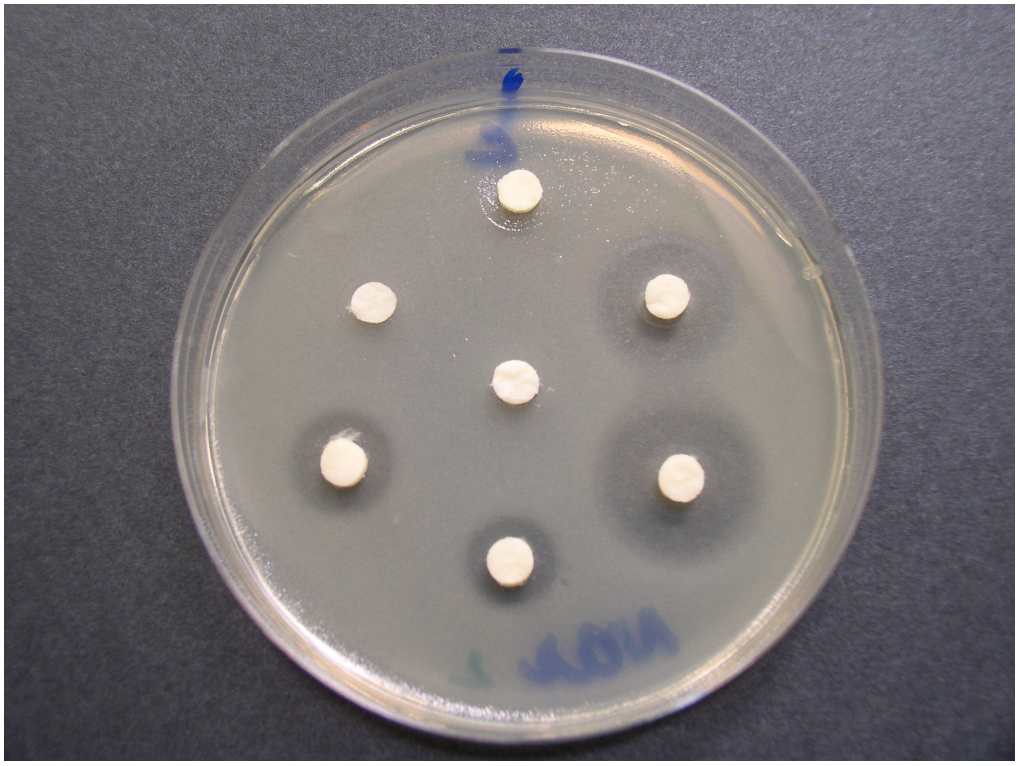
P 12. Antimikrobiální účinek hroznu na *Staphylococcus aureus* (rub, líc, dužina)



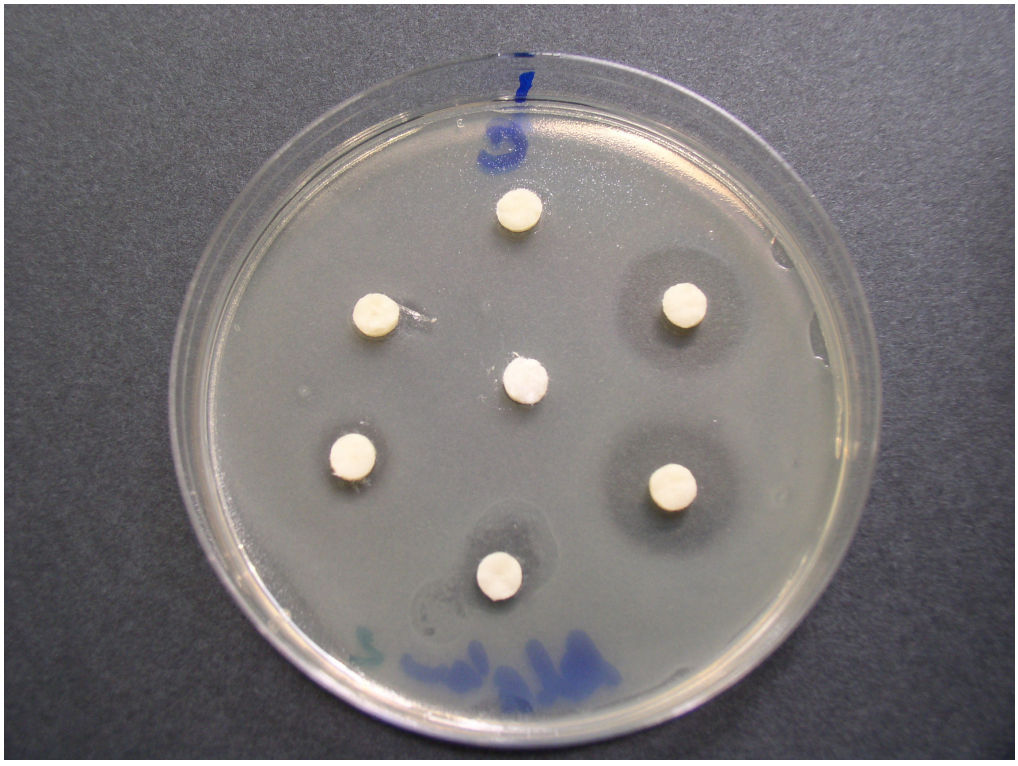
P 13. Antimikrobiální účinek hroznu na *Staphylococcus aureus* (extrakce varem)



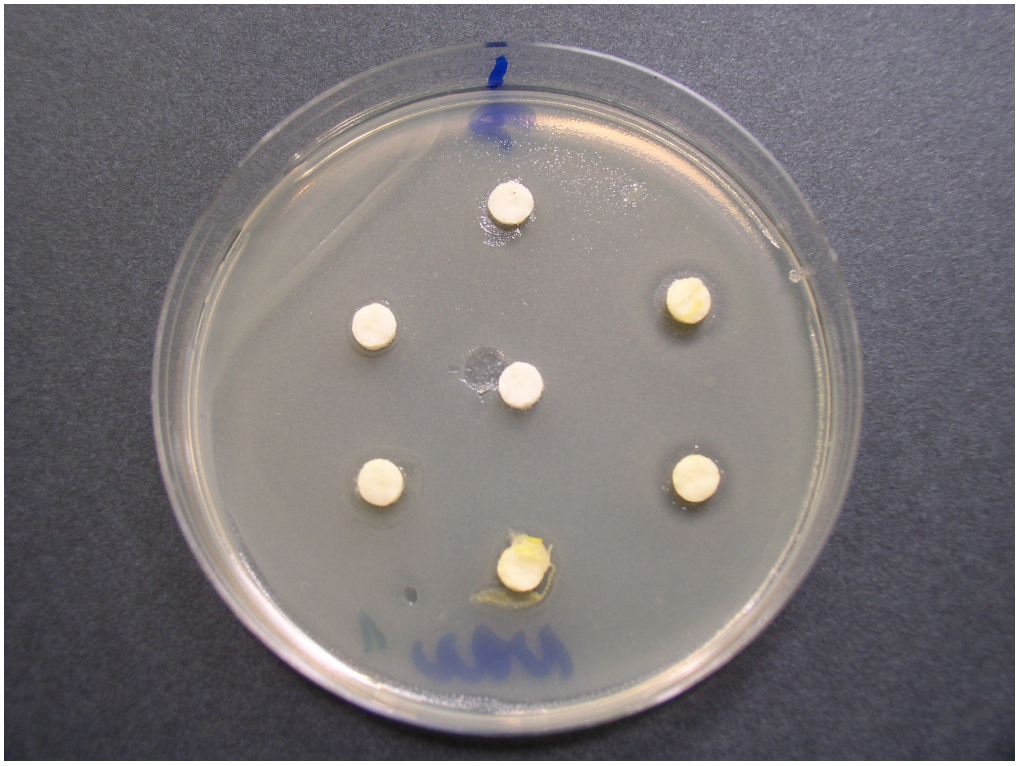
P 14. Antimikrobiální účinek hroznu na *Staphylococcus aureus* (extrakce tlakem)



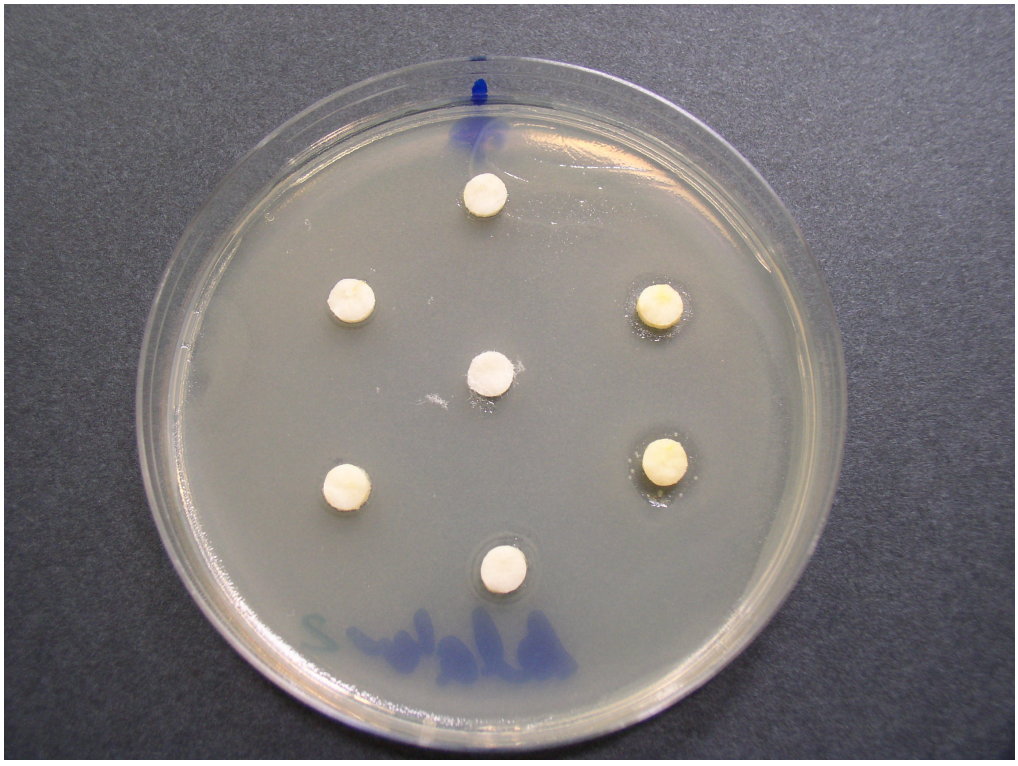
P 15. Antimikrobiální účinek citronu na *Escherichia coli* (extrakce varem)



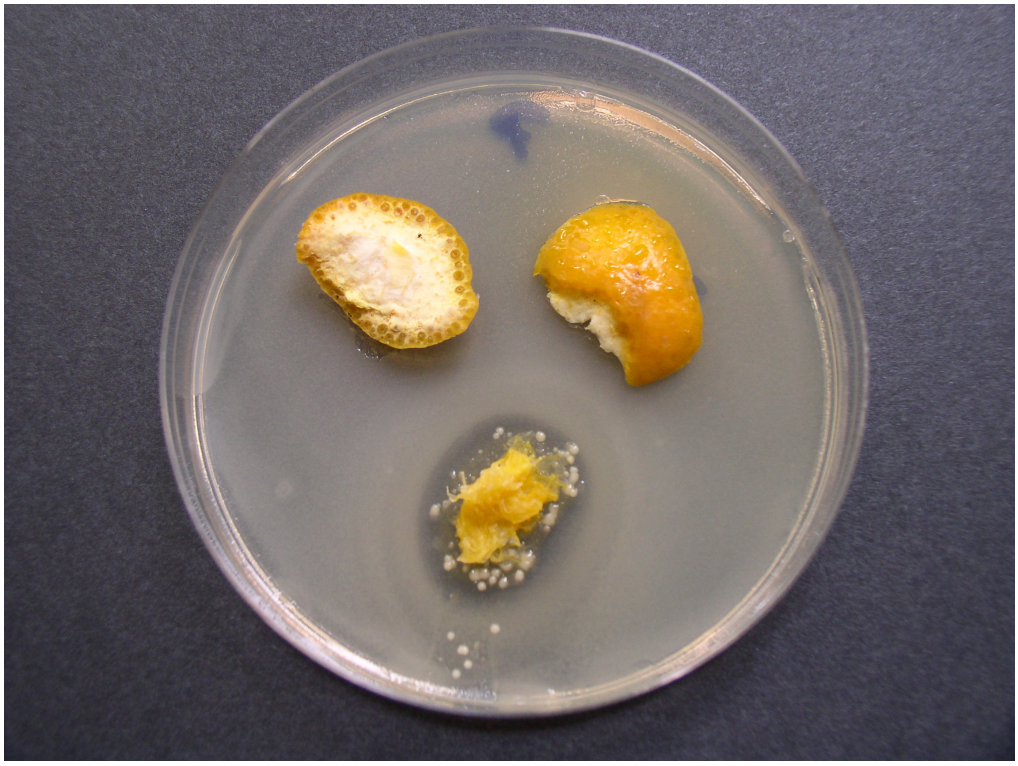
P 16. Antimikrobiální účinek citronu na *Escherichia coli* (extrakce tlakem)



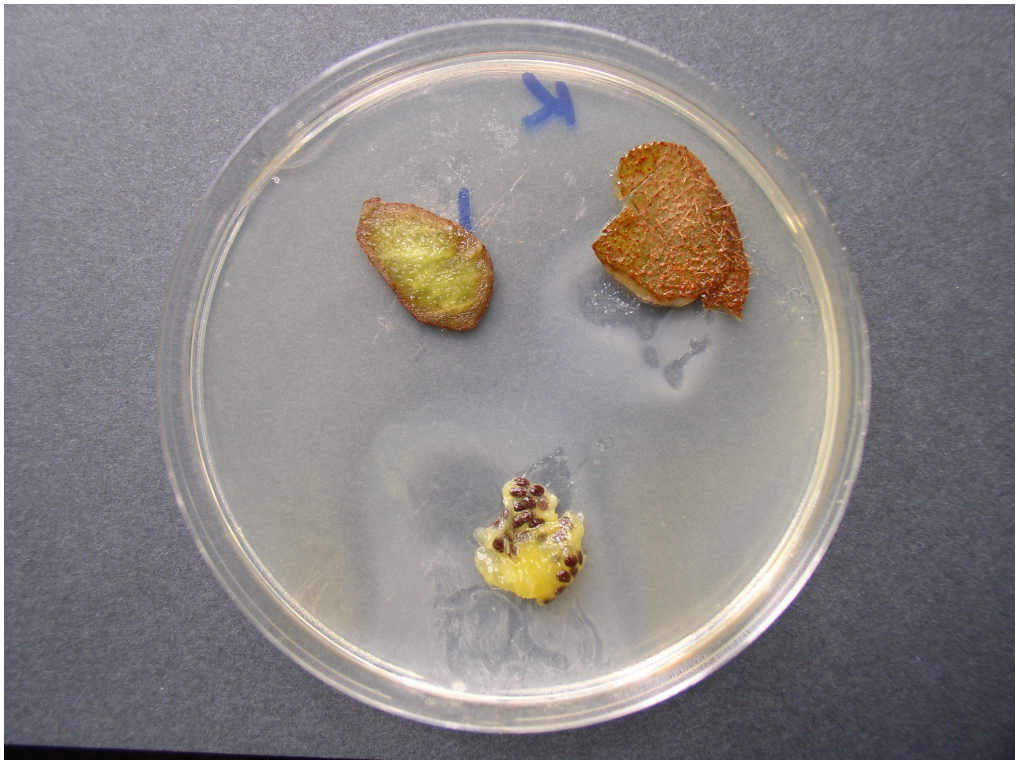
P 17. Antimikrobiální účinek pomeranče na *Escherichia coli* (extrakce varem)



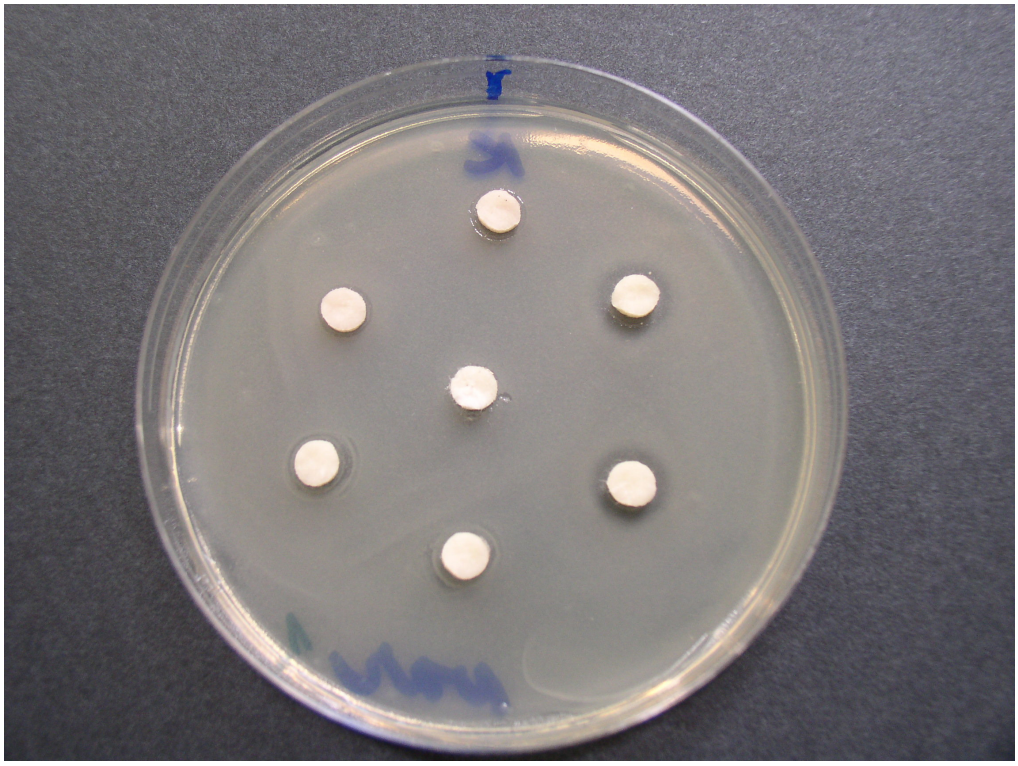
P 18. Antimikrobiální účinek pomeranče na *Escherichia coli* (extrakce tlakem)



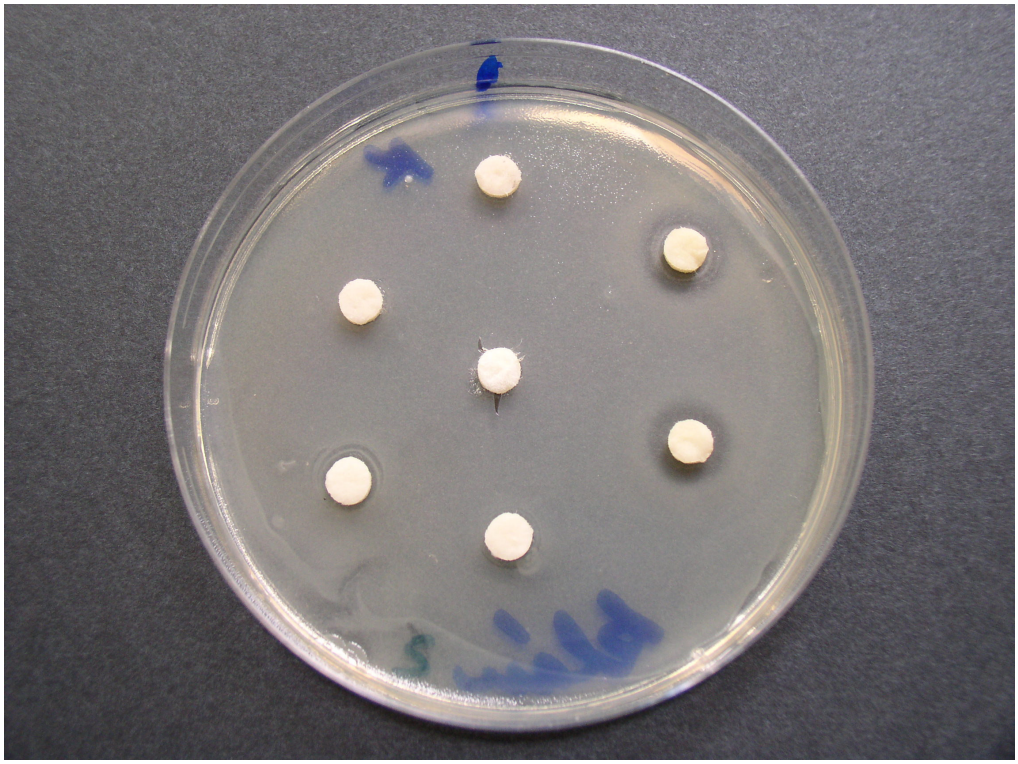
P 19. Antimikrobiální účinek pomeranče na *Escherichia coli* (rub, líc, dužina)



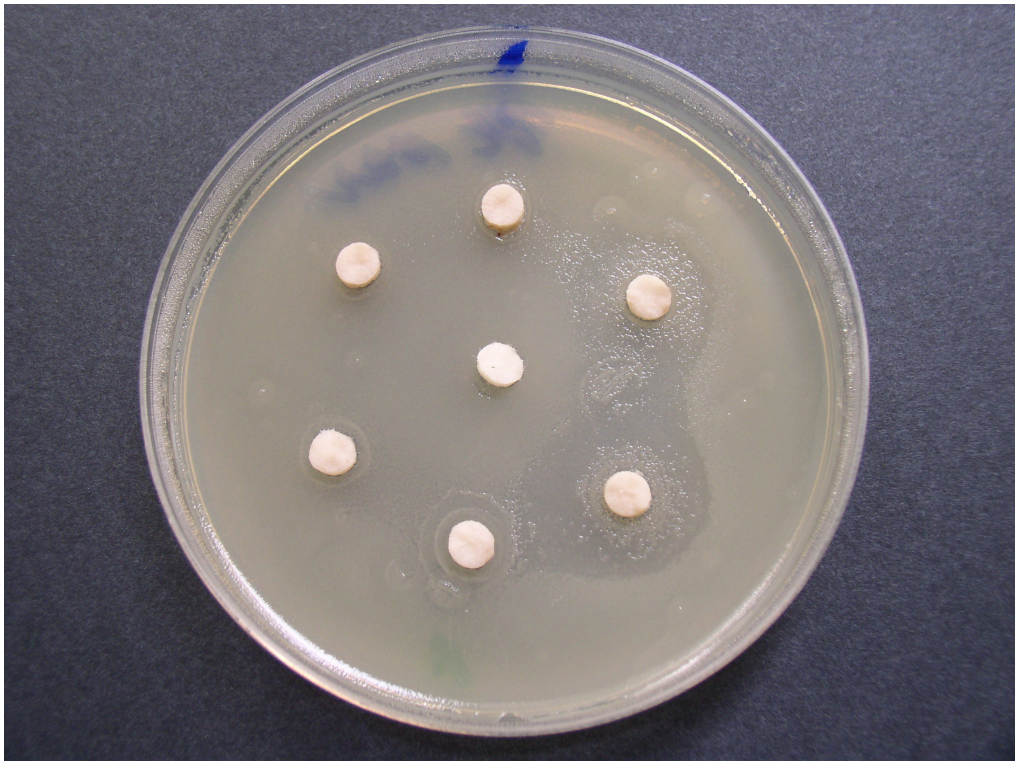
P 20. Antimikrobiální účinek kiwi na *Escherichia coli* (rub, líc, dužina)



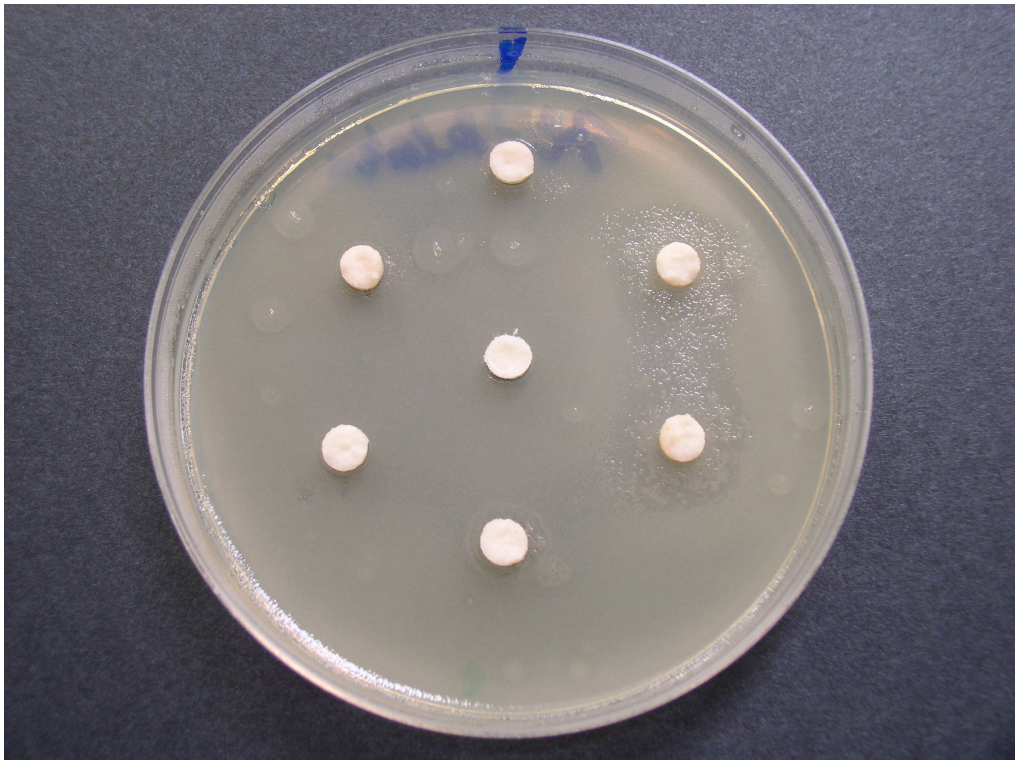
P 21. Antimikrobiální účinek kiwi na *Escherichia coli* (extrakce varem)



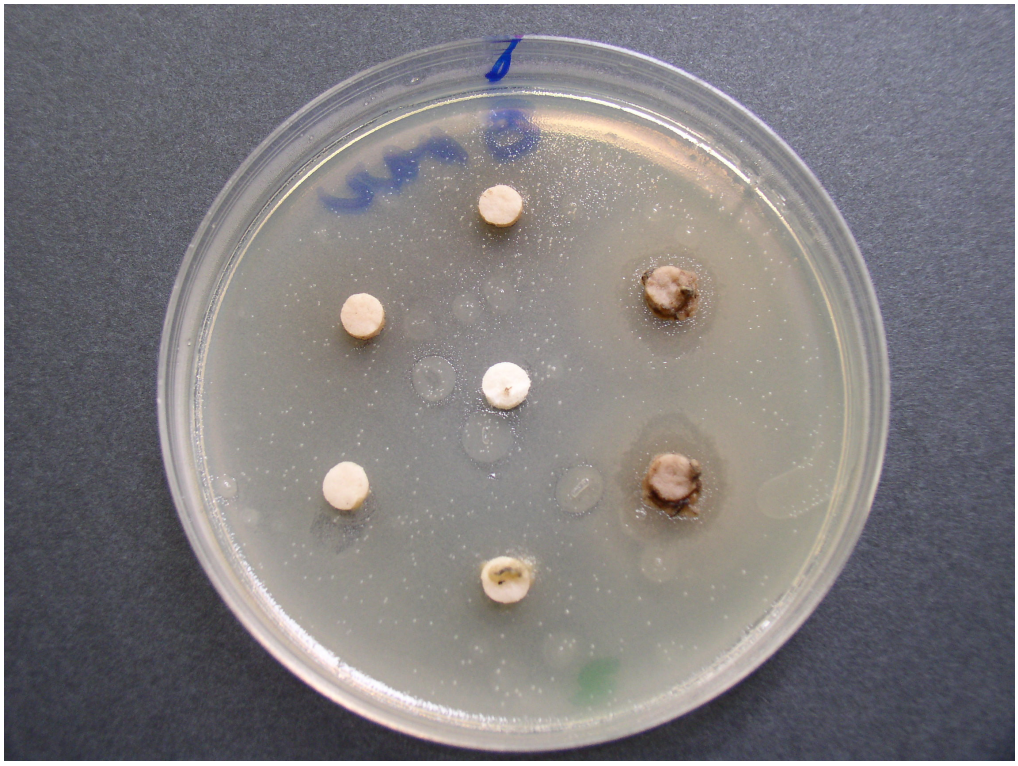
P 22. Antimikrobiální účinek kiwi na *Escherichia coli* (extrakce tlakem)



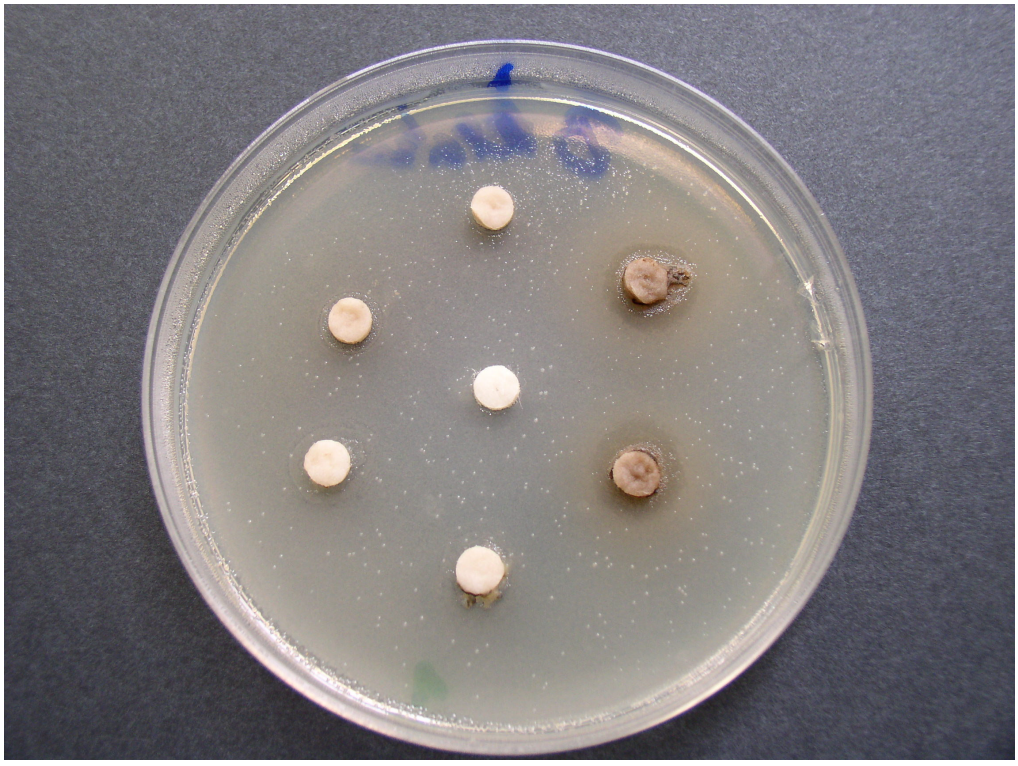
P 23. Antimikrobiální účinek hroznu na *Escherichia coli* (extrakce varem)



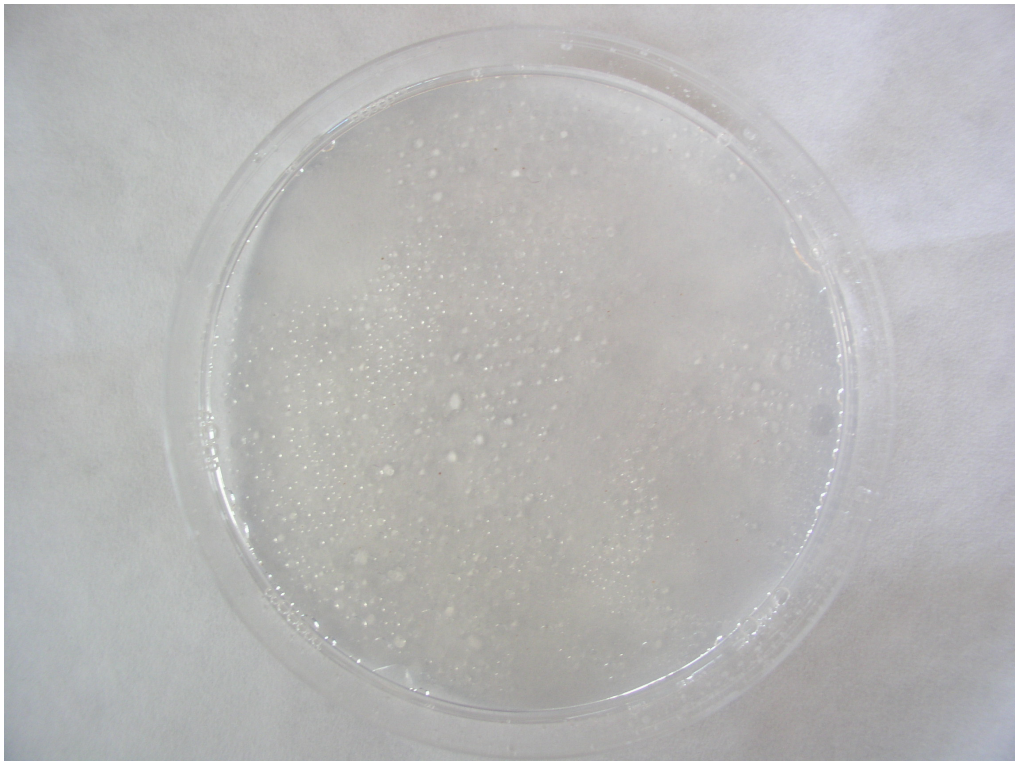
P 24. Antimikrobiální účinek hroznu na *Escherichia coli* (extrakce tlakem)



P 25. Antimikrobiální účinek banánu na *Escherichia coli* (extrakce varem)



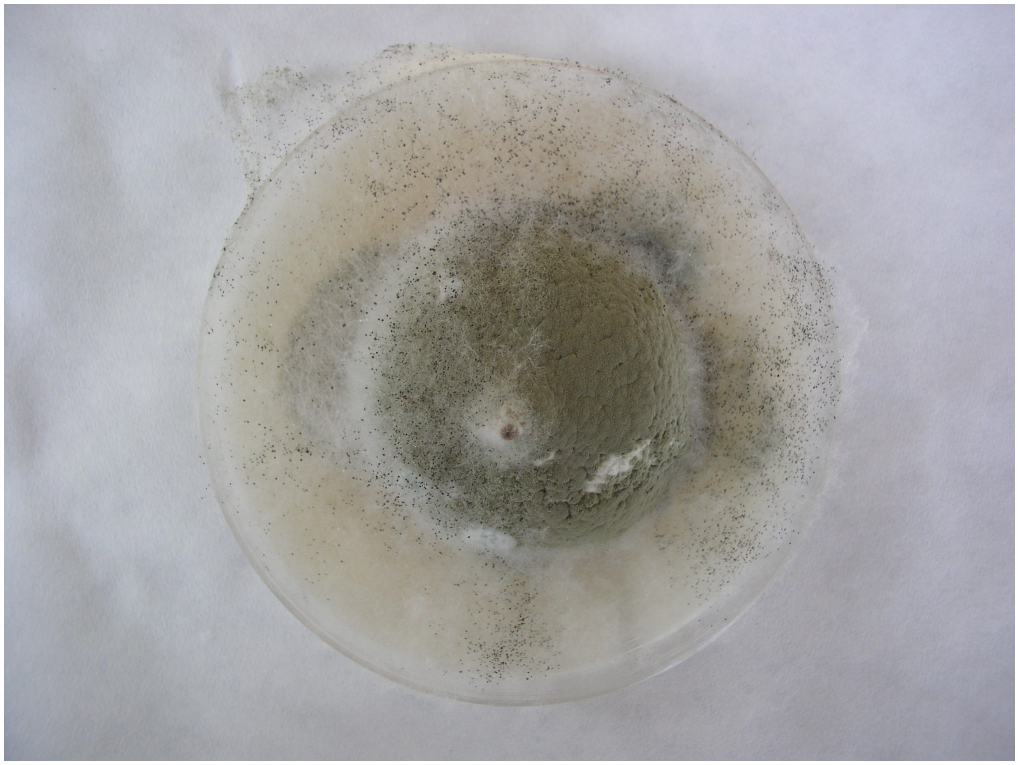
P 26. Antimikrobiální účinek banánu na *Escherichia coli* (extrakce tlakem)



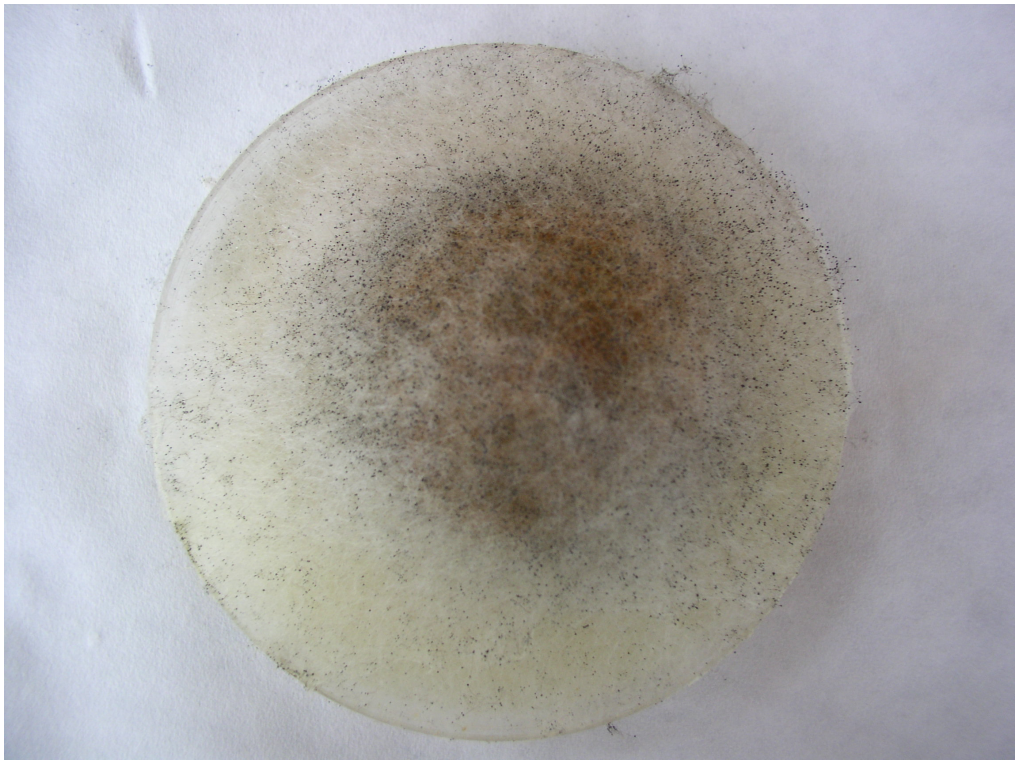
P 27. Účinek fungicidních přípravků na směs plísní (kontrolka)



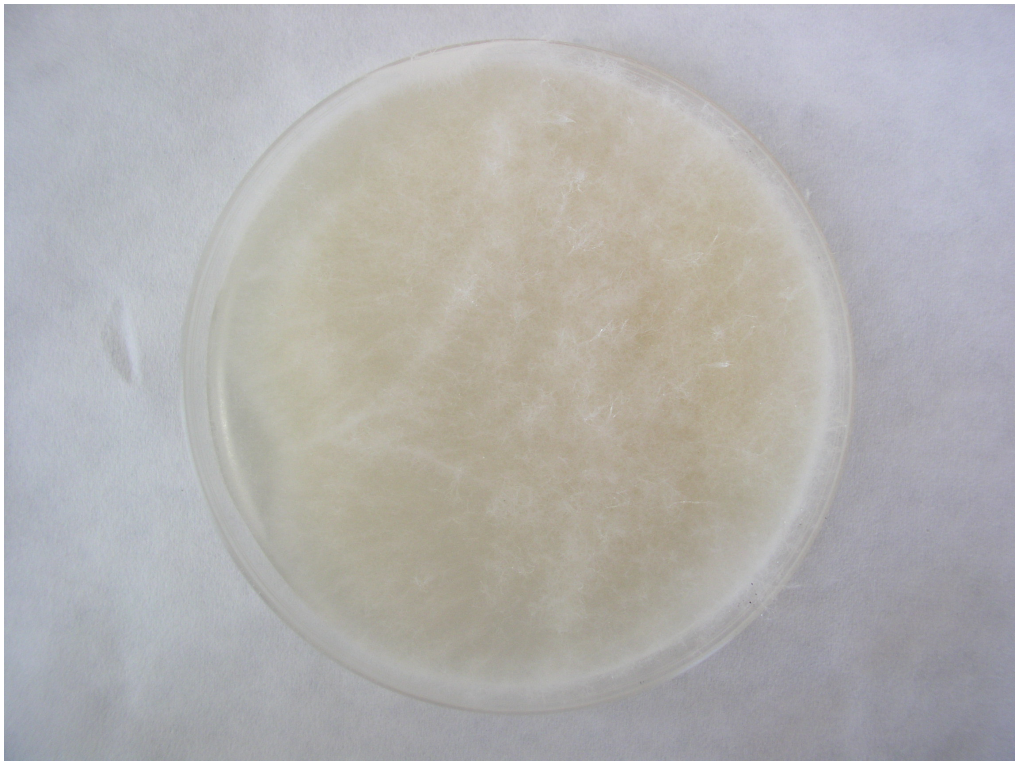
P 28. Účinek fungicidních přípravků na směs plísní (mandarinka) – kultivace na Chloramfenicol agar



P 29. Účinek fungicidních přípravků na směs plísní (citron) – kultivace na Chloramfenicol agar



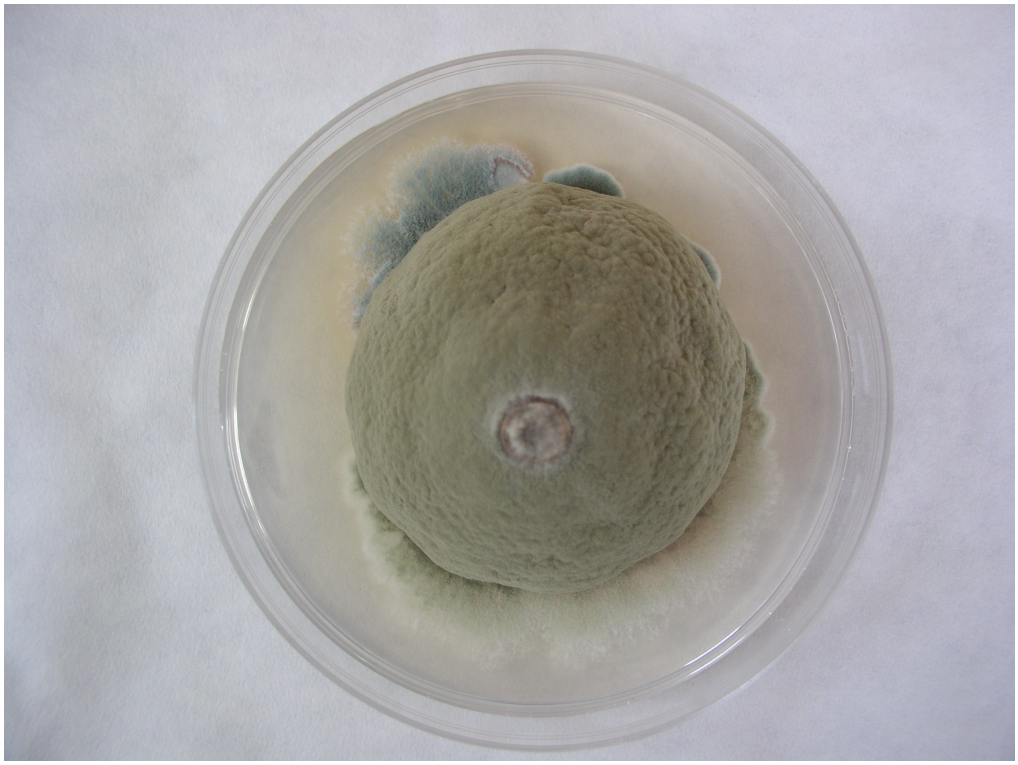
P 30. Účinek fungicidních přípravků na směs plísní (kiwi) – kultivace na Chloramfenicol agar



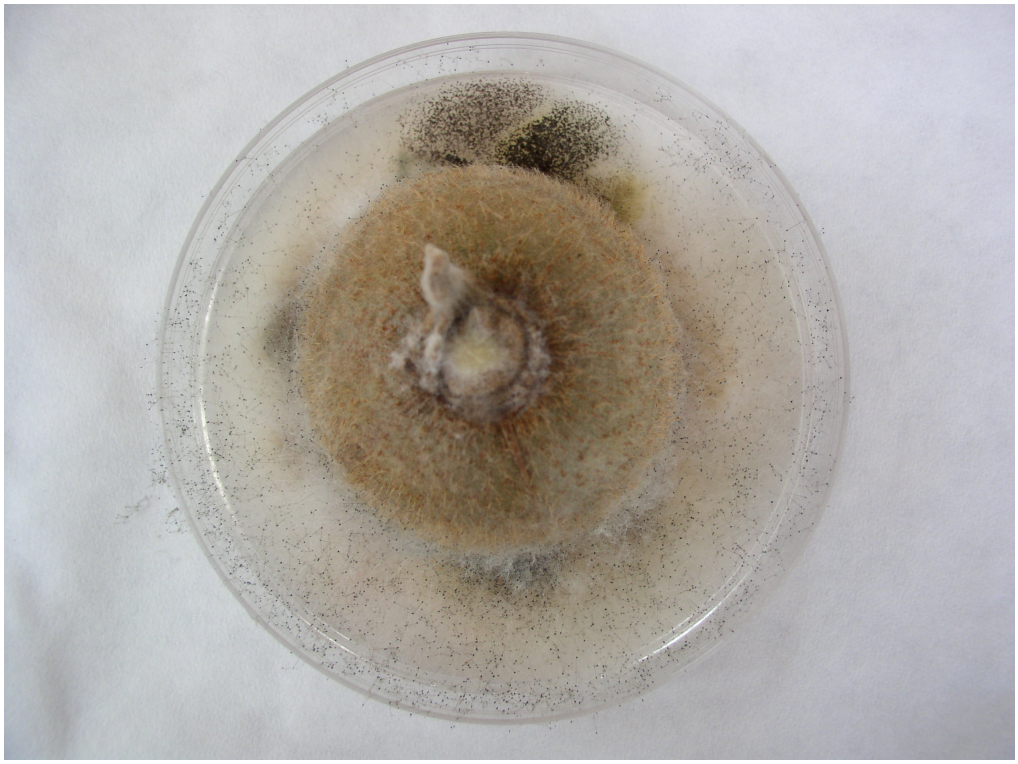
P 31. Účinek fungicidních přípravků na směs plísní – kultivace na Chloramfenicol agar



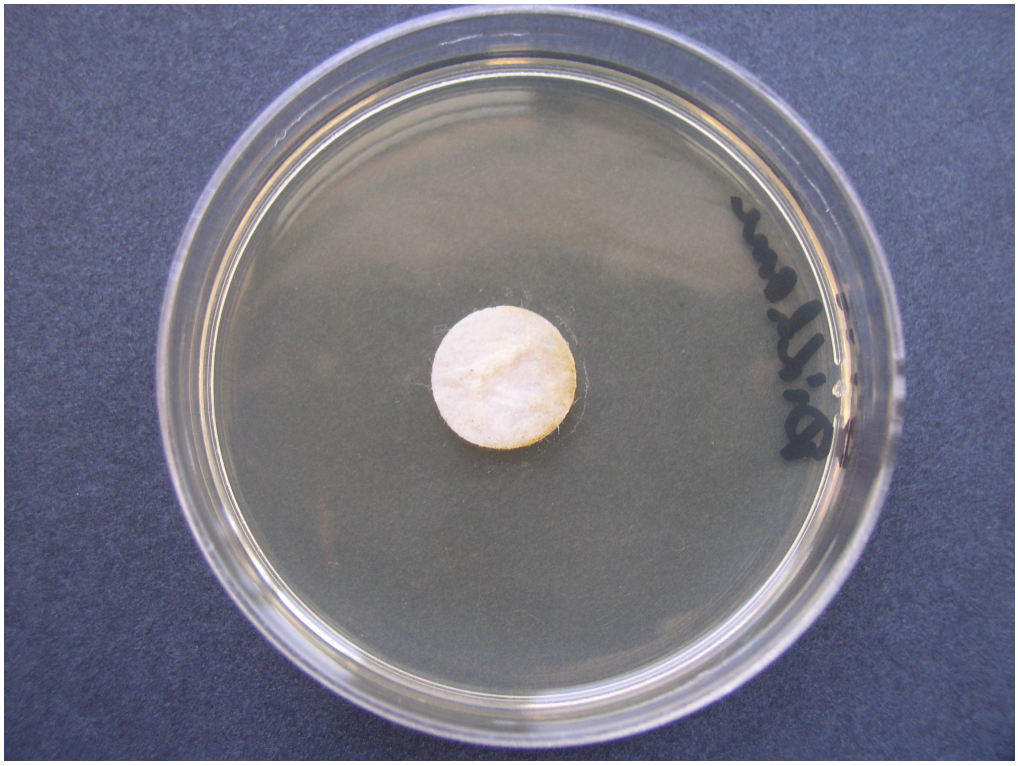
P 32. Účinek fungicidních přípravků na směs plísní (mandarinka) – kultivace na Minerální látky bez BTM



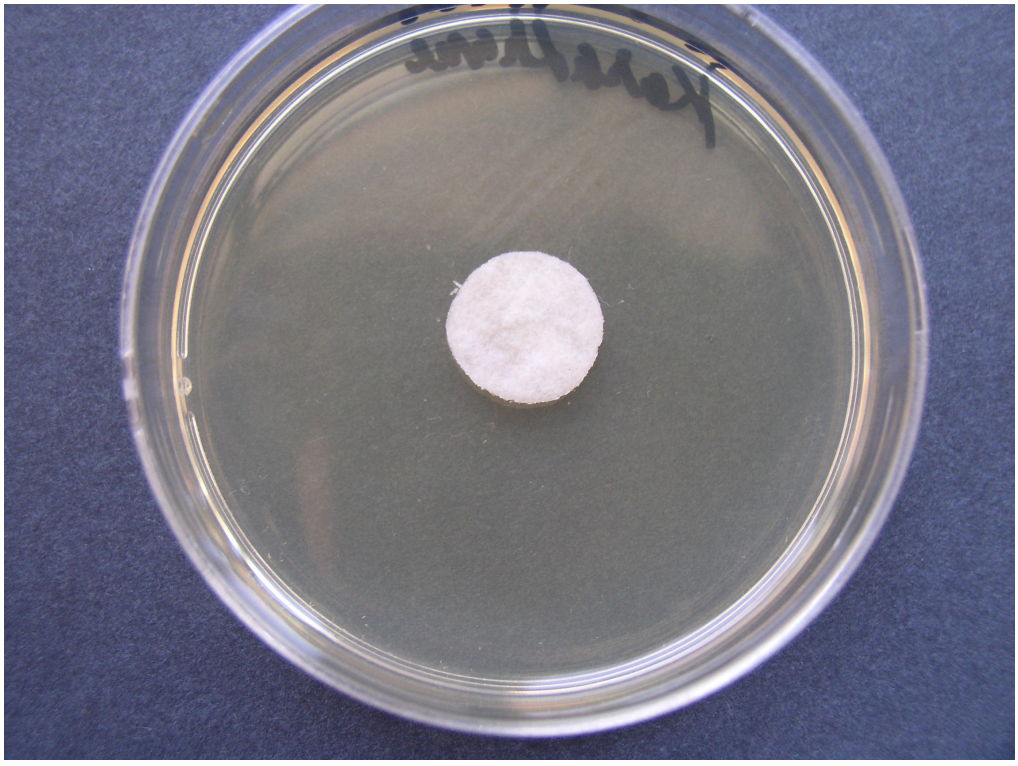
P 33. Účinek fungicidních přípravků na směs plísní (citron) – kultivace na Minerální látky bez BTM



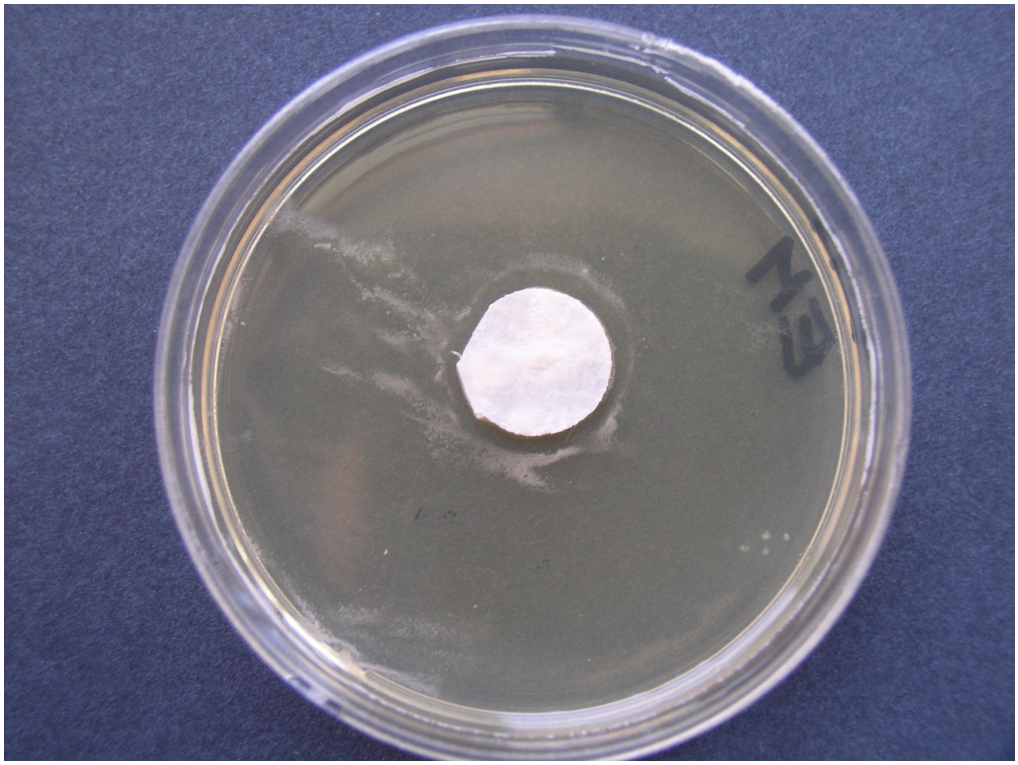
P 34. Účinek fungicidních přípravků na směs plísní (kiwi) – kultivace na Minerální látky bez BTM



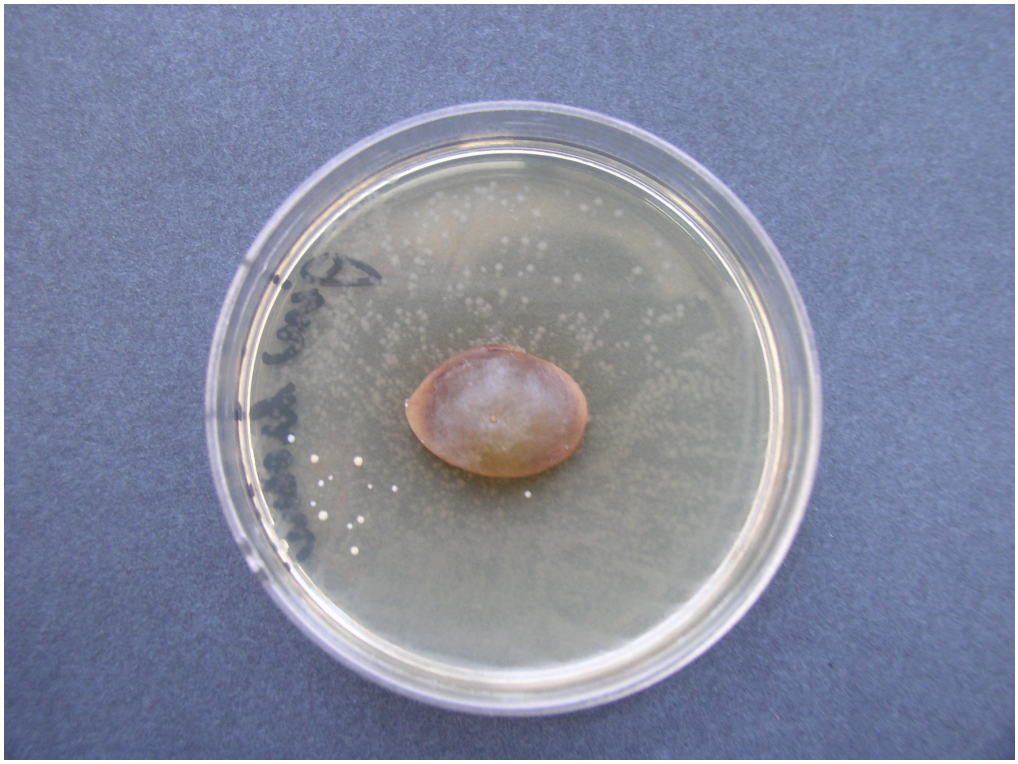
P 35. Účinek fungicidních přípravků (Dithane M 45) na *Lactobacilla*



P 36. Účinek fungicidních přípravků (KarathaneLC) na *Lactobacilla*



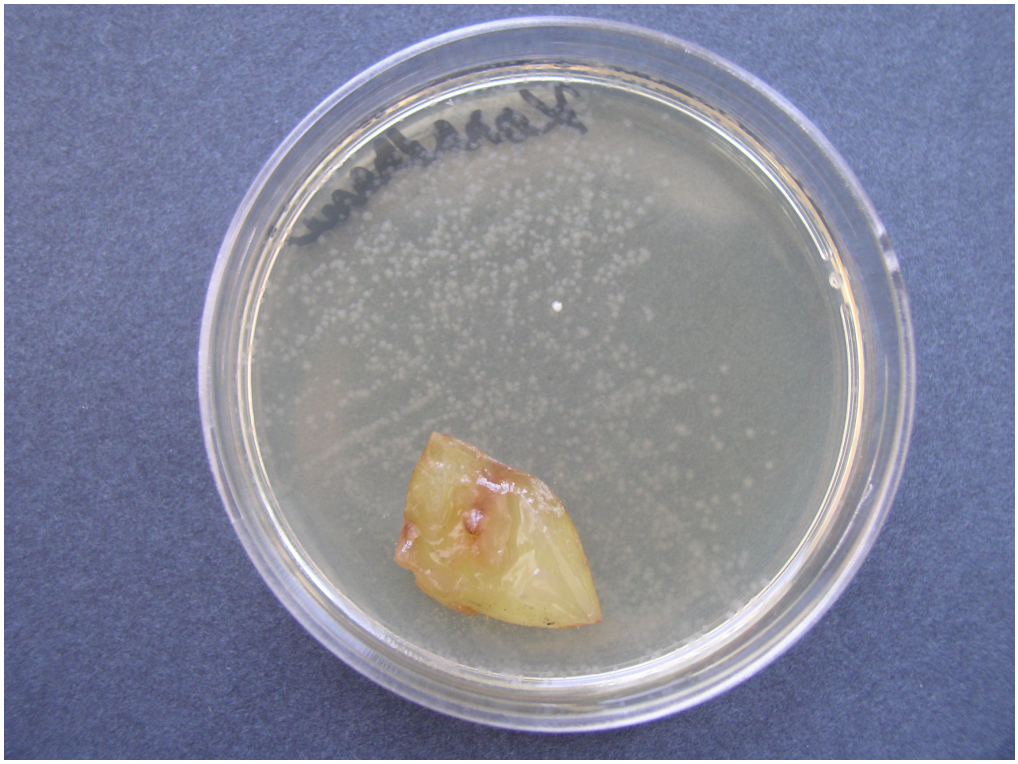
P 37. Účinek fungicidních přípravků (Euparen Multi) na *Lactobacilla*



P 38. Účinek samotného hroznu na *Lactobacilla*



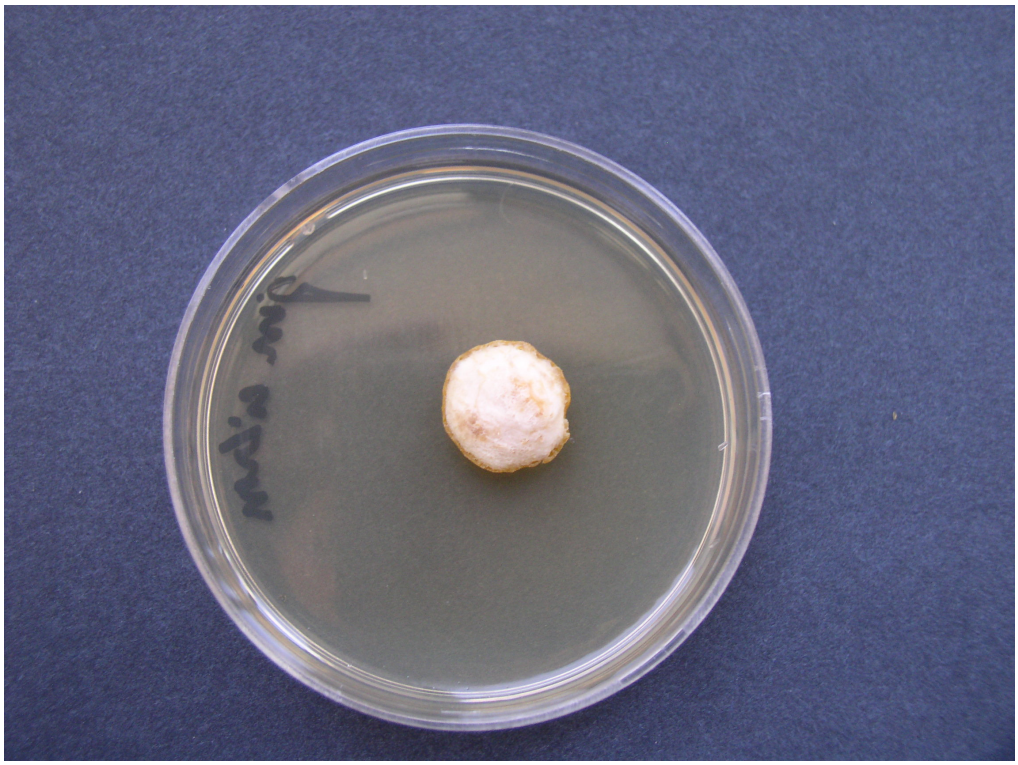
P 39. Účinek fungicidních přípravků (Dithane M 45) nastříkaných na hroznu na *Lactobacilla*



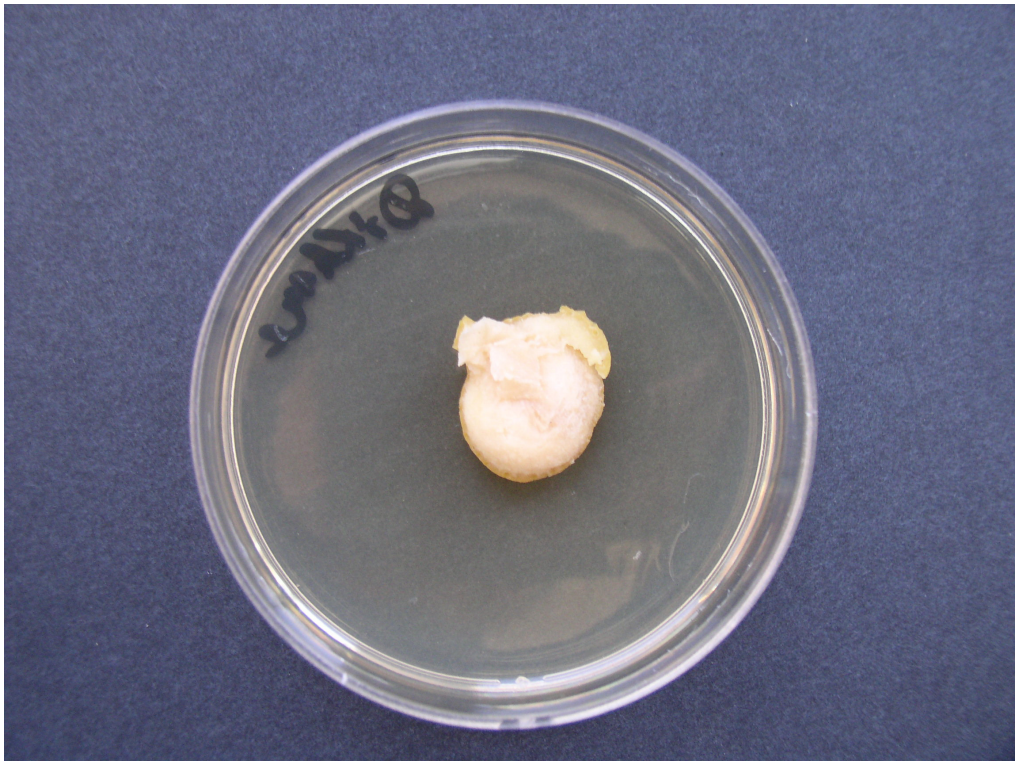
P 40. Účinek fungicidních přípravků (Karathane LC) nastříkaných na hroznu na *Lactobacilla*



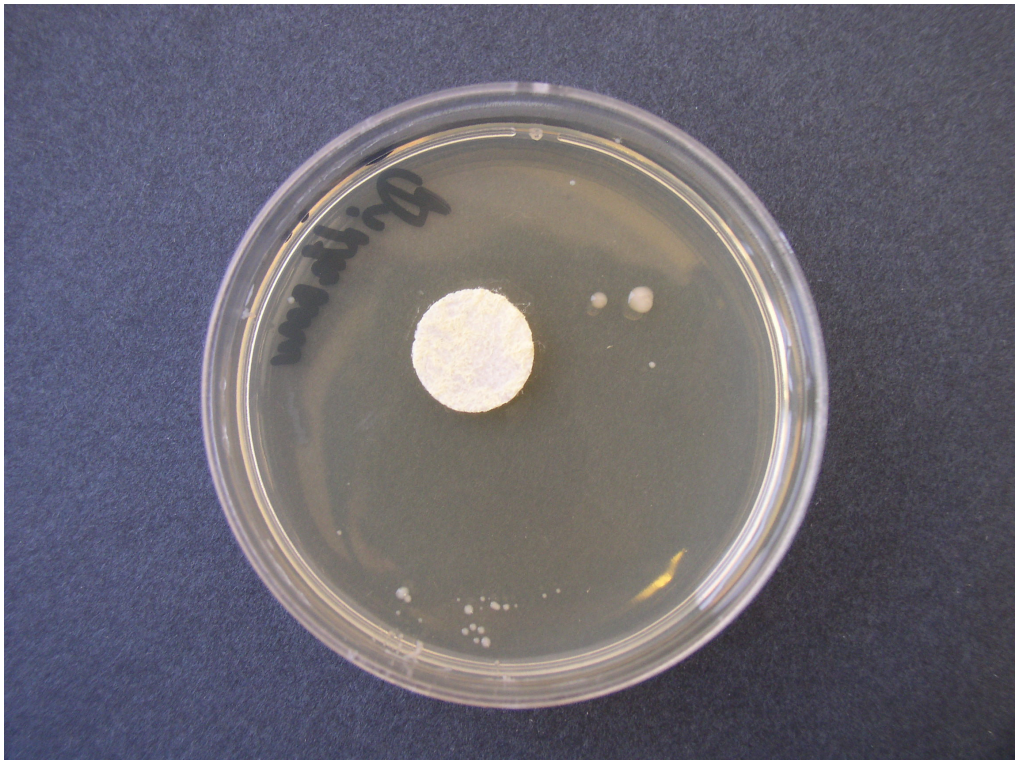
P 41. Účinek fungicidních přípravků (Euparen Multi) nastříkaných na hroznu na *Lactobacilla*



P 42. Účinek samotného citronu na *Lactobacilla*



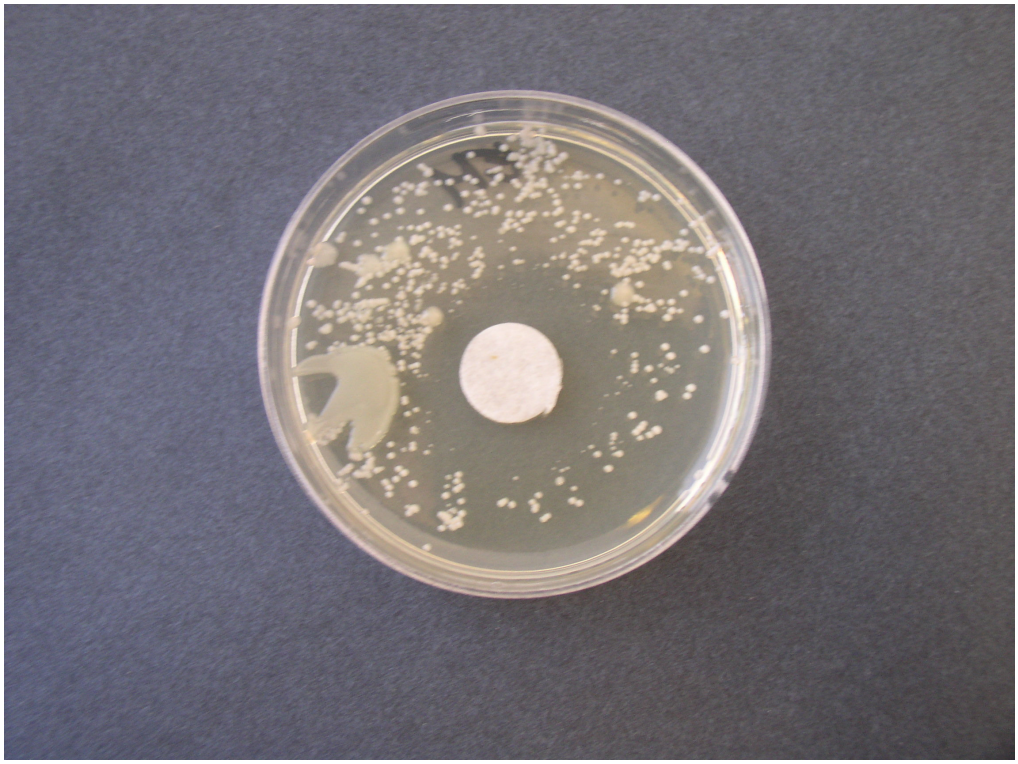
P 43. Účinek fungicidních přípravků (Dithane M 45) nastříkaných na citronu na *Lactobacilla*



P 44. Účinek fungicidních přípravků (Dithane M 45) na *Escherichia coli*



P 45. Účinek fungicidních přípravků (Karathane LC) na *Escherichia coli*



P 46. Účinek fungicidních přípravků (Euparen Multi) na *Escherichia coli*



P 47. Účinek samotného hroznu na *Escherichia coli*



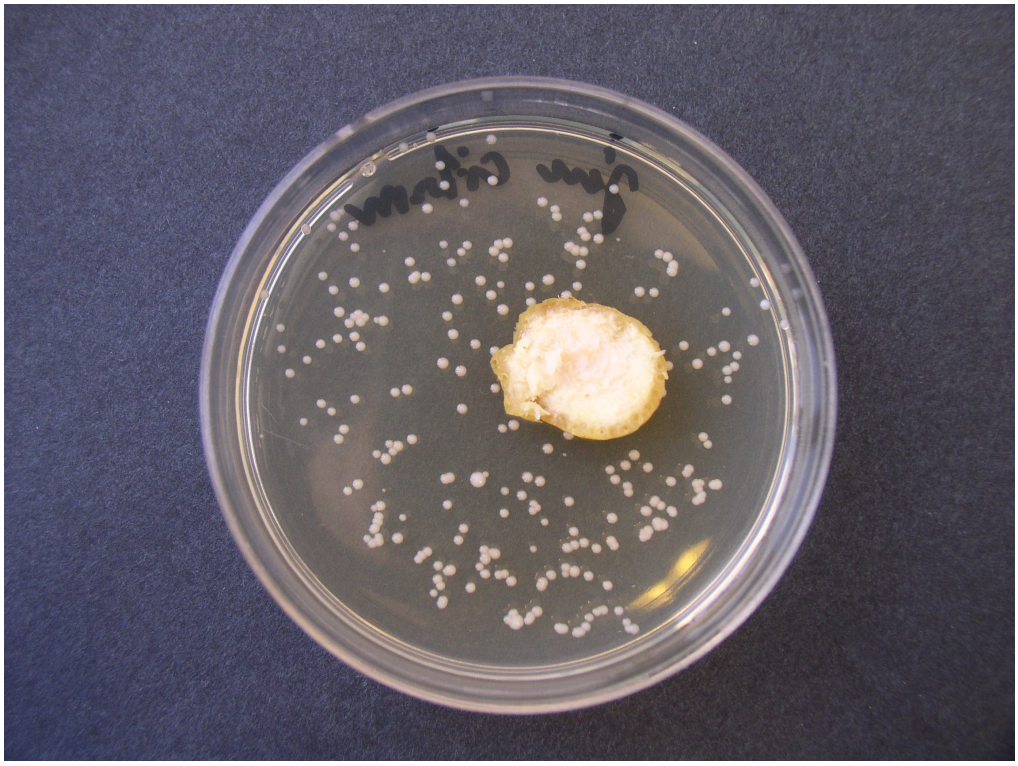
P 48. Účinek fungicidních přípravků (Dithane M 45) nastříkaných na hroznu na *Escherichia coli*



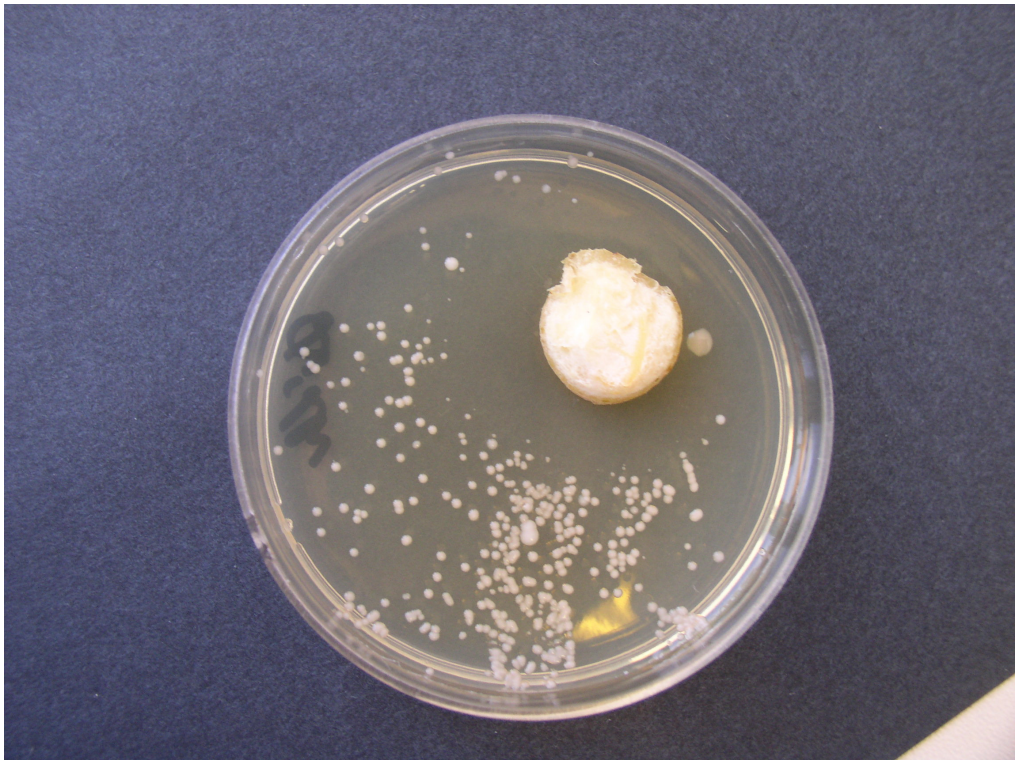
P 49. Účinek fungicidních přípravků (Karathane LC) nastříkaných na hroznu na *Escherichia coli*



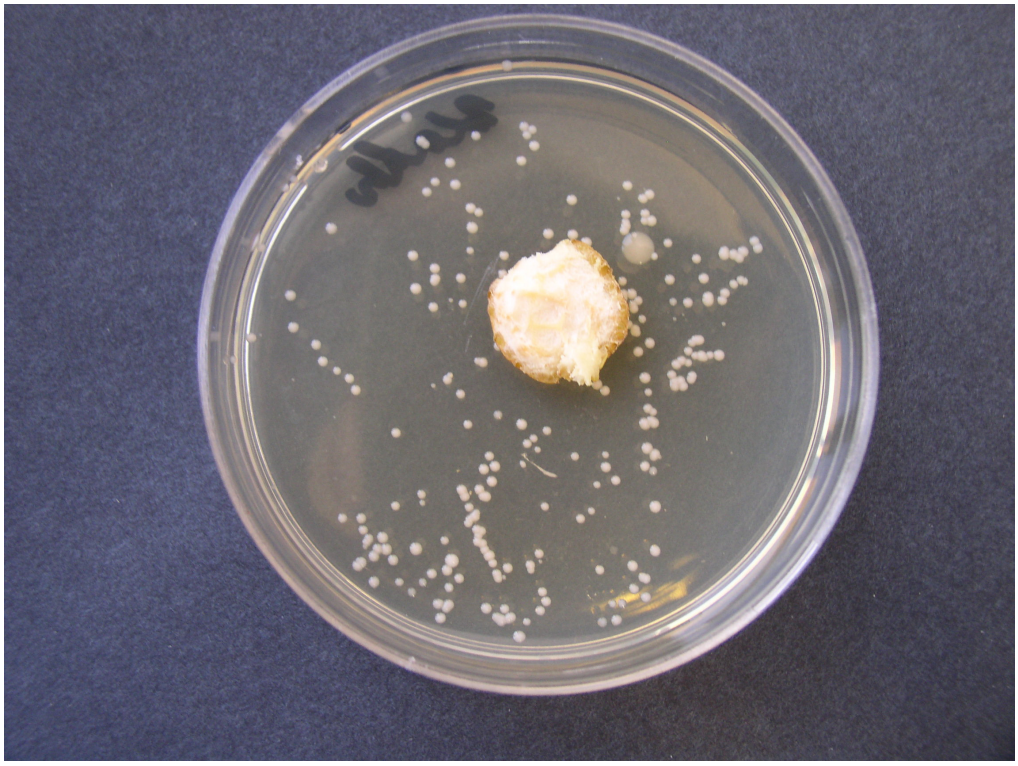
P 50. Účinek fungicidních přípravků (Euparen Multi) nastříkaných na hroznu na *Escherichia coli*



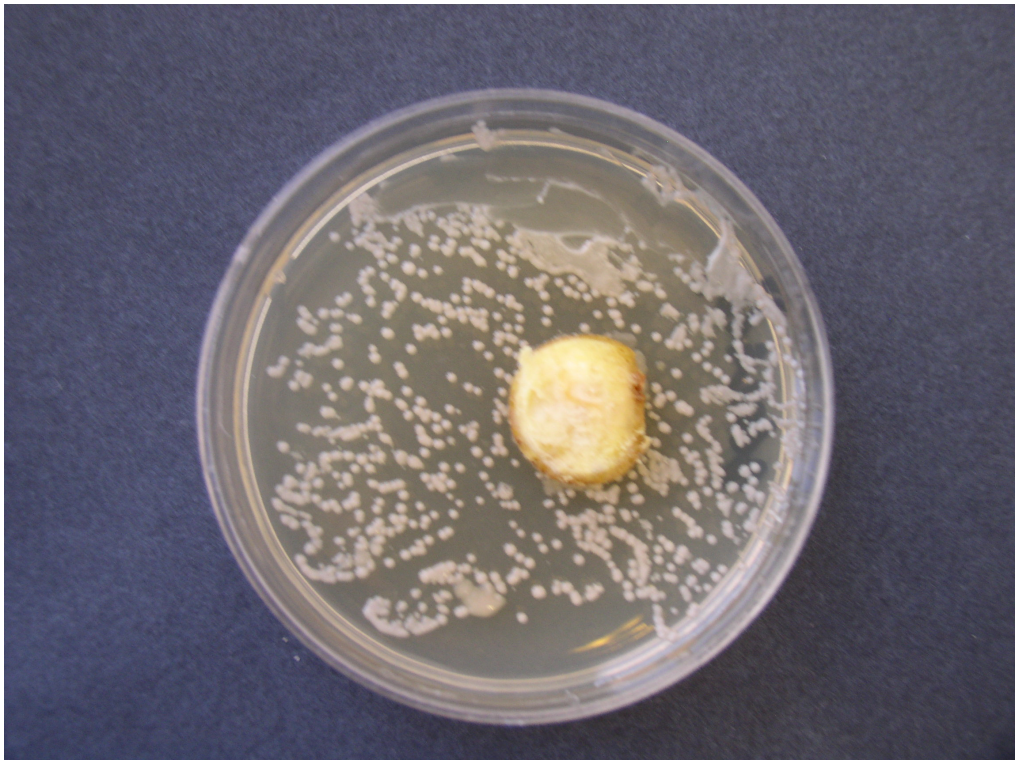
P 51. Účinek samotného citronu na *Escherichia coli*



P 52. Účinek fungicidních přípravků (Dithane M 45) nastříkaných na citronu na *Escherichia coli*



P 53. Účinek fungicidních přípravků (Karathane LC) nastříkaných na citronu na *Escherichia coli*



P 54. Účinek fungicidních přípravků (Euparen Multi) nastříkaných na citronu na *Escherichia coli*