

Bezpečnost potravin živočišného původu

Mikrobiologická analýza povrchu drůbežního masa a následná dekontaminace

Zuzana Molatová

Diplomová práce
2006

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství a chemie
akademický rok: 2005/2006

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zuzana MOLATOVÁ**
Studijní program: **M 6208 Ekonomika a management**
Studijní obor: **Ekonomika a hygiena výživy**

Téma práce: **Bezpečnost potravin živočišného původu –
Mikrobiologická analýza povrchu drůbežího masa
a následná dekontaminace**

Zásady pro vypracování:

- 1. Seznamte se s poznatky týkající se údržnosti drůbežího masa.**
- 2. V experimentální části sledujte antimikrobiální účinek kyseliny citrónové (samotné) a dále v kombinaci s kyselinou mléčnou na redukci počtu mikroorganismů (postupujte dle laboratorní diagnostiky SVS ČR, normy ČSN EN ISO 4833:2003, ČSN ISO 4832:1995 a ČSN ISO 7954:1994).**
- 3. Na základě výsledků z experimentální části zhodnoťte vliv použitých organických kyselin na celkový baktericidní obraz a posuďte jejich využitelnost v potravinářské praxi.**

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

dle doporučení vedoucího práce

Vedoucí diplomové práce:

prof. Ing. Pavel Březina, CSc.

Ústav potravinářského inženýrství a chemie

Datum zadání diplomové práce:

10. října 2005

Termín odevzdání diplomové práce:

31. května 2006

Ve Zlíně dne 20. dubna 2006


prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Tato práce byla zaměřena na testování účinku kyseliny citronové a její kombinace s kyselinou mléčnou na prodloužení údržnosti chlazené drůbeže. Vzorčky chlazené drůbeže byly ošetřeny roztokem kyseliny citronové (2, 4, 6, 8, 10hm.%) a nebo kombinací kyseliny citronové s kyselinou mléčnou a část vzorků byla ponechána bez ošetření (kontrolní vzorek). Vzorkování povrchu kůže bylo provedeno destruktivní metodou ihned po ošetření a následně pak každých 24 hodin až do vypršení data spotřeby uvedeného výrobcem. Byly sledovány celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů, indikátorová skupina koliformních bakterií, kvasinky a plísně. Výsledky experimentu dokazují, že aplikace roztoku organických kyselin vedla ve všech případech k potlačení mikrobiálního růstu a k prodloužení údržnosti chlazené drůbeže. Účinek byl zpravidla ještě výraznější při aplikaci většího množství roztoku. Antimikrobiální efekt obou organických kyselin je pravděpodobně způsoben nejen snížením hodnoty pH, ale i specificky nedisociovanou formou. Významný antimykotický účinek kyseliny citronové na mikroflóru povrchu kuřat nebyl prokázán.

Klíčová slova: mikrobiální dekontaminace, kyselina citronová, kyselina mléčná, drůbež, bezpečnost potravin

ABSTRACT

The aim of this work was to examine the effect of the treatment with citric acid alone and in combination with lactic acid on the shelf life of chilled poultry. Samples of chilled chickens were treated with various concentrations of organics acids (2, 4, 6, 8, 10% w/v) or untreated (control). Sampling of the skin of carcasses for microbiological analyses were carried out by an excision technique immediately after treatment and then every 24 hours till the end of shelf life. The samples were evaluated for total viable counts of aerobic mesophiles, coliform bacteria, yeasts and moulds. The results of experiments show that in all cases the application of organic acids inhibited the growth of microorganisms on the surface of carcasses and prolonged the shelf life. The antibacterial effect increased with increasing concentration and quantity of applied solutions. The antimicrobial effect of both organic acids is probably the result of a decrease in pH and a specific antimicrobial effect of the undissociated molecules. However, the bactericidal effect on the yeasts and moulds wasn't proved.

Keywords: microbial decontamination, citric acid, lactic acid, poultry, food safety

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych touto formou poděkovala všem, kteří mi byli s vyhotovením této diplomové práce významně nápomocni.

Děkuji svému vedoucímu diplomové práce Prof. Ing. Pavlu Březinovi, CSc. a konzultantovi Prof. Ing. Milanu Marounkovi, DrSc. za odborné vedení této práce. Velmi si také cením rad, připomínek a podpory, které se mi dostalo od Mgr. Magdy Janlíkové. Ing. Františkovi Buňkovi, Ph.D. jsem vděčná zejména za pomoc při statistickém vyhodnocování výsledků.

Nemohu rovněž opomenout poděkování všem členům Ústavu potravinářského inženýrství a chemie UTB ve Zlíně za jejich vstřícnost, pomoc a spolupráci v průběhu celého mého studia.

Zvláštní poděkování pak směřuji svému příteli, rodině a známým, kteří mi vždy byli chápavým a podnětným zázemím.

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem na celé diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala.

Ve Zlíně, 24. 05. 2006

.....

podpis diplomanta

OBSAH

OBSAH	6
ÚVOD.....	10
I. TEORETICKÁ ČÁST	12
1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	13
1.1 VLASTNOSTI, SLOŽENÍ A NUTRIČNÍ HODNOTA DRŮBEŽÍHO MASA	13
1.1.1 DRŮBEŽÍ SVALOVINA	13
1.1.2 KŮŽE DRŮBEŽE.....	13
1.1.3 VAZNOST A ÚDRŽNOST DRŮBEŽÍHO MASA	14
1.2 ZDROJE MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE DRŮBEŽE.....	14
1.2.1 ANALÝZA NEBEZPEČÍ JEDNOTLIVÝCH OPERACÍ PŘI JATEČNÍM ZPRACOVÁNÍ DRŮBEŽE.....	15
1.2.2 MIKROSKOPICKÁ ANALÝZA DŮVODŮ PEVNÉHO ZADRŽENÍ BAKTERIÍ NA KŮŽI DRŮBEŽE.....	17
1.3 MIKROBIOLOGICKÉ KONTAMINANTY.....	17
1.3.1 ČLENĚNÍ A CHARAKTERIZACE MIKROBIOLOGICKÝCH KONTAMINANTŮ V POTRAVINÁCH.....	18
1.3.2 MIKROBIOLOGICKÉ POŽADAVKY NA CHLAZENOU DRŮBEŽ	19
1.4 MIKROBIOLOGICKÉ KAŽENÍ DRŮBEŽÍHO MASA	20
1.4.1 ZÁKLADNÍ FORMY KAŽENÍ MASA.....	20
1.4.2 POVRCHOVÉ MIKROBIÁLNÍ KAŽENÍ DRŮBEŽÍHO MASA	20
1.4.3 MIKROORGANISMY SPOJENÉ S KAŽENÍM MASA.....	21
1.5 CHARAKTERISTIKA JEDNOTLIVÝCH PATOGENNÍCH A PODMÍNĚNĚ PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ VYSKYTUJÍCÍCH SE U DRŮBEŽE	21
1.5.1 GRAMNEGATIVNÍ FAKULTATIVNĚ ANAEROBNÍ TYČINKY.....	21
1.5.2 GRAMNEGATIVNÍ AEROBNÍ NEBO MIKROAEROFILNÍ ZAKŘIVENÉ BAKTERIE	24
1.5.3 GRAMPOZITIVNÍ FAKULTATIVNĚ ANAEROBNÍ NESPORULUJÍCÍ TYČKY	25
1.5.4 GRAMPOZITIVNÍ ANAEROBNÍ SPORULUJÍCÍ TYČKY.....	26
1.5.5 GRAMPOZITIVNÍ FAKULTATIVNĚ ANAEROBNÍ NESPORULUJÍCÍ KOKY	26

1.6	FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ RŮST MIKROORGANISMŮ	27
1.6.1	VLIV TEPLoty NA RŮST MIKROORGANISMŮ	28
1.6.2	VLIV HODNOTY pH NA RŮST MIKROORGANISMŮ.....	30
1.7	PŘÍDATNÉ LÁTKY V POTRAVINÁCH	31
1.7.1	HODNOCENÍ BEZPEČNOSTI ADITIV VE SVĚTĚ	31
1.7.2	HODNOCENÍ BEZPEČNOSTI ADITIV V EVROPĚ	31
1.7.3	ADITIVNÍ LÁTKY VE VZTAHU K LEGISLATIVĚ ČR.....	32
1.8	MOŽNOSTI DEKONTAMINACE	33
1.8.1	KOMBINACE ÚČINKU KONZERVAČNÍCH FAKTORŮ	33
1.8.2	KONZERVACE CHEMICKOU ÚPRAVOU POTRAVIN	34
1.8.3	KONZERVACE UMĚLÝM OKYSELOVÁNÍM.....	34
1.8.4	VLIV ORGANICKÝCH KYSELIN NA KYSELOST PROSTŘEDÍ.....	34
1.8.5	PRINCIP ÚČINKU ORGANICKÝCH KYSELIN	35
1.8.6	ZÁVISLOST ÚČINKU ORGANICKÝCH KYSELIN	35
1.8.7	MECHANISMY REZISTENCE.....	36
1.8.8	ADITIVNÍ EFEKT	37
1.9	ORGANICKÉ KYSELINY	38
1.9.1	KYSELINA CITRONOVÁ - CHARAKTERISTIKA.....	38
1.9.2	APLIKACE KYSELINY CITONOVÉ.....	39
1.9.3	KYSELINA MLÉČNÁ - CHARAKTERISTIKA	40
1.9.4	APLIKACE KYSELINY MLÉČNÉ.....	41
2	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	42
II.	PRAKTICKÁ ČÁST	43
3	MATERIÁL A METODIKA	44
3.1	SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ A LABORATORNÍCH PŘÍSTROJŮ	44
3.1.1	SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ, ROZTOKŮ, ŽIVNÝCH PŮD A STANDARDIZOVANÝCH TESTOVACÍCH SYSTÉMŮ	44
3.1.2	SEZNAM LABORATORNÍCH PŘÍSTROJŮ	44
3.2	PŮVOD A ÚPRAVA ANALYTICKÝCH VZORKŮ	45
3.3	PŘÍPRAVA A APLIKACE ORGANICKÝCH KYSELIN	45

3.4	MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA	45
3.4.1	ODBĚR VZORKŮ	46
3.4.2	STANOVENÍ CELKOVÉHO POČTU MIKROORGANISMŮ	47
3.4.3	STANOVENÍ POČTU KOLIFORMNÍCH BAKTERIÍ	47
3.4.4	STANOVENÍ POČTU KVASINEK A PLÍSNÍ	48
3.4.5	VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ	48
3.5	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ MIKROBIOLOGICKÝCH ROZBORŮ	48
3.6	CHEMICKÁ ANALÝZA	49
3.6.1	MĚŘENÍ PH	49
3.7	BAKTERIÁLNÍ IDENTIFIKACE	49
3.7.1	POUŽITÉ BIOCHEMICKÉ IDENTIFIKAČNÍ TESTY BAKTERIÍ	49
3.7.2	IDENTIFIKACE POMOCÍ STANDARDIZOVANÝCH TESTOVACÍCH SYSTÉMŮ	52
3.7.3	VYHODNOCENÍ BIOCHEMICKÝCH TESTŮ	54
4	VÝSLEDKY	55
4.1	ÚČINEK KYSELINY CITRONOVÉ	55
4.1.1	ÚČINEK KYSELINY CITRONOVÉ (APLIKOVANÉ MNOŽSTVÍ 15±2 ML)	55
4.1.2	ÚČINEK KYSELINY CITRONOVÉ (APLIKOVANÉ MNOŽSTVÍ 20±2 ML)	58
4.2	SLEDOVÁNÍ VLIVU SMĚSÍ ORGANICKÝCH KYSELIN - PILOTNÍ POKUS	61
4.2.1	SLEDOVÁNÍ VLIVU SMĚSÍ ORGANICKÝCH KYSELIN (APLIKOVANÉ MNOŽSTVÍ 15±2 ML)	61
4.2.2	SLEDOVÁNÍ VLIVU SMĚSÍ ORGANICKÝCH KYSELIN (APLIKOVANÉ MNOŽSTVÍ 20±2 ML)	64
4.3	VÝVOJ HODNOTY PH V ZÁVISLOTI NA DRUHU KYSELINY, JEJÍ KONCENTRACI A DOBĚ SKLADOVÁNÍ	68
4.3.1	VLIV KYSELINY CITRONOVÉ	68
4.3.2	VLIV SMĚSÍ ORGANICKÝCH KYSELIN	70
4.4	BAKTERIÁLNÍ IDENTIFIKACE	73
4.4.1	ENTEROTEST	75
4.4.2	NEFERMTEST	76
4.4.3	KVASINKY A PLÍSNĚ	78

5	DISKUSE	79
5.1	ÚČINEK KYSELINY CITRONOVÉ	79
5.1.1	ÚČINEK KYSELINY CITRONOVÉ NA AEROBNÍ MEZOFILNÍ MIKROORGANISMY	79
5.1.2	ÚČINEK KYSELINY CITRONOVÉ NA KOLIFORMNÍ BAKTERIE	80
5.1.3	ÚČINEK KYSELINY CITONOVÉ NA KVASINKY A PLÍSNĚ	81
5.2	ÚČINEK SMĚSÍ ORGANICKÝCH KYSELIN	82
5.2.1	ÚČINEK SMĚSÍ ORGANICKÝCH KYSELIN NA AEROBNÍ MEZOFILNÍ MIKROORGANISMY	82
5.2.2	ÚČINEK SMĚSI ORGANICKÝCH KYSELIN NA KOLIFORMNÍ BAKTERIE	83
5.2.3	ÚČINEK SMĚSI ORGANICKÝCH KYSELIN NA KVASINKY A PLÍSNĚ	84
5.3	VÝVOJ HODNOTY PH V ZÁVISLOTI NA DRUHU KYSELINY, JEJÍ KONCENTRACI A DOBĚ SKLADOVÁNÍ	85
5.4	BAKTERIÁLNÍ IDENTIFIKACE	87
	ZÁVĚR.....	90
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	92
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	100
	SEZNAM OBRÁZKŮ	100
	SEZNAM TABULEK.....	105
	SEZNAM PŘÍLOH.....	108

ÚVOD

Bezpečnost potravin je oblastí vysoké priority zájmu a jsou prováděna nejrůznější opatření k jejich zabezpečení a to nejen v Evropské unii, ale také v České republice. Vysoká důvěra spotřebitele v bezpečnost potravin je cílem, pro jehož dosažení je realizován celý komplex opatření.

Důvodů proč je oblast bezpečnosti a kvality potravin věnována nadstandardní pozornost, je několik. Značně se rozšířil okruh výrobců potravin a spektrum nabídky potravinářských výrobků. Mění se způsoby distribuce potravin. Zvyšuje se podíl prodeje prostřednictvím supermarketů a cesta od výrobce ke konzumentovi je delší. Konzument nakupuje relativně větší zásoby potravin na delší dobu. Zároveň s tímto vývojem postupuje i vědecké poznání odhalující rizika konzumace určitých druhů potravin. To vše zesiluje tlak na produkci potravin s prodlouženou dobou údržnosti včetně zajištění jejich zdravotní a hygienické nezávadnosti.

V souvislosti s tím je oblast kontroly, bezpečnosti a kvality potravin regulována celou řadou norem, vyhlášek a nařízení. Jedním z nich je nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1831/2003 ze dne 22. září 2003, o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat [52]. Součástí nařízení je zákaz používání antibiotických stimulatorů růstu, které v odvětví produkce a zpracování živočišných produktů nabylo účinnosti 1. ledna 2006. Vedlo k tomu zejména nadměrné užívání antibiotik k posílení růstu hospodářských zvířat, což nepřímo zapříčinilo stoupající resistenci některých mikrobů, jež se následně dostávali do potravin živočišného původu a do lidského organismu, kde způsobovali rezistenci vůči antibiotikům podávaným v humánní medicíně. Na druhou stranu, toto nařízení s sebou přináší riziko vzniku infekčních onemocnění po požití masa primárně kontaminovaného patogeny. Je tedy nutné klást důraz na vývoj a aplikaci různých systémů preventivní povahy s cílem zajistit bezpečnost potravin od počátku jejího vzniku až po okamžik spotřeby.

K zajištění tohoto cíle se používá řada mechanismů, především zvýšená hygienická úroveň jatečního zpracování, kontinuita výroby, dodržení chladírenského řetězce a různé způsoby balení. Nedílnou součástí jsou i prvky cíleně zaměřené na snižování mikrobiologického rizika.

Kontaminace jatečně upravených těl se týká především povrchu, kam se mikroorganismy dostávají během jatečního opracování. Pokud se sníží tato prvotní povrchová kontaminace a zabrání se dalšímu znečišťování masa, může se značně prodloužit jeho údržnost, omezit ztráty v důsledku zkázy masa a v neposlední řadě i zvýšit zdravotní nezávadnost masa.

Pro prodloužení údržnosti a zlepšení výrobní jistoty byla v posledních letech navržena a vyzkoušena řada aditiv. Současný spotřebitel si ale žádá výrobek nejen s dostatečně dlouhou dobou trvanlivosti, ale zároveň požaduje, aby při jeho výrobě bylo použito co nejméně chemických přísad a byly zachovány organoleptické a nutriční vlastnosti potraviny. Nejen tyto požadavky přispěly k orientaci výzkumu zejména na přirozeně se vyskytující látky s antimikrobiálním účinkem, kde mezi perspektivní kandidáty patří organické kyseliny. Inhibice bakteriálního růstu je způsobena potlačením základních metabolických reakcí a zátěží na intracelulární homeostázu pH.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

1.1 VLASTNOSTI, SLOŽENÍ A NUTRIČNÍ HODNOTA DRŮBEŽÍHO MASA

Pro intenzivní produkci drůbežího masa jsou vyšlechtěny masné typy drůbeže, tzv. masní hybridy. Základními složkami masa drůbeže jsou voda, bílkoviny a lipidy (viz. Tab. 1). Dále maso obsahuje nebílkovinné extraktivní dusíkaté látky, extraktivní bezdusíkaté látky, vitamíny, minerální látky, sacharidy, organické kyseliny aj. [66].

Tab. 1. Základní chemické složení masa drůbeže – kuře [49]

Druh masa	Voda [g.100g ⁻¹]	Bílkoviny [g.100g ⁻¹]	Tuk [g.100g ⁻¹]	Popel [g.100g ⁻¹]	Energetická hodnota [kJ.100g ⁻¹]
kuře s kůží	74,64	22,20	2,05	1,09	449
kuře bez kůže	68,23	18,67	12,02	1,07	765

1.1.1 DRŮBEŽÍ SVALOVINA

Základem lidského konzumu je především svalovina kosterní – příčně pruhovaná, včetně kůže [65]. Hlavními masitými částmi drůbeže jsou svaly hrudi, stehna a lýtka. Svalovina drůbeže je v oblasti křídel a hrudních svalů bledé, světle růžové a po tepelné úpravě až bílé barvy, je tvořena převahou rovnoměrně rozložených svalových vláken, která převládají nad sarkoplazmou [75]. Bílá svalová vlákna jsou tlustší než červená, obsahují více bílkovin, více glykogenu, vyznačují se rychlou kontrakcí a anaerobním metabolismem. U červené svaloviny je vyšší podíl krevních vlásečnic než u bílé a červená svalovina obsahuje také více lipidů. Post mortem se v bílé svalovině většinou tvoří více kyseliny mléčné a okyseluje se rychleji a hlouběji než svalovina červená. Svalovina pánevní končetiny je složena převážně z červených a intermediálních svalových vláken, i když šlechtěním se zvyšuje podíl bílých svalových vláken i ve stehenní svalovině [40] [42].

Hodnota pH svaloviny se pohybuje v rozmezí 5,7 – 6,7. S prodlužujícím se skladováním hodnota pH stoupá až na 7,2. Vodní aktivita tkání je 0,98 – 0,99, podle stáří kusu a podle skladovacích podmínek [23].

1.1.2 KŮŽE DRŮBEŽE

Kůže drůbeže je požitelnou částí, která neobsahuje žádné žlázy kromě kostrční [55]. Drůbeží kůže je tenká, poddajná a lehce odtažitelná. Má vysokou schopnost absorbovat

vodu. V podkoží se usazuje depotní tuk, proto se možnosti výroby dietního masa zaměřují na odstranění kůže [66]. Kůže, na níž je zachyceno množství mikroorganismů, tvoří i po porážce bariéru bránící svalovinu před přímou kontaminací [34].

1.1.3 VAZNOST A ÚDRŽNOST DRŮBEŽÍHO MASA

Po stránce vaznosti je drůbeží maso podobné masu červenému. Hlavní rozdíl mezi ním a hovězím nebo vepřovým masem je v poměrně křehké struktuře, což je ovlivněno nižším podílem kolagenu (4 až 8 % z celkových bílkovin) a také tím, že rychleji probíhá glykogenolýza [66]. Rovněž okyselení masa nedosahuje tak nízkých hodnot jako u masa červeného, což zlepšuje vaznost, na druhé straně však může tato skutečnost negativně působit na údržnost drůbežího masa. Velký vliv na údržnost masa mají též oxidační změny. Drůbeží maso je v tomto směru specifickou surovinou, protože je náchylnější na iniciaci oxidačních procesů lipidů, což je dáno rozdílným složením tuků a poměrem mezi nasycenými a nenasycenými mastnými kyselinami, než u jiných druhů masa [40]. Drůbeží tuk, v porovnání s tukem velkých hospodářských zvířat, je tekutější a vyznačuje se vyšším zastoupením esenciálních mastných kyselin (více než 20 %), což má z hlediska výživy člověka příznivý dopad, ale z hlediska technologického může docházet k již zmíněné oxidaci [65] [66]. Tabulka (Tab. 2) srovnává obsah cholesterolu a kvalitu tuku kuřecího masa s kůží a bez ní.

Tab. 2. Obsah cholesterolu v mase drůbeže (kuře) a kvalita tuku [49]

Druh masa	Cholesterol [mg.100g ⁻¹]	Nasycené mastné kyseliny [%]	Esenciální mastné kyseliny ¹ [%]	Index nutriční hodnoty tuku ² [%]
Kuře s kůží	135	34,65	10,25	0,296
Kuře bez kůže	86	36,02	10,42	0,290

1) kyselina linolová, linolenová a arachidonová

2) poměr esenciálních/ nenasycených masných kyselin

1.2 ZDROJE MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE DRŮBEŽE

Jedním z významných hygienických problémů je mikrobiální kontaminace porážené drůbeže a drůbežích těl. Vysoký stupeň mechanizace a vysoká kapacita při jatečním zpracování drůbeže mají negativní vliv na zvýšení rizika vzájemné sekundární mikrobiální kontaminace.

U kontaminace masa jsou rozlišovány dvě fáze [73]:

Primární (intravitální) kontaminace - za života zvířete. Může k ní docházet infekcí patogenními mikroby, kontaminací střevní mikroflórou (u zvířat nemocných, vyčerpaných, hladovějících, stresovaných či jinak oslabených) nebo při poranění zvířete infekcí otevřené rány.

Sekundární (postmortální) kontaminace - po smrti zvířete. Postmortální kontaminaci je maso vystaveno od okamžiku porážení zvířete, ve všech fázích jatečního opracování a v průběhu všech dalších operací až do okamžiku spotřeby.

1.2.1 ANALÝZA NEBEZPEČÍ JEDNOTLIVÝCH OPERACÍ PŘI JATEČNÍM ZPRACOVÁNÍ DRŮBEŽE

Tak jako u jiných potravin odráží drůbež svým mikrobiálním profilem intenzitu hygienických a sanitačních operací, který mi prošla v průběhu zemědělského chovu, ale zejména během jatečního zpracování a následné distribuce. V příloze P I je uveden proudový diagram porážení a úpravy drůbeže na jatkách.

Drůbež může být kontaminována již ve velkochovech sezobáváním exkrementů, vzájemným stykem, prachem nebo aerosolem neseným větracím vzduchem, vodou a velký význam jakožto zdroj salmonel nebo mykotoxinů má i krmivo.

Při nešetrné přepravě dochází ke křížové kontaminaci nejčastěji mezi společně přepravovanými ptáky fekáliemi, nečistotou a prachem, přičemž počet mikroorganismů na povrchu stoupá, je-li organismus stresován [66] [75].

Již první fáze jatečního zpracování - omračování, může být následným zdrojem kontaminace. Nedokonalé omračení může mít vliv na špatné vykrvení, do pařící vany se dostává krev, čím více bílkovinných složek v pařící vodě, tím je lepší ochrana pro mikroorganismy před působením tepla. Velmi důležité je, aby vykrvování nastalo bezprostředně po omračení, pozdní vykrvování má za následek hromadění krve v cévách a orgánech a znečištění masa krví, která je vhodným médiem pro růst mikroorganismů [65].

Paření není schopno devitalizovat všechny mikroorganismy, má pouze selektivní účinek. Proto v povrchové mikroflóře převládnu termorezistentní mezofilové a sporotvorné mikroorganismy. U zvířat, která nejsou dokonale usmrcena a přijdou do pařící vany, dochází reflexními pohyby k nasávání vody do plic a vzdušných vaků, které nemohou být při kuchání dokonale odstraněny a dojde k vnitřní kontaminaci [46]. Paření, zejména teplota vody a expozice jsou předmětem kompromisu, neboť vyšší teplota by sice měla silnější devitalizační účinek na mikroorganismy, ale vedla by ke značnému změknutí kůže

a k přílišnému vytrhávání kůže a dalších tkání při šhubání. Příliš nízká teplota pařící vody neumožňuje dokonalý šhubací proces.

Šhubání představuje hlavní místo křížové kontaminace v celém procesu opracování těl drůbeže a to jak patogenními, tak i saprofytickými mikroorganismy. Extrakce peří z folikulů, vlhká a nabobtnalá kůže usnadňují proces hlubokého uchycení bakterií. Bakterie zachycené v kůži získávají vyšší termorezistenci. Nedořešenou hygienickou problematikou jsou prsty šhubacího stroje, neboť bývají porézní, obsahují záhyby a v nich zachycenou nečistotu a mikroorganismy, které doslova vmasírují do kůže.

Kritickým bodem výroby je i kuchání, které se může stát dalším zdrojem fekální kontaminace. Střevní obsah může obsahovat patogenní bakterie, zejména rody *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium* a další [73]. Stává se tak závažným kontaminantem nožů a zařízení, které přenášejí mikroorganismy na další opracovávané kusy [66].

Omývání těl drůbeže přispívá k odstranění organických nečistot a také k částečné redukci počtu mikroorganismů z povrchu drůbeže, včetně bakterií skupiny *Enterobacteriaceae*. Na druhou stranu voda obsahuje rod *Pseudomonas* a jiné psychrotrofní bakterie, které jsou hlavními mikroby kažení povrchu drůbeže v chladírnách [4].

Chlazení drůbeže vzduchem, nyní již všeobecně instalované, podporuje selekci mikroorganismů na povrchu drůbeže ve prospěch psychrotrofních bakterií rodů *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* a *Moraxella* [23]. Patogenní mikroorganismy přežívají chlazení i případné následující zmrazování. Chlazení vzduchem ve srovnání s chlazením ve vodě znamená podstatný hygienický převrat ve vzájemné kontaminaci jednotlivých těl drůbeže [46] [66]. Ale ani chlazení vzduchem není bez problémů sekundární kontaminace.

Během opracování drůbeže se zvyšuje počet mikrobů asi na dvojnásobek [23]. Přibližný počet bakterií na pokožce kuřat během jednotlivých operací jatečního zpracování uvádí následující tabulka (Tab. 3). Hodnoty jsou průměrem výsledků z šesti zpracovatelských závodů. Z tabulky je patrné, že počty bakterií mají v souvislosti s jednotlivými stupni jatečního zpracování zvyšující se tendenci. Pokud jsou dodržovány hygienické a technologické požadavky, je možné počty bakterií minimalizovat až na hodnoty uvedené v prvním sloupci tabulky.

Tab. 3. Počet bakterií na pokožce kuřat při jednotlivých operacích jatečního zpracování [20], upraveno

Stupeň opracování	Rozmezí počtu bakterií [10^3 CFU/cm ²]		
	nejnižší	nejčastěji se vyskytující	nejvyšší
Živá drůbež	0,5	0,6 - 8,1	54
Po škubání	2,4	8,1 - 45	130
Po dočištění	3,7	10 - 84	90
Po opálení	5,2	13 - 210	230
Po kuchání	8,2	11 - 93	140
V chladícím okruhu	2,9	50 - 600	760
Chladící voda	13	50 - 210	1310

1.2.2 MIKROSKOPICKÁ ANALÝZA DŮVODŮ PEVNÉHO ZADRŽENÍ BAKTERIÍ NA KŮŽI DRŮBEŽE

První mechanismus – **retence**, znamená přítomnost bakterií ve vodě zadržené tkáněmi povrchu drůbeže při intenzivním omývání a sprejování. Z počátku nejsou bakterie v této vrstvě vody ani fyzikálně, ani chemicky zadržovány a mytím lze jejich počet částečně zředit.

Zachycení, tzv. **entrapment**, má již charakter pevnějšího spojení bakterií s tkáněmi drůbeže. Toto zachycení je umožněno morfologickými změnami kůže, kdy se bakterie zachytí do nerovností kůže (puklin, pórů, rozsedlin), které vznikly zejména při operacích spojených s vodou.

Třetí mechanismus – **adheze** představuje nejpevnější formu zachycení bakterií na povrchu drůbeže. Jedná se o chemické připojení bakterií na chemicky specifická reciproční místa a není závislá na přítomnosti bičíků, fimbrií nebo působení elektrického náboje. Adheze je zvýšena použitím vysoké teploty při paření. Odstranění adherovaných bakterií je velmi obtížné, ale dá se usnadnit použitím roztoků obsahující soli vápníku, sodíku nebo hořčíku [46] [4].

1.3 MIKROBIOLOGICKÉ KONTAMINANTY

Pojem mikrobiologické kontaminanty definuje zákon č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích [90]. Mikrobiologické kontaminanty jsou zde definovány jako

mikroorganismy, které se do potravin dostaly neúmyslně při výrobě, zpracování, balení, přepravě nebo skladování.

Podmínky dalšího uchování masa rozhodují o tom, které druhy mikrobů se budou rozvíjet. Trvanlivost chlazeného masa ovlivňují téměř výhradně bakterie. Kvasinky (např. rod *Debaryomyces*) a plísňe (např. rod *Penicillium*, *Asperillus*) rostou podstatně pomaleji než bakterie [41].

1.3.1 ČLENĚNÍ A CHARAKTERIZACE MIKROBIOLOGICKÝCH KONTAMINANTŮ V POTRAVINÁCH

Mikroorganismy kontaminující potraviny lze členit z hlediska taxonomického dle Bergey's Manual of Systematic Bacteriology nebo z hlediska jejich významu pro posuzování zdravotních rizik na mikroorganismy saprofytické, indikátorové a původce onemocnění z potravin.

Saprofytické mikroorganismy

Saprofytické mikroorganismy se běžně vyskytují v našem okolí. Tyto mikroorganismy nezpůsobují onemocnění, a proto byly dlouhou dobu opomíjeni. Vyskytují se na různých potravinách, pokud nejsou během zpracování odstraněny technologickými postupy, do jisté míry přetrvávají ve finálním výrobku. Případně se mohou do potravin dostávat cestou tzv. sekundární kontaminace. Podle složky potraviny, kterou štěpí se rozlišují mikroorganismy proteolytické, lipolytické, sacharolytické, pektolytické a dekarboxylující [48]. Uvedené skupiny mikroorganismů se obvykle nestanovují jednotlivě, ale jako tzv. celkový počet mikroorganismů (total plate count) nebo počet aerobních mezofilních bakterií (CFU/g). Takto stanovený „celkový počet bakterií“ je obvykle pouze určitým procentem ze skutečného celkového počtu bakterií ve vyšetřovaném vzorku, protože dané kultivační parametry nemusí vyhovovat fyziologickým požadavkům všech rodů a druhů bakterií vyskytujících se ve vzorku [84].

Indikátorové mikroorganismy

Indikátorové bakterie jsou podle ICMSF účelově vytvořenou skupinou relativně snadno stanovitelnou, jejichž přítomnost a množství indikují expozici potraviny podmínkám, které mohly způsobit přítomnost nebezpečných organismů a pomnožení patogenních a toxinogenních mikroorganismů [48]. Pro tyto účely se nejčastěji používají indikátorové skupiny: bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, koliformní bakterie, fekální

koliformní bakterie, *Escherichia coli* a enterokoky. Poměrně rozšířený je indikátorový význam koliformních bakterií a to zejména kvůli jejich termolabilnosti (indikátor spolehlivosti pasterizace a termizace), dobrému růstu (indikátor sekundární kontaminace) a chemolabilnosti (indikátor sanitace a dekontaminace) [20].

Patogenní a podmíněně patogenní mikroorganismy

Bakteriální původci onemocnění z potravin, označovaní často jako patogenní a podmíněně patogenní bakterie, se obvykle dělí podle mechanismu jakým onemocnění vyvolávají, na původce alimentárních infekcí a alimentárních intoxikací [21].

Hlavními příčinami těchto onemocnění jsou nedostatečné hygienické podmínky. Nebezpečí je o to větší, že pro vyvolání nemoci (např. cholera, břišní tyfus, úplavice, salmonelózy) stačí pouze několik bakteriálních buněk [48] [76]. Z těchto důvodů narůstá význam hygienických požadavků s nárůstem stále většího počtu drůbeže dodávané na trh v chlazeném stavu, oproti dřívějšímu, kdy převažovala drůbež mražená [66]. Riziko pro člověka představují z patogenních mikroorganismů hlavně *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, případně další [27].

1.3.2 MIKROBIOLOGICKÉ POŽADAVKY NA CHLAZENOU DRŮBEŽ

Mikrobiologické požadavky na živočišné produkty upravuje vyhláška Ministerstva zemědělství ČR č. 375/2003 Sb., kterou se provádějí některá další ustanovení zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon), ve znění pozdějších předpisů, a o veterinárních požadavcích na živočišné produkty [87].

Pro účely této vyhlášky jsou rozděleny skupiny výrobků do několika kategorií, přičemž chlazená drůbež spadá pod písmeno b) potraviny určené k přímé spotřebě, tedy potraviny určené ke spotřebě až po tepelné úpravě. Mikrobiologické požadavky jsou v této vyhlášce stanoveny jako mezní mikrobiální hodnoty a přípustné mikrobiální hodnoty pro hlavní skupiny výrobků. Na kategorii potravin určených k přímé spotřebě se vztahuje příloha č. 1 Čl. 1, která je dále rozdělena na dvě části: A. Původci kažení a indikátorové mikroorganismy; B. Původci onemocnění z potravin (viz. příloha P II).

1.4 MIKROBIOLOGICKÉ KAŽENÍ DRŮBEŽÍHO MASA

Maso obecně patří k potravinám s nízkou údržností. Konkrétně drůbeží maso je na základě svého chemického složení, fyzikálních vlastností a vysokého obsahu vody ideální živnou půdou pro mikroorganismy [20]. Zvýšenou možnost kažení, ve srovnání s kažením masa velkých hospodářských zvířat, podporuje zejména rychle probíhající proces zrání a vyšší hodnoty pH [66].

1.4.1 ZÁKLADNÍ FORMY KAŽENÍ MASA

Kažení masa lze chápat jako exogenní proces, kdy svalovina je uvnitř v okamžiku porážky prakticky sterilní, a kontaminace mikroorganismy nastává z vnějšího prostředí.

Hlavní podíl mikroorganismů se dostane do masa během jatečního procesu. Při opracování a zpracování se odstraňují mechanické bariéry pro vniknutí zárodků a dělicími řezy se mnohonásobně zvětšuje plocha otevřených řezů masa [20]. V této době již maso ztratilo obranyschopnost na základě své kyselosti, jelikož kyselina mléčná ve fázi pokročilejšího zrání byla degradována [73].

Vedle míry mikrobiální kontaminace je dalším významným faktorem teplota masa a teplota prostředí v němž se nachází. Běžné kažení masa má tři na sebe navazující fáze: povrchové osliznutí, povrchovou hnilobu a hlubokou hnilobu [73]. Mimo to může mít kažení masa podle druhu mikrobiálních původců dvě typické formy – aerobní a anaerobní [41].

1.4.2 POVRCHOVÉ MIKROBIÁLNÍ KAŽENÍ DRŮBEŽÍHO MASA

Mikrobiální kažení masa se uskutečňuje převážně od povrchu dovnitř, přičemž u chlazené drůbeže je navenek manifestováno zapařením, osliznutím povrchu, tvorbou barevných skvrn (splynutí kolonií pigmentujících bakterií) a nepříjemným zápachem. Povrchové osliznutí masa nastává masivním pomnožením obecné (banální) mikroflóry na jeho povrchu. Mikrobiální enzymy (proteázy, ale také lipázy a další) rozkládají složky masa na pestrou řadu degradačních produktů, které vytvoří spolu s přítomnými mikroby tenkou povrchovou vrstvu slizu s šedohnědým barevným odstínem a typickým hnilobným zápachem. Na zápachu se podílejí hlavně konečné degradační produkty bílkovin: amoniak, aminy, merkaptany, sirovodík a další. Tyto viditelné znaky jsou způsobené vysokými počty bakterií, které dosahují density $10^7 - 10^8$ CFU/cm² [20]. Nárůst tak vysokého počtu bakterií

na pokožce zabité a opracované drůbeže závisí na několika faktorech. Těmi hlavními jsou jakost masa, počáteční množství a složení mikroflóry, teplota a doba uchovávání [39].

1.4.3 MIKROORGANISMY SPOJENÉ S KAŽENÍM MASA

Mikroorganismy, které způsobují hnilobné a příbuzné procesy, vyžadují vždy prostředí dostatečně zásobené bílkovinami nebo jinými dusíkatými vysokomolekulárními látkami. Původci nebo spolupůvodci běžných hnilob jsou jednak aerobní a fakultativně anaerobní, ale také výslovně anaerobní bakterie (a to jak nesporulující, tak sporulující) [18].

Při skladování za chladírenských teplot dominují na povrchu masa za aerobních podmínek především proteolytické a lipolytické pseudomonády: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas fragi* a případně i psychrofilní zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* [23]. Kažení drůbežího masa je nejčastěji způsobeno rodem *Pseudomonas*, v menší míře i rodem *Acinetobacter*, *Moraxella* a *Shewanella putrefaciens* [39]. Se vzrůstající teplotou skladování se uplatňují jiné gramnegativní bakterie. Zejména se jedná o čeleď *Enterobacteriaceae*, rody *Serratia*, *Citrobacter* a silně proteolytické druhy rodu *Proteus*, případně také grampozitivní bakterie rodu *Micrococcus*, *Staphylococcus* a *Bacillus* [20].

1.5 CHARAKTERISTIKA JEDNOTLIVÝCH PATOGENNÍCH A PODMÍNĚNĚ PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ VYSKYTUJÍCÍCH SE U DRŮBEŽE

V této kapitole budou stručně popsány pouze nejvýznamnější bakterie bezprostředně související s kontaminací drůbežího masa a tím i s touto prací. Tedy rody *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Clostridium* a *Staphylococcus*.

1.5.1 GRAMNEGATIVNÍ FAKULTATIVNĚ ANAEROBNÍ TYČINKY

Čeleď *Enterobacteriaceae*

Čeleď *Enterobacteriaceae* má velký význam z hygienického hlediska, a proto je jí v potravinářství věnována mimořádná pozornost. Zahrnuje rovné tyčinky velké 0,3 - 1,0 x 1,0 - 6,0 μm , peritrichální nebo bez bičíků, které jsou gramnegativní, nesporulující, fakultativně anaerobní a oxidáza negativní. Mezi další významné vlastnosti patří zejména to, že tvoří katalázu, redukují nitráty a zkvašují glukózu (většinou za tvorby plynu). Patří mezi

nenáročné chemoorganotrofy, mají fermentativní typ glycidového metabolismu [9]. Většina těchto mikrobů žije ve střevech obratlovců, odkud se dostávají do okolního prostředí [79].

Na základě rozdílných biochemických vlastností, druhu hostitele a v některých případech také antigenní struktury se dělí na jednotlivé rody, druhy a sérovary. Mezi obligátně patogenní rody a druhy čeledi *Enterobacteriaceae* patří: *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*. Podmíněně patogenní jsou někteří zástupci rodů: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Edwardsiella* a *Yersinia*. Jakožto původci alimentárních toxikoinfekcí přicházejí v úvahu zejména některé druhy a sérovary salmonel, kmeny *Yersinia enterocolitica* a enteropatogenní *Escherichia coli* [21].

Rod *Escherichia*

Kmeny *Escherichia coli* a příbuzné gramnegativní bakterie, tzv. koliformní tyčky, jsou nejčetnější bakterie aerobní saprofytické střevní flóry člověka i zvířat. Jeho přítomnost ve vodách nebo potravinách je indikátorem fekálního znečištění.

Escherichia coli je obligátní mikrob. Jsou to gramnegativní, rovné tyčky o velikosti 1,1 - 1,5 x 2,0 - 6,0 μm , vyskytují se jednotlivě nebo v párech. Většina z nich má peritrichální bičíky, popřípadě také fimbrie. *Escherichia coli* zkvašuje cukry (např. glukózu, laktózu, některé pentosy a alkoholické cukry) za intenzivní tvorby kyselin (zejména kyseliny mléčné, pyrohroznové, octové a mravenčí), přičemž část kyseliny mravenčí se rozkládá na oxid uhličitý a vodík [9]. Gramnegativní povahy a schopnosti zkvašovat laktózu, za vzniku kyselin, se využívá u diagnosticky-selektivních půd, určených pro zjištění *Escherichia coli* v potravinách nebo ve vodě [4].

Escherichia coli je široce rozšířeným střevním patogenem savců a ptáků, a ačkoliv je vázána na fekální kontaminaci, nevyskytuje se samostatně mimo živočišné tělo. Nepatogenní kmeny *Escherichia coli* pocházejí z trávicího traktu teplokrevných živočichů. Avšak některé kmeny jsou patogenní pro člověka a způsobují enteropatie a septikémie. Jako původce alimentárních onemocnění je tento druh členěn podle mechanismu vzniku onemocnění do čtyř hlavních typů: enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), enteroinvazivní *E. coli* (EIEC) a enterohemorragické *E. coli* (EHEC) [WHO, 1997]. Za nejzávažnější jsou považovány enterohemorragické *E. coli* serotypu O157:H7 [21]. MID je pravděpodobně 10^6 nebo vyšší [22].

Rod *Salmonella*

Salmonely, typické bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, obsahují zpravidla druhy, jejichž výskyt v potravinách nebo v pitné vodě je nepřipustný.

Salmonely jsou krátké, pohyblivé, gramnegativní, nesporeující tyčinky. *Salmonella* zahrnuje více než 2000 různých sérovarů. Jsou fakultativně anaerobní a biochemicky jsou charakterizovány zkvašováním glukózy za vzniku kyseliny a plynu a neschopností metabolisovat laktózu a sacharózu, což napomáhá odlišit salmonely od dalších gramnegativních tyček řazených mezi enterobakterie. Přestože salmonely patří mezi mezofilní patogeny, jsou velmi adaptabilní na podmínky zevního prostředí, kde dokážou přežít v široké škále rozmezí teplot. Optimální teplota růstu salmonel se pohybuje kolem 38 °C. Teploty nad 60 °C salmonely již výrazně inhibují a poškozují, teploty nad 70 – 75 °C je spolehlivě usmrcují [62]. Chlazení významně zpomaluje činnost a množení bakterií tím, že prodlužuje jejich generační cyklus. Chladírenské ani mrazírenské teploty však salmonely spolehlivě neničí [79].

Onemocnění způsobené salmonelami jsou obecně označovány jako salmonelózy. Endotoxin, lipopolysacharid způsobující onemocnění, je součástí vnější membrány buněčné stěny těchto bakterií. Průvodními znaky onemocnění je zvracení, bolesti břicha, průjem, horečka a silná dehydratace organismu. Těžším průběhem onemocnění a vážnějšími důsledky jsou postižení kojenci, malé děti a staré osoby se sníženou imunitou způsobenou jinou infekcí či chronickou nemocí [22].

Nejrozšířenějším sérotypem v České republice je *Salmonella enteritidis*. Vyšší četnost výskytu vykazuje také *Salmonella typhimurium* [62]. Člověk se infikuje salmonelami téměř výlučně orální cestou a to potravinami, které se nezpracovávají za vyšší teploty. Nejčastějšími zdroji alimentární intoxikace jsou syrové maso (zejména maso drůbeže) nebo produkty přirozeně infikovaných domácích zvířat (vejce, mléko) [38]. Infekční dávka může být velmi nízká (1 - 10 buněk), obvykle je však značně vyšší ($>10^5$) [48].

Rod *Yersinia*

V potravinářství má význam zejména druh *Yersinia enterocolitica*. Mikrob má velmi složitou antigenní strukturu. Má 34 různých O-antigenů a 18 H-antigenů, takže existuje velké množství sérotypů. Mikrobiální buňky jsou velké 0,5 - 0,8 x 1,0 – 3,0 μm a mají sklon k bipolární barvitelnosti [31]. Tyto gramnegativní tyčinky nejsou pohyblivé při teplotě 37 °C, ale při nižších teplotách tvoří peritrichální bičíky a jsou pohyblivé. Optimální teplota

růstu je v rozmezí 29 – 33 °C, ale jsou schopny růstu i při teplotě 4 °C a většina kmenů roste i při teplotách kolem 1 °C [9].

V potravinách byla *Yersinia enterocolitica* stanovena v mléce a mléčných výrobcích a omezeně v různých druzích masa, rybách, ovoci a zelenině. Negativní význam pro potravinářství má zejména psychrofilnost, díky níž je schopna růstu i u potravin uskladněných v chladu. Většina izolátů z potravin, však není patogenní. MID je pravděpodobně vyšší než 10^7 [22]. Infekce se projevuje jako gastroenteritida hlavně u dětí do sedmi let.

1.5.2 GRAMNEGATIVNÍ AEROBNÍ NEBO MIKROAEROFILNÍ ZAKŘIVENÉ BAKTERIE

Rod *Campylobacter*

Bakterie rodu *Campylobacter* jsou typickými zástupci čeledi *Campylobacteraceae*. *Campylobacter jejuni* tvoří malé, tenké, zkřivené nebo spirální, nesporulující, gramnegativní tyčinky, obvykle s jedním až dvěma polárními bičíky. Jsou velmi citlivé ke kyslíku a k superoxidům, kyslík však k růstu potřebují. Při kultivaci je nutno zajistit mikroaerofilní podmínky. Nejlépe rostou při 42 až 43 °C. Z biochemických vlastností, kromě běžných znaků rodu (pozitivní oxidáza a redukce nitrátu) je pro tento druh typická jen tvorba katalázy [9] [11].

Kampylobakteriózy dříve spojované s onemocněním zvířat se staly v posledním desetiletí přibližně stejně častými původci onemocnění člověka jako salmonely. V současnosti je popsáno 14 druhů, ale patogenní pro člověka je jen *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*. Na humánních enteritidách se z rodu *Campylobacter* podílí v největší míře *Campylobacter jejuni* (90% případů intoxikace) [48]. Typickým zdrojem jsou živočišné potraviny (drůbež, mléko, vepřové maso) a špatně tepelně opracované nebo sekundárně kontaminované výrobky [6]. MID je nízká (10^3), ale překvapivý je fakt, že přes velkou citlivost kampylobakterů k vyschnutí, vyšší teplotě a chlorovým dezinfekčním prostředkům, přispívá k vysoké prevalenci jimi vyvolaných gastroenteritid [22].

Tab. 4. Výskyt vybraných hlášených alimentárních infekcí a intoxikací v České republice v letech 2000-2005 (Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie SZÚ Praha [88])

Název onemocnění	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Salmonelózy	40 233	33 594	27 964	26 899	30 724	32 905
Jiné bakt. střevní infekce	2 196	2 051	2 622	2 354	2 824	2 603
Kampylobakterióza	16 916	21 653	23 206	20 063	25 492	30 242
Jiné bakteriální intoxikace	1 091	686	266	61	192	41
Virové střevní infekce	1 197	1 166	2 381	2 099	3 590	3 661
Listerióza	23	21	20	12	16	15

1.5.3 GRAMPOZITIVNÍ FAKULTATIVNĚ ANAEROBNÍ NESPORULUJÍCÍ TYČKY

Rod *Listeria*

Bakterie rodu *Listeria* tvoří krátké tyčky, 0,4 - 0,7 μm silné a 0,5 - 2,0 μm dlouhé [9]. Buňky v čerstvých kulturách se barví Gram pozitivně. *Listeria* netvoří pouzdro ani spory. Jsou fakultativně anaerobní, kataláza pozitivní a glukózu fermentují za tvorby kyselin bez plynu. Optimální teplota růstu je 35 - 37 °C, ale mohou růst v širokém rozmezí teplot (1 až 45 °C). Ve skutečnosti řada kmenů roste velmi dobře právě kolem teploty 1 °C, což je nebezpečné při kontaminaci chlazených potravin. Na druhé straně byly publikovány práce, které poukazují na schopnost některých kmenů listerií přežít 15 s záhřev při 72 °C [79].

V potravinářství má význam zejména druh *Listeria monocytogenes*. *Listeria monocytogenes* je saprofyt a epifyt sliznic střevního ústrojí člověka a zvířat. Jako onemocnění lidí se listerióza vyskytuje zejména u osob se sníženou imunitou včetně těhotných žen a vykazuje relativně vysokou mortalitu. Patogenní jsou jen některé serotypy. V nízkých množstvích je nalézána u masných a mléčných výrobků s nižším stupněm tepelného opracování, pro vznik rizika je podstatná vlastnost listerií množit se při chladicích teplotách. MID pro rizikové skupiny je zřejmě nízká (10^3), pro ostatní populaci relativně vysoká (10^7) [48]. Většina případů listeriózy je sporadická a jen u několika byl s pochybnostmi nalezen zdroj. Naproti tomu byly zaznamenány epidemie postihující několik set osob a u mnoha bylo možno potvrdit původ právě v kontaminovaných potravinách [22].

1.5.4 GRAMPOZITIVNÍ ANAEROBNÍ SPORULUJÍCÍ TYČKY

Rod *Clostridium*

Clostridium perfringens je široce rozšířená a patří pravděpodobně mezi nejrozšířenější patogenní bakterie. Vyskytuje se v půdě, v přírodních vodních zdrojích a v trávicím traktu zvířat a lidí. Z potravin se nejčastěji vyskytuje v syrovém mase a to zejména v mase drůbeže.

Buňky *Clostridium perfringens* jsou grampozitivní a nepohyblivé. Mají podobu rovných tyčinek s hrubými zakulacenými konci, jsou relativně velké (0,6 - 2,4 x 1,3-19,0 µm) [9]. Vyskytují se jednotlivě nebo v párech. Spory jsou velké, oválné, centrální nebo subterminální a buňku rozšiřují. Ačkoliv patří mezi obligátní anaeroby, roste i v přítomnosti malého množství kyslíku. Na základě antigenní specifity letálních toxinů bylo popsáno pět typů: A, B, C, D a E [20]. Optimální teplota růstu typů A, D a E dosahuje 45 °C, u typů B a C 37 až 45 °C. Toxikaci způsobují typy A a C. Typ A je běžný a projevuje se jako průjemové onemocnění. Typ C je vzácný, způsobuje akutní nekrózu končící perforací střev [69] [73].

Druh *Clostridium perfringens* je běžně přítomen při některých typech alimentárních intoxikací, jelikož má obzvláště termorezistentní spory, jež odolávají několikahodinovému varu. Alimentární intoxikace pak probíhá tím způsobem, že tyto termorezistentní spory, které se vyskytují i u zvířat, kontaminují maso. Při vaření velkého kusu masa teplo proniká pomalu a pak maso také pomalu chladne. Spory přežívají a během chladnutí v anaerobním prostředí masa vyklíčí a klostridia se pomnoží. Požití takového masa je pak ekvivalentní požití bujonové kultury klostridií. Mikrobi jsou chráněni před kyselou reakcí žaludku bílkovinami v potravě, takže snadno projdou do střeva, kde vysporulují [22] [79]. Inkubační doba onemocnění je 6 - 22 hodin a infekční dávka je vyšší než 10^6 [35].

1.5.5 GRAMPOZITIVNÍ FAKULTATIVNĚ ANAEROBNÍ NESPORULUJÍCÍ KOKY

Rod *Staphylococcus*

Rod *Staphylococcus* zahrnuje grampozitivní koky seskupené do shluků. Hlavní patogen v tomto rodu, *Staphylococcus aureus*, je původcem řady důležitých i méně významných infekcí lidí a zvířat.

Staphylococcus aureus je grampozitivní kok o průměru asi 1 µm. Buňky jsou malé, nesporulují, jsou nepohyblivé a obvykle tvoří nepravidelné klastry ve tvaru vinných hroznů.

Zejména v patologickém materiálu se však vyskytují v párech nebo i ojediněle. Bakterie má fakultativně anaerobní metabolismus, ale lépe roste v přítomnosti kyslíku. Optimální teplota růstu se pohybuje kolem 37 °C. Je schopen růst při teplotách 8 °C. Patří mezi halofilní mikroorganismy, roste při vyšších koncentracích solí (vodní aktivita $a_w = 0,86$). Produkuje enzym koagulasu, který je zodpovědný za srážení krevní plasmy [4] [35]. Intoxikace lidí je způsobená přítomností toxinů. *Staphylococcus aureus* produkuje 6 různých typů toxinů polypeptidové povahy (A až F). Z nichž nejrozšířenější je typ A, který se může vyskytovat samostatně nebo v kombinaci s druhým nejrozšířenějším toxinem typu D [22] [79].

MID dostatečná k tvorbě toxinu, je vyšší než 10^6 buněk, množství enterotoxinu schopného vyvolat onemocnění činí asi 0,1 až 1,0 μg na kg tělesné hmotnosti konzumenta [48].

1.6 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ RŮST MIKROORGANISMŮ

Přestože jednotlivé druhy mikroorganismů mají výrazné rozdíly ve svých metabolických procesech, lze považovat nutriční faktory obsažené v poživatinách za vhodné k jejich využití. Mezi poživatiny, které představují velmi výhodný substrát pro rychlé množení bakterií patří zejména poživatiny živočišného původu a tedy i drůbež a výrobky z ní [27].

Rozmnožování mikroorganismů v živném prostředí je charakterizováno určitým růstovým cyklem, který má několik fází. Po vnesení mikroorganismů do potraviny, nebo po změně podmínek nastává adaptační fáze (tzv. lag-fáze), ve které si bakterie zvyká na podmínky. Během této doby mění mikrobiální buňky svůj fyziologický stav, aby mohly využívat nové prostředí. Buňky se nerozmnožují, ale zvětšuje se jejich objem a aktivuje se enzymatický systém. Fáze adaptace může být prodlužována podmínkami manipulace, technologickou úpravou a skladováním [73]. Následuje fáze zrychlujícího se růstu a po ní exponenciální (logaritmická), neboli tzv. log-fáze růstu, v níž mají buňky nejkratší generační dobu. Po exponenciální fázi nastává fáze zpomalení a postupně až zastavení růstu (tzv. stacionární fáze). U sporulujících bakterií se ve stacionární fázi vytvářejí odolné spóry. Poslední fáze je fází postupného odumírání buněk [35] [53].

Většina technologických postupů zpracování potravin v sobě zahrnuje některé konzervační zákroky, které ovlivňují růst mikroorganismů nebo jejich počet v potravinech. Obecně se jedná o zákroky, kterými se mikroorganismy usmrcují nebo o zákroky, které prodlužují adaptační fázi růstu.

Mezi nejdůležitější faktory vnějšího prostředí ovlivňující činnost mikroorganismů a jejich životnost patří: teplota, pH, vodní aktivita a oxidoredukční potenciál [68]. Vzhledem k problematice dané práce je dále popsán jen vliv teploty a pH.

1.6.1 VLIV TEPLoty NA RŮST MIKROORGANISMŮ

Teplota vnějšího prostředí je jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují rychlost rozmnožování mikroorganismů i možnost jejich života. Hodnotíme-li závislost růstu mikroorganismu na teplotě, rozeznáváme tři základní body teploty: minimální, optimální a maximální teplotu [76]. Všechny uvedené základní teplotní body jsou ovšem do určité míry ovlivněny dalšími vnějšími faktory (např. hodnotou pH, vodní aktivitou, osmotickým tlakem prostředí).

Rozdělení mikroorganismů podle vztahu k teplotě

Potravinářsky významné mikroorganismy lze z hlediska optimální růstové teploty rozdělit do tří hlavních skupin: psychrofilní, mezofilní a termofilní (viz. *Tab. 5*).

Tab. 5. Teplotní rozmezí pro růst jednotlivých skupin mikroorganismů [73]

Skupina mikroobů	Minimální teplota	Optimální teplota	Maximální teplota
Psychrofilní	5 až -5	12 až 15	15 až 20
Mezofilní	5 až 15	30 až 45	35 až 47
Termofilní	40 až 45	55 až 75	60 až 90

Uvedené hranice i hodnoty teplot jsou spíše orientační, mohou kolísat v závislosti na vlastnostech konkrétních mikroorganismů a prostředí.

V potravinářské mikrobiologii se používají ještě dva termíny vyjadřující vztah mikroflóry k teplotě. Mikroorganismy schopné růstu při chladírenských teplotách se označují jako psychrotrofní, mikroorganismy schopné přežít pasterační teploty jako termodurní, neboli teplovzdorné [35]. V tabulce (*Tab. 6*) jsou uvedeny nejdůležitější rody bakterií, které souvisí s danou prací, jejich optimální růstová teplota a teplotní rozmezí růstu.

Tab. 6. Nejdůležitější rody bakterií, jejich optimální růstová teplota a teplotní rozmezí růstu (které ovšem nelze určit přesně) [27]

Rod	Optimální teplota růstu	Teplotní rozmezí růstu
<i>Salmonella</i>	37 °C - 43 °C	6,5 °C – 46 °C
<i>Escherichia</i>	37 °C – 44 °C	10 °C – 46 °C
<i>Campylobacter</i>	37 °C – 42 °C	25 °C – 45 °C
<i>Clostridium</i>	33 °C – 37 °C	3 °C – 50 °C
<i>Pseudomonas</i>	35 °C	4 °C – 43 °C
<i>Staphylococcus</i>	35 °C – 40 °C	6,5 °C – 48 °C
<i>Listeria</i>	37 °C	0 °C – 44 °C

Teplotní rozmezí růstu jednotlivých bakteriálních rodů je ovšem jenom hrubě orientační. Je samozřejmě ovlivňováno mnoha faktory jako je samotné složení potravinového substrátu, pH, redox potenciál atd.

U nižších hub nejde jen o teplotní rozmezí růstu, ale také o teploty při kterých mohou plísně tvořit mykotoxiny. Obecně je možno říci, že plísně jsou početněji zastoupeny ve skupinách psychrofilních nebo psychrotrofních organismů. Pro kvasinky je většinou optimální teplota pro růst v rozmezí 22 - 25 °C, i když i zde najdeme druhy a kmeny které rostou lépe buď při vyšší nebo nižší teplotě [27].

Vliv nízkých teplot

Chladem se snižuje aktivita mikrobů. Chlad prodlužuje až zastavuje jejich generační cyklus a tím se omezuje mikrobiální kažení masa. Většina mikroorganismů přesto přežívá poměrně dlouhou dobu i teploty hluboko pod minimální růstovou hranicí a během znovuoobnovení vhodných podmínek je schopna dalšího pomnožování [14]. Jestliže se však intenzivně se rozmnožující buňky (tj. buňky v exponenciální fázi růstu) některých druhů bakterií přenesou z optimální teploty na teploty blízké 0 °C, dochází k takzvanému chladovému šoku, který se projevuje ztrátou životnosti velkého podílu populace [76]. Chladový šok byl pozorován u gramnegativních bakterií, u grampozitivních sporulujících bakterií a dokonce i u psychrofilů. Citlivost různých druhů bakterií k chladovému šoku je však odlišná.

1.6.2 VLIV HODNOTY pH NA RŮST MIKROORGANISMŮ

Koncentrace vodíkových iontů v prostředí má významný vliv na růst mikroorganismů i jejich biochemickou činnost. Hodnota pH ovlivňuje podmínky pro optimální průběh enzymových reakcí. Protože jednotlivé druhy mikroorganismů mají poněkud odlišnou strukturu enzymových systémů, je jejich tolerance vůči změnám pH též rozdílná [27]. V rezistenci na změny pH rozhoduje i to, o jaké životní funkce se jedná [76].

Obecně platí, že většina bakterií roste v neutrálním nebo slabě alkalickém prostředí, tedy v rozmezí pH 6,0 - 7,2 [16]. Hraniční hodnoty jsou však pro většinu bakterií značně široké, neboť mají velmi účinné mechanismy ke stabilizaci intracelulárního pH. Mezi bakterie přežívající v extrémním rozsahu pH od 4,0 - 9,0 patří střevní bakterie. Kvasinky vyžadují pro růst spíše kyselé prostředí. Jejich optimální pH se pohybuje mezi 4,2 až 5,5 a již slabě alkalické ústojné prostředí (kolem pH 7,5) zastavuje jejich růst. Plísním naopak vyhovuje nejlépe neutrální prostředí, mohou však růst i v rozmezí pH od 2,0 do 11,0 [73] [76]. Tabulka (Tab. 7) uvádí minimální a maximální hodnoty pH pro růst vybraných mikroorganismů. Hodnoty pH pod uvedeným rozmezím působí mikrobiostaticky, nikoliv mikrobicidně.

Odchylkou od optimálního pH se u všech mikrobů prodlužuje germinační doba. Hodnota pH prostředí ovlivňuje také odolnost buněk ke zvýšeným teplotám. V kyselém prostředí jsou mikrobi podstatně vnímavější na letální účinek teploty, což platí jak pro vegetativní buňky tak i pro spóry. U patogenních mikrobů ovlivňuje pH i tvorbu toxinu [1].

Tab. 7. Minimální a maximální hodnoty pH pro růst vybraných mikroorganismů [20], upraveno

Mikroorganismus	Minimální pH	Maximální pH
<i>Micrococcus sp.</i>	5,6	8,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,6	8,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	4,5	9,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,0	9,8
<i>Salmonella</i>	4,0 – 4,5	8,0 – 9,6
<i>Escherichia coli</i>	4,4	9,0

Z hlediska kyselosti prostředí a jeho vlivu na inhibici bakterií je třeba rozlišit vliv nízké hodnoty pH a vliv kyseliny, kterou byla tato hodnota snížena. Mikroorganismy, konkrétně bakterie, jsou ve svém metabolismu a růstu inhibované totiž nejen nízkými

hodnotami pH (volnými H^+ ionty), ale i molekulami v kyselém prostředí nedisociovaných slabých organických kyselin (podrobněji viz. kapitola 1.8.4).

1.7 PŘÍDATNÉ LÁTKY V POTRAVINÁCH

Podle směrnice Evropského parlamentu a Rady 94/34/ES se přídatnými látkami rozumí látky, které se bez ohledu na jejich výživovou hodnotu zpravidla nepoužívají samostatně, ani jako potravina, ani jako charakteristická potravní přísada [70]. Přidávají se do potravin při výrobě, zpracování, úpravě, balení, přepravě nebo skladování, čímž se samy stávají součástí konečné potraviny.

1.7.1 HODNOCENÍ BEZPEČNOSTI ADITIV VE SVĚTĚ

Problematice potravinářských aditiv se v současné době věnuje velká pozornost. Je nezbytné předem dokonale znát vlastnosti a chování přidávané látky a její změny během zpracování a skladování. Druh a množství aditivních látek, které se smějí v potravinách vyskytovat, stejně jako podmínky používání, stanoví příslušné legislativní materiály.

Bezpečností přídatných látek se zabývají různé mezinárodní zdravotnické organizace, zejména Codex Alimentarius Commission při FAO/WHO. V rámci Codex Alimentarius se problematikou aditiv, kontaminantů a přírodních toxinů v potravinách komplexně zabývá Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC). Tento výbor vydává doporučení pro používání jednotlivých přídatných látek. Objektivita hodnocení aditivních látek je zajišťována nezávislou komisí – Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, jejím hlavním úkolem je zhodnotit výsledky toxikologických šetření provedených na různých odborných pracovištích. Výsledky provedených studií a jejich hodnocení jsou nejprve publikovány ve WHO Technical Report Series, WHO Food Additives Series a následně jsou tato doporučení jsou v jednotlivých zemích převáděna do legislativní formy [59] [82].

1.7.2 HODNOCENÍ BEZPEČNOSTI ADITIV V EVROPĚ

Přídatné látky uvažované pro povolení na území EU musí být nejprve přehodnoceny Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority). Stanoviska EFSA vychází z doporučení CCFAC a v zásadě se od nich neodchylují. Po souhlasu a celkovém zhodnocení bezpečnosti látky EFSA, co do rozsahu použití a množství, vydává Evropská komise směrnice, které jsou pro členské země závazné [80].

1.7.3 ADITIVNÍ LÁTKY VE VZTAHU K LEGISLATIVĚ ČR

V České republice se problematikou přídatných látek zabývá Národní referenční laboratoř pro aditiva v potravinách při SZÚ. Kontrolou nad dodržováním předpisů je pověřena Státní zemědělská a potravinářská inspekce, Státní veterinární správa a orgány ochrany veřejného zdraví [33].

Používání přídatných látek je upraveno vyhláškou MZ ČR č. 304/2004 Sb., kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky použití látek přídatných, pomocných a potravních doplňků [85]. Ve vyhlášce jsou zapracovány všechny směrnice EU týkající se přídatných látek. Podle této vyhlášky lze při výrobě potravin používat pouze přídatné látky uvedené v příloze 1 této vyhlášky. Producenty masa a výrobce masných výrobků většinou zajímá zejména limit nejvyššího povoleného množství (NPM) chemické látky v potravine. Ten je rovněž závazně uveden v této vyhlášce. Hodnota NPM je proměnná, protože závisí na výši spotřeby dané skupiny potravin v populaci a na znalostech nebezpečnosti dané chemické látky [73]. Hodnoty NPM se vztahují na potraviny ve stavu, v jakém jsou uváděny do oběhu, pokud není výslovně stanoveno jinak [85].

Přídatné látky se podle účelu použití a rovněž na základě jejich hlavní funkce, kterou v potravine obvykle plní zařazují do jednotlivých kategorií [85]. Podle tohoto zařazení spadá kyselina citronová a stejně tak i kyselina mléčná do kategorie c) konzervanty, kterými jsou látky, které prodlužují údržnost potravin a které je chrání proti zkáze způsobené činností mikroorganismů.

V tabulce (*Tab. 8*) je uvedena kyselina citronová a mléčná včetně jejich E-kódu, pod kterým jsou označovány v číselném systému Evropské unie. V posledním sloupci jsou uvedeny limity jejich použití. Jelikož obě kyseliny, patří mezi přídatné látky, pro které není v této vyhlášce stanoveno nejvyšší povolené množství číselnou hodnotou, lze je použít při výrobě potravin v množství nezbytně nutném k dosažení zamýšleného technologického účinku při zachování zásad správné výrobní praxe.

Tab. 8. Přídavné látky – kyselina citronová a mléčná, jejich E-kód a výše nejvyššího povoleného množství [výňatek z vyhlášky MZ č. 304/2004 Sb]

Číslo E	Látka	NPM* mg.l-1 NPM mg.kg-1
E 330	Kyselina citronová	NM**
E 270	Kyselina mléčná pouze L(+) forma	NM

* nejvyšší povolené množství

** nezbytné množství

Dále musí přídavné látky vyhovovat požadavkům na jejich identitu a čistotu, které jsou uvedeny ve vyhlášce MZ ČR č. 54/2002 Sb., kterou se stanoví zdravotní požadavky na identitu a čistotu přídavných látek ve znění vyhlášky MZ ČR č. 318/2003 Sb. [86]. Vyhláška vychází výhradně z evropských směrnic.

1.8 MOŽNOSTI DEKONTAMINACE

Způsoby dekontaminace, využívané pro omezení počtu mikroorganismů na povrchu jatečně opracované drůbeže, mohou být zjednodušeně rozděleny na metody fyzikální, chemické a nebo jejich kombinaci. Bohužel, ne všechny metody je možno aplikovat v masném průmyslu.

Při dekontaminaci jatečně upravených těl drůbeže pomocí fyzikálních metod se využívá například páry [58], dále ionizující záření, mikrovlnné a UV záření, vysoký tlak nebo sonikace [8] [17]. K chemické dekontaminaci se používají zejména organické kyseliny [60] [71], trisodium monofosfát [36] nebo sloučeniny chloru [67]. Antimikrobiální účinek byl prokázán u kyseliny mléčné [44] [56] [91], octové, olejové [24] [25] [45], kaprylové [5], citronové [54] a dalších.

1.8.1 KOMBINACE ÚČINKU KONZERVAČNÍCH FAKTORŮ

Údržnost potravin může být prodloužena působením pouze jediného konzervačního faktoru, avšak u většiny potravin se na jejich trvanlivosti podílí více faktorů. Z tohoto pohledu je výhodné využít kombinaci chemických i fyzikálních konzervačních metod, jejichž účinek se vzájemně zesiluje. Tímto synergickým účinkem lze dosáhnout vyšší údržnosti při menším porušení původních vlastností produktu [20]. Výsledný konzervační efekt je pak kombinací „překážek“ a mluví se o tzv. překážkovém efektu (hurdle effect) [1].

1.8.2 KONZERVACE CHEMICKOU ÚPRAVOU POTRAVIN

Konzervace potravin v průběhu jejich zpracování je prováděna s cílem uchovat jakost suroviny, fyzikálně-chemické vlastnosti a zabezpečit nezávadný produkt s nízkou potencií ke kažení.

Chemická konzervace potravin spočívá v použití chemických látek jako přísad do potravin za účelem potlačení rozvoje mikroorganismů. Výzkum v dané oblasti se v současnosti zaměřuje zejména na přirozeně se vyskytující látky s antimikrobiálním účinkem, kde mezi perspektivní kandidáty patří organické kyseliny [47]. Většina v potravinářství používaných organických kyselin patří mezi látky, které se v živých organismech běžně vytvářejí a jsou součástí metabolismu, proto je v tomto případě bezpředmětná problematika reziduí.

1.8.3 KONZERVACE UMĚLÝM OKYSELOVÁNÍM

Tato konzervace bývá označována jako chemoanabióza v širším smyslu, poněvadž využívá antimikrobiálních bioproduktů v poměrně velkých koncentracích. Organické kyseliny jsou v tomto případě přídavky do potravin, v případě chemoanabiózy tyto látky v potravinách vznikají vlastním biologickým procesem [29].

Mezi běžně používané účinné konzervační prostředky v potravinářství patří zejména kyseliny: sorbová, benzoová, mléčná, octová, fumarová, citronová, propionová, mravenčí a další [41]. Ty mohou za určitých okolností vykazovat antimikrobiální účinky vůči přítomným bakteriím, kvasinkám či plísním. Při volbě kyseliny je třeba pečlivě rozlišovat o jakou potravinu se jedná a jaký bude vliv kyselin na organoleptické vlastnosti výrobku.

1.8.4 VLIV ORGANICKÝCH KYSELIN NA KYSELOST PROSTŘEDÍ

Nejvýznamnější funkcí organických kyselin, jakožto potravinářských aditiv, je snižování hodnoty pH a zvyšování titrační kyselosti potravinářských výrobků. Podobně jako anorganické kyseliny mají i organické kyseliny schopnost disociovat a odštěpovat tak vodíkový kation. Množství odštěpených vodíkových iontů však nezávisí jen na koncentraci kyselin, ale především na disociační konstantě kyseliny.

Silné kyseliny mají značný vliv na pH i při poměrně malé titrační aciditě. V potravinářském průmyslu mají však hlavní význam středně silné a slabé kyseliny, např. kyselina vinná, citronová, mléčná, octová, fumarová, adipová, jantarová, jablečná, kyselina fosforečná a také kyselina uhličitá. U silných kyselin s rostoucí koncentrací

kyseliny klesá hodnota pH výrazně, zatímco u slabých kyselin se rychle přiblíží hodnotě, kde již titrační acidita (neboli další přídavky kyseliny) nemají na hodnotu pH téměř žádný vliv. K dosažení nižších hodnot pH u slabých kyselin je zapotřebí daleko většího molárního množství těchto kyselin, jejich titrační acidita je tedy podstatně větší [14].

1.8.5 PRINCIP ÚČINKU ORGANICKÝCH KYSELIN

Molekuly kyselin inhibují růst bakterií i plísní. V roztoku existuje pro organické kyseliny rovnováha závislá na hodnotách pH mezi nedisociovaným a disociovaným stavem. Tyto konzervační látky mají optimální inhibiční efekt při nízkých hodnotách pH, které podporují nedisociovaný stav molekuly. V tomto případě je molekula volně permeabilní přes plazmatickou membránu a je schopna vstupu do buňky. Následně ve vyšším pH uvnitř buňky molekula disociuje. Vznikají aniony a protony, které nemohou projít plazmatickou membránou a hromadí se v buňce. Inhibice bakteriálního růstu účinkem organických kyselin je způsobena potlačením základních metabolických reakcí, zátěží na intracelulární homeostázu pH a akumulací toxických anionů [10].

1.8.6 ZÁVISLOST ÚČINKU ORGANICKÝCH KYSELIN

Zahraniční literatura popisuje a srovnává účinek různých kombinací organických kyselin [54] [91], stejně jako rozdílné metody jejich aplikace (postřik, oplach, potěr) [13] [67].

Většina organických kyselin s antimikrobiální aktivitou má pKa, tj. pH při kterém je kyselina zcela disociovaná, mezi 3 - 5 (viz. Tab. 9) [41]. Antimikrobiální účinek organických kyselin však závisí kromě hodnoty pH podstatně také na koncentraci. K dosažení uspokojivých účinků je nutné aplikovat slabé organické kyseliny v podstatně vyšších dávkách, než je tomu u silných organických kyselin. Omezením zde však jsou organoleptické vlastnosti.

Tab. 9. Přehled nejčastěji používaných organických kyselin a jejich disociační konstanty ve vztahu k procentu nedisociované kyseliny při různých hodnotách pH [51]

Kyselina	pKa	% nedisociované kyseliny při rozdílném pH			
		pH 7	pH 6	pH 5	pH 4
Mléčná	3,86	< 0,1	0,7	7	4,1
Octová	4,74	< 0,1	5,2	35	85
Cítonová	2,25	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Vinná	2,08	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1

Kromě toho může být baktericidní efekt organických kyselin podpořen prodloužením doby působení nebo také teplotou aplikované kyseliny. Ta by měla být shodná s teplotou jatečního těla, tedy 30 - 40 °C [56]. Rozhodující je také správné načasování aplikace kyseliny v procesu jatečního opracování. Ideální je, aby se aplikace roztoku kyseliny provedla na konci jateční linky, krátce po závěrečném oplachu celého jatečního těla. Tento okamžik je důležitý vzhledem k tomu, že mikroorganismy jsou ještě na povrchu a nepronikly do hloubky masa [34].

Účinnost je ovlivněna rovněž formou zadržení bakterií na kůži drůbeže, což souvisí jak se stupněm jatečního opracování, tak i s druhem povrchové tkáně. Proto mohou být organismy snadněji odstraněny z drůbežního masa, které je netučné, než z tukové tkáně [8].

Neméně důležitý význam má také skladba mikroflóry, kterou má kyselina inhibovat. Roli zde hraje zejména počáteční množství a druhy mikroorganismů, jejich rezistence a schopnosti růstu za daných podmínek, přítomnost acidofilních mikroorganismů atd. [46].

1.8.7 MECHANISMY REZISTENCE

Mikrobiální rezistence na slabé organické kyseliny může zahrnovat řadu mechanismů. Gramnegativní bakterie mají díky složitější stavbě buněčné stěny komplikovanější rezistenční mechanismy. Grampozitivní bakterie nemají vnější membránu [10]. Organické kyseliny mohou snadno vstupovat do nitra buněk grampozitivních bakterií a proto je jejich rezistence relativně nízká. V některých případech jsou mikroorganismy schopné degradovat konzervační látky specifickými enzymy. Byly studovány indukovatelné mechanismy rezistence mikrobů. U *Salmonella typhimurium* je známo, že buňky se střetávají ve svém prostředí s řadou stresových faktorů, např. extrémně nízké hodnoty pH v žaludku nebo přítomnost velkého množství částečně hydrofobních organických kyselin ve střevě. Tato

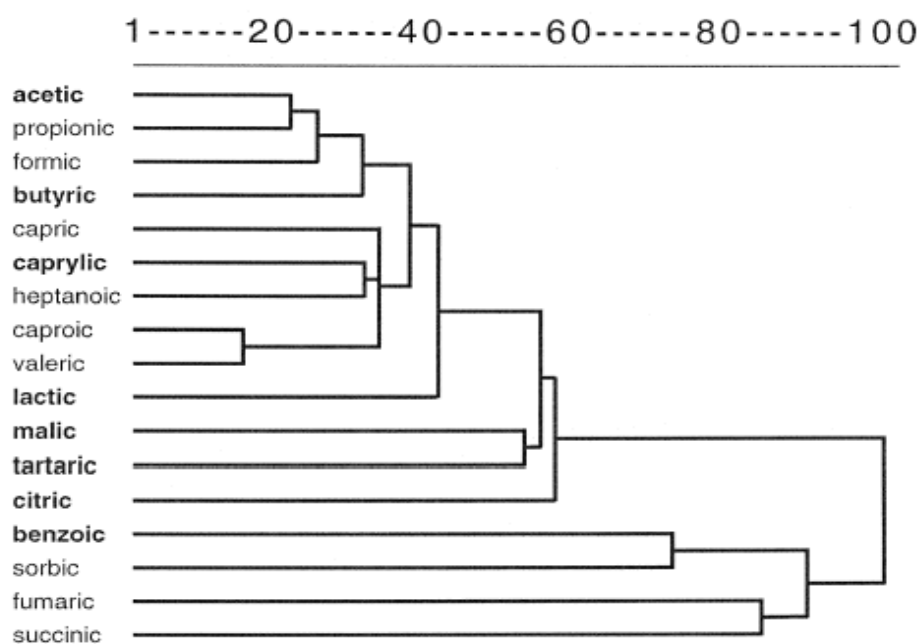
bakterie disponuje acidotolerancí, zahrnující komplex obranných systémů, které umožňují buňkám přežít v prostředí pH kolem 3. Rovněž u *Escherichia coli* O157:H7 byla pozorována rezistence na kyselinu benzoovou při hodnotě pH 2. Podobné mechanismy byly nalezeny u plísní. U kvasinek se podílí na rezistenci ke kyselinám enzym ATPáza cytoplazmatické membrány. Obranné mechanismy jsou založené na transportu anionů z nitra buněk [4] [31].

1.8.8 ADITIVNÍ EFEKT

Účinek chemických konzervovadel může být oslaben různými vlivy prostředí. Působí-li však na mikroorganismy směs dvou i více konzervovadel, která spolu chemicky nereagují, jejich účinky se často sčítají v tzv. aditivní efekt. Někdy působí dvě konzervovadla synergicky, jejich výsledný účinek je vyšší, než součet jejich individuálních účinků [29].

Modelováním inhibičních účinků organických kyselin na bakterie se zabývalo několik výzkumných prací [12] [28] [43] [50]. Existuje mnoho matematických modelů popisujících vzájemný účinek organických kyselin.

Níže uvedený dendrogram (*Obr. 1*) znázorňuje vzájemný vztah kyselin, na základě něhož lze popsat možnost vzniku synergických účinků jednotlivých kyselin. Vychází z předpokladu, že kyseliny které mají podobné pole účinnosti jsou si obecně podobné a v dendrogramu jsou nejen jedna vedle druhé, ale kyseliny si podobnější jsou spojnicemi propojeny vždy blíže k jeho levé části. Naopak ty, které mají vlastnosti spíše odlišné, se spojují poblíž pravé strany diagramu. Pro modelové účely, pak dvě kyseliny s odlišnou kombinací charakteristických vlastností poskytují mnohem více informací než ty, které se svými vlastnostmi podobají. Závěrem tedy je, že aplikace směsi dvou kyselin, jejichž pole účinnosti je shodné, je víceméně zbytečné, neboť aplikace pouze jedné z nich je pro dosažení daného účinku plně postačující. Naopak u kyselin s odlišnými vlastnostmi může dojít ke zvýšení inhibičního účinku a tedy k aditivnímu efektu či synergii [28].



Obr. 1. Dendrogram znázorňuje vzájemnou podobnost kyselin na základě jejich charakteristických vlastností. Osm tučně zvýrazněných kyselin, z daných 17, představuje skupinu těch, které mají charakteristické vlastnosti velmi odlišné [28]

Jelikož je známo, že účinek kyseliny mléčné i citronové je poněkud menší než například kyseliny octové (a zejména pak skutečnost, že samostatně nemohou potraviny dokonale ochránit před plísněmi), nabízí se možnost kombinace využití aplikace obou kyselin. Výše uvedené schéma tuto myšlenku podporuje. Obě kyseliny mají specifické pole působnosti a tato skutečnost přímo souvisí s možností využití synergického účinku.

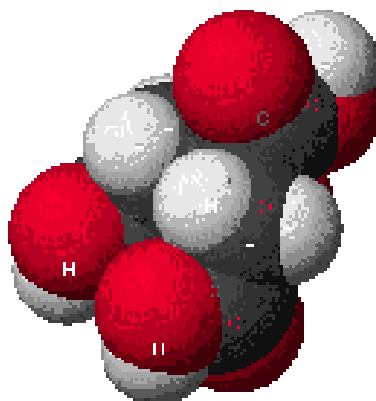
1.9 ORGANICKÉ KYSELINY

1.9.1 KYSELINA CITRONOVÁ - CHARAKTERISTIKA

Kyselina citronová je trikarboxylovou hydroxykyselinou, obvykle krystalující jako monohydrát, který však na suchém vzduchu opět snadno ztrácí vodu. Rozpouští se snadno ve vodě, methanolu, ethanolu a podobných polárních rozpouštědlech [14].

Poprvé byla izolována roku 1784 ze šťávy citonu, odtud její název. Je jedním z klíčových buněčných metabolitů. Vystupuje v citrátovém cyklu. Je allosterickým regulátorem některých důležitých enzymů. S řadou vícenásobných kationtů, např. se solemi železitými a měďnatými, tvoří komplexy, a proto se této kyseliny využívá k deaktivaci stop těžkých kovů, které jinak působí prooxidačně.

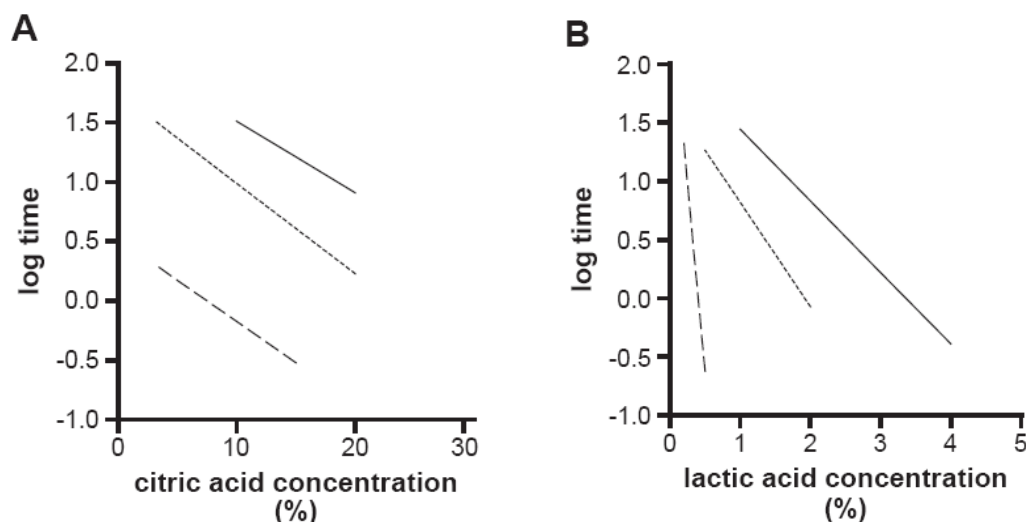
Citronová kyselina se hojně vyskytuje v ovoci (zvláště v citonech, kde tvoří 7 až 9 % sušiny), v menším množství je obsažena v dalším ovoci, v malém množství i v bramborech, obilí, ve stopách i v mléce a v mase. Průmyslově se vyrábí ve velkých množstvích nepravou fermentací sacharidů, nejčastěji pomocí plísně *Aspergillus niger*, nebo z citronové šťávy. Používá se jí běžně jako přísady do různých konzervářských výrobků, nealkoholických nápojů a jiných potravin [14] [41].



Obr. 2. Grafické znázornění molekuly kyseliny citronové

1.9.2 APLIKACE KYSELINY CITONOVÉ

Narozdíl od kyseliny mléčné, kde odborná literatura shodně doporučuje a také dokládá účinnost aplikace 0,8 - 2hm.% roztoku [44] [53] [57] [67], závisí účinek kyseliny citronové nejen na zvolené koncentraci ale rovněž na čase působení [83]. Z dostupné literatury lze vyvodit podstatně vyšší účinnost kyseliny mléčné než kyseliny citronové a to při jakékoliv teplotě, ačkoliv je známo, že baktericidní účinek kyseliny mléčné na rozdíl od účinku kyseliny citronové vykazuje značnou závislost na teplotě [58] [83]. Kyselina mléčná je mnohem více účinnější i při nižších koncentracích a to i v případě, kdy je hodnota pH obou kyselin stejná (příčinnou může být rychlejší difuze molekuly kyseliny mléčné, která je ve srovnání s kyselinou citonovou menší, viz. Obr. 3). Na základě těchto poznatků, lze vyslovit závěr, že pro dosažení baktericidního účinku za pomoci kyseliny citonové je nutné použít relativně vyšší koncentrace než v případě aplikace kyseliny mléčné.



Obr. 3. Kombinace doby působení a koncentrace kyseliny citronové (A) a kyseliny mléčné (B) potřebné k obdržení 3 log redukce při teplotě 4 °C (—), 20 °C (.....) a 40 °C (-----) [83].

1.9.3 KYSELINA MLÉČNÁ - CHARAKTERISTIKA

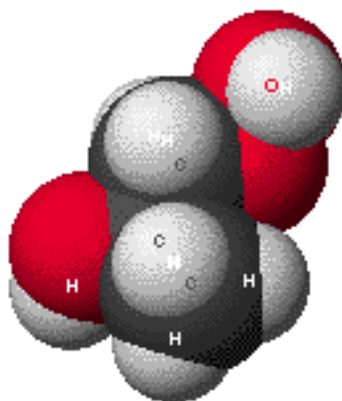
V posledních letech se při zpracování a distribuci potravin celosvětově rozvíjí okyselování potravin kyselinou mléčnou a preparáty na její bázi.

Kyselina mléčná byla objevena před více než 200 lety v kyselém mléku. V polovině minulého století se prokázalo, že je konečným produktem procesu nazvaného „mléčné kvašení“. Důležitou vlastností kyseliny mléčné je její optická aktivita, neboť obsahuje v molekule asymetrický uhlík. Z možných stereoizomerů se v přírodě vyskytují běžně dva, L(+)-forma a D(-)-forma i jejich racemická směs. V masném průmyslu má význam zejména pravotočivá L-mléčná kyselina která bývá přítomna v mase a vnitřnostech, kde vzniká při tělesné námaze z glykogenu. Tvoří se také při mléčném kvašení cukrů, např. mikroorganismem *Lactobacillus bulgarius* [14] [41].

Používání kyseliny mléčné v masné technologii není ve světě novinkou. Její postupné pronikání do produkce u nás je spojeno s názvem jednoho z největších výrobců naturálních potravinářských aditiv na světě – holandského koncernu Purac Biochem a s výhradním českým dovozcem a distributorem – IFC Food Praha, spol. s.r.o.

Vhodná je zejména aplikace v masném průmyslu, poněvadž v mase jatečných zvířat vzniká kyselina mléčná přirozenou postmortální glykogenolýzou. Ve fermentovaných trvanlivých salámech pak z přidané sacharózy, působením tzv. startovacích kultur. Kyselina L(+)-mléčná a její deriváty působí protimikrobně snížením pH, snížením a_w a specifickým

účinkem mléčnanového aniontu. Kyselina mléčná je vhodná i ze sensorického hlediska a lze ji použít do všech nekyselých a málo kyselých potravin jako protimikrobní bariéru, umožňující podstatné prodloužení uchovatelnosti potravin v moderních formách distribuce a prodeje potravin [29].



Obr. 4. Grafické znázornění molekuly kyseliny mléčné

1.9.4 APLIKACE KYSELINY MLÉČNÉ

Kritickým místem na jatečně opracovaném mase je především povrch, kde může nejčastěji docházet ke kontaminaci. Zajistit údržnost povrchu je možné buď snížením aktivity vody, nebo snížením pH. Nejrozšířenějším konzervačním zákrokem je snížení pH povrchových vrstev masa a to postřikem organickými kyselinami: mléčnou, citronovou, askorbovou a octovou. Aplikace organických kyselin na povrch masa vede ke snížení počáteční koncentrace mikroorganismů a prodloužení nástupu logaritmické fáze růstu.

Aplikace kyseliny mléčné, působí inhibičně vůči bakteriím nejen snížením pH, ale i specificky v nedisociované formě. V odborné literatuře je doporučován postřik 0,8 až 2hm.% roztokem kyseliny mléčné [8] [44] [53]. Optimální okamžik aplikace kyseliny mléčné je co nejdříve post mortem, kdy většina mikroorganismů je dosud na povrchu a nepronikla ještě do vnitřních vrstev masa. S ohledem na teplotu masa se používá postřik roztokem o teplotě blízké teplotě povrchu jatečných těl [56].

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Primárním cílem této diplomové práce bylo **testování a zhodnocení účinku organických kyselin, konkrétně kyseliny citronové a kyseliny mléčné, na prodloužení údržnosti chlazené drůbeže.**

Při naplňování primárního cíle diplomové práce bylo nutno splnit tyto sekundární cíle:

- v teoretické části zpracovat problematiku týkající se údržnosti masa drůbeže se zaměřením na vlivy působící na údržnost masa v průběhu skladování,
- v experimentální části práce testovat antimikrobiální účinek kyseliny citronové (samotné) a dále v kombinaci s kyselinou mléčnou na redukci počtu mikroorganismů,
- sledovat vývoj hodnoty pH na vzorcích chlazené drůbeže a analyzovat příčinné souvislosti mezi: 1.) změnami hodnot pH a druhem aplikované kyseliny 2.) změnami hodnot pH a změnou koncentrace dané kyseliny,
- provést bakteriální identifikaci mikroflóry přítomné na kůži chlazené drůbeže,
- na základě výsledků z experimentální části zhodnotit vliv testovaných organických kyselin na celkový baktericidní obraz a posoudit jejich využitelnost v potravinářské praxi.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ A LABORATORNÍCH PŘÍSTROJŮ

3.1.1 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ, ROZTOKŮ, ŽIVNÝCH PŮD A STANDARDIZOVANÝCH TESTOVACÍCH SYSTÉMŮ

KYSLINA CITRONOVÁ MONOHYDRÁT

Výrobce: Lach-Ner, s.r.o.

Exspirace: 12/2006

KYSELINA MLÉČNÁ L(+)

Výrobce: PENTA – farmaceut. Divize Praha

Exspirace: 02/2008

CHLORID SODNÝ

Výrobce: Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod

Exspirace: 11/2009

FYZIOLOGICKÝ ROZTOK

Složení: 8 g NaCl na 1000 ml destilované vody

Veškeré použité univerzální a selektivně diagnostické půdy (tj. Plate Count Agar, Chloramphenicol Yeast Glucose Agar, Endo Agar, Mannitol Salt Agar, Triple Sugar Iron Agar), byly vyrobené HiMedia Laboratories Pvt. Limited, a dodány firmou ČADERSKÝ-ENVITEK, spol. s.r.o.

Dále bylo využito standardizovaných testovacích systémů firmy PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o.. Z biochemických testů Lachema Mikro-LA-Test byly použity soupravy: ENTEROtest, STAPHYtest a NEFERMtest. Identifikace byla doplněna testy od stejného výrobce, dodávanými ve formě detekčních proužků: OXItest, VPtest a ONPtest. Z pomocných přípravků k mikrotestům byla použita činidla k identifikačním soupravám Mikro-LA-Test (Fosfatáza, Nitráty, VPT I, VPT II, Indol, Fenylalanin a parafinový olej sterilizovaný) a činidla k detekčním proužkům (činidlo VPT I, VPT II, Oxidáza, Acetoin).

3.1.2 SEZNAM LABORATORNÍCH PŘÍSTROJŮ

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

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

Biologický termostat BT 120 /Laboratorní přístroje Praha/

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

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

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

pH metr GRYF 209 S /GRYF HB spol. s r.o., Havlíčkův Brod/

Mikroskop LABORLUX S /LEITZ, Německo/

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

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

3.2 PŮVOD A ÚPRAVA ANALYTICKÝCH VZORKŮ

Veškeré vzorky chlazených kuřat byly odebírány z výrobní prodejny.

Jatečně opracová těla byla pro účely experimentu rozpůlena. Přičemž jedna polovina sloužila jako vzorek, na který byla aplikovaná příslušná koncentrace kyseliny a druhá polovina sloužila jako kontrola (byla aplikována sterilní destilovaná voda).

3.3 PŘÍPRAVA A APLIKACE ORGANICKÝCH KYSELIN

Byl testován účinek dvou organických kyselin a to kyseliny citronové (samostatně) a dále v kombinaci s 1obj.% roztoku kyseliny mléčné. Celkově byl testován vliv účinku pěti rozdílných koncentrací roztoků kyseliny citonové: 2hm.%, 4hm.%, 6hm.%, 8hm.%, 10hm.% a vliv přídatku 1obj.% roztoku kyseliny mléčné (L(+) forma) k výše uvedeným pěti koncentracím kyseliny citronové. Poměr kyseliny citronové (rozdílné koncentrace) k 1hm.% roztoku kyseliny mléčné byl 1:1. Všechny aplikované roztoky byly vždy čerstvě připraveny a sterilace byla provedena v autoklávu (při teplotě 121°C po dobu 30 minut). Teplota aplikovaného roztoku odpovídala teplotě povrchu jatečně opracovaných těl (maximální odchylka ± 2 °C).

Všechny testované organické kyseliny byly nanášeny potěrem za pomoci sterilního vatového tampónu.

3.4 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA

Vzorky byly hodnoceny dle vyhlášky Ministerstva zemědělství ČR č. 375/2003 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon), ve znění pozdějších předpisů, a o veterinárních požadavcích na živočišné produkty. Příloha 2 této

vyhlášky upravuje mikrobiologické požadavky na suroviny živočišného původu, určené k výrobě potravin.

Byly zjišťovány četnosti následujících mikroorganismů: celkový počet mezofilních mikroorganismů, koliformních bakterií, kvasinek a plísní.

Při jejich stanovení se postupovalo podle následujících norem, určených pro mikrobiologické zkoušení potravin a pokrmů:

ČSN EN ISO 6887-2:2004 (56 0102) Mikrobiologie potravin a krmiv – Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinasobných ředění – Část 2: Specifické pokyny pro vzorky masa a masných výrobků.

ČSN ISO 3100-2:1995 (56 0106) Maso a masné výrobky. Odběr vzorků a příprava analytických vzorků. Část 2: Příprava analytických vzorků pro mikrobiologické zkoušení.

ČSN EN ISO 4833:2003 (56 0083) Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30°C.

ČSN ISO 2293:1996 (56 0122) Maso a masné výrobky. Stanovení počtu mikroorganismů. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30°C.

ČSN ISO 4832:1995 (56 0085) Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu koliformních bakterií. Technika počítání kolonií.

ČSN ISO 7954:1994 (56 0087) Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu kvasinek a plísní. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 25°C.

3.4.1 ODBĚR VZORKŮ

Odběr analytického vzorku, jeho následnou úpravu a přípravu zkušební vzorku pro mikrobiologické zkoušení, upravuje norma ČSN ISO 3100-1:1995 a ČSN ISO 3100-2:1995. Zkušební vzorky byly odebírány z povrchu těl chlazené drůbeže (kůže). Veškeré úkony a manipulace byly prováděny za použití aseptických technik a sterilního zařízení a náčiní s cílem zabránit mikrobiální kontaminaci vzorků z vnějších zdrojů.

Vzorkování z povrchu chlazené drůbeže bylo prováděno metodou výplachu. Metoda výplachu je destruktivní metoda. Vzorky byly odebírány bezprostředně po ošetření daným roztokem kyseliny a následně pak každých 24 hodin skladování až do vypršení data spotřeby uvedeného výrobcem (čtyři dny).

Ze vzorku chlazené drůbeže byla v laboratoři odebrána sterilními nástroji za dodržení zásad asepse navážka o hmotnosti 10 g. Navážka byla odebrána takovým způsobem, aby vystihla celý vzorek (odběr byl proveden z několika různých míst povrchu kůže).

3.4.2 STANOVENÍ CELKOVÉHO POČTU MIKROORGANISMŮ

Při stanovení se postupovalo dle normy **ČSN EN ISO 4833:2003 (56 0083)**.

Zkušební vzorek o hmotnosti 10 g byl přenesen do sterilní nádoby s desetinasobným množstvím sterilního ředícího roztoku (100 ml). Takto přípravné základní ředění bylo homogenizováno po dobu 10 minut. Z výsledné suspenze byla připravena řada desetinasobných ředění do takového stupně, aby bylo možno stanovit předpokládaný počet mikroorganismů v 1 g zkoušeného vzorku. Z vhodného ředění byly naočkovány pipetou po 100 µl souběžně tři petriho misky. Inokulum bylo rovnoměrně rozetřeno sterilní hokejkou a plotny umístěny do termostatu. Plotny byly kultivovány aerobně při teplotě 37°C po dobu 24 hodin. Po určené době inkubace byly spočítány vyrostlé kolonie a přepočítány na 1 g vzorku.

Jako kultivační půda byl použit Standard Plate Count Agar (Hi-Media Laboratories Ltd., Expirace 2009/02). Standard Plate Count Agar je nejužívanější půdou v diagnostice. Tato živná půda neobsahuje žádné inhibitory ani indikátory a používá se především pro zjišťování celkového počtu mikroorganismů v mléku, vodě, mase, masných výrobcích a dalších potravinářských produktech.

3.4.3 STANOVENÍ POČTU KOLIFORMNÍCH BAKTERIÍ

Při stanovení se postupovalo podle normy **ČSN ISO 4832:1995 (56 0085)**.

Postup byl shodný s postupem uvedeným v kapitole 3.5.1. Inkubace probíhala při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

Jakožto selektivní diagnostická půda byl pužit Endo Agar (Hi-Media Laboratorie Ltd., Expirace 2007/12) – pro detekci a rozlišení laktosa-pozitivních a laktosa-negativních koliformních bakterií. Endova půda je v Evropě druhou nejužívanější půdou v diagnostice. Je růžové barvy, na světle však rychle mění barvu do tmavě červené, čímž se diagnosticky znehodnotí. Obsahuje laktózu a červené barvivo fuchsin pro inhibici grampozitivních bakterií. Fuchsin je odbarven siřičitanem a funguje tak jako Schiffovo reagens pro průkaz aldehydů, které vznikají při štěpení laktózy. Štěpí-li bakterie laktózu, tvoří tmavočervené

kolonie někdy s kovovým leskem Neštěpí-li, zůstávají kolonie světlé s nezměněným odstínem půdy. Grampozitivní bakterie na této půdě obvykle nerostou.

3.4.4 STANOVENÍ POČTU KVASINEK A PLÍSNÍ

Při stanovení se postupovalo podle normy **ČSN ISO 7954:1994 (56 0087)**.

Postup byl shodný jako v kapitole 3.5.1. Inkubace probíhla v termostatu při teplotě 25°C po dobu pěti dní.

Jako kultivační půda byl použit Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (výrobce: Hi-Media Laboratories Ltd., Expirace 2007/02). Chloramphenicol Yeast Glucose Agar je agar určený pro kultivaci kvasinek a plísní v potravinářských výrobcích. Růst mikromycet je umožněn obsahem glukózy jakožto zdroje uhlíku. Dále obsahuje chloramfenikol a termostabilní antibiotikum inhibující růst kontaminující bakteriální flóry. Kvasinky tvoří po 2 - 7 dnech kultivace kolonie, jejichž morfologie je závislá na použité kultivační teplotě. Kolonie vláknitých mikromycet se vytvářejí pomaleji (5-25 dní).

3.4.5 VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

K hodnocení byly vybrány petriho misky s nejvhodnějším ředěním (30 – 300 kolonií na misce) a spočítány počty kolonií na všech miskách tohoto ředění. Z opakování byl vypočten aritmetický průměr. Výsledné počty mikroorganismů byly vyjádřeny v CFU/g kůže, resp. log CFU/g kůže.

3.5 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ MIKROBIOLOGICKÝCH ROZBORŮ

Výsledky mikrobiologické analýzy byly vyhodnoceny za použití programu STATVYD verze 2.0 beta.

Pro srovnání úrovní zjištěných hodnot mikroorganismů mezi kontrolním vzorkem a vzorkem obsahujícím přísadky aditiv byl použit dvouvýběrový Wilcoxonův test. Wilcoxonův test patří k nejsilnějším neparametrickým testům. Zpravidla se jej využívá jakožto testu, který ověřuje, zda dva nezávislé náhodné výběry pocházejí z téhož základního souboru se spojitou distribuční funkcí. Proto je test často formulován jako ověření shody úrovně zkoumaného znaku ve dvou souborech, z nichž byly tyto nezávislé výběry pořízeny [44; 42].

Pro srovnání zjištěných hodnot mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování u jednotlivých testovaných skupin byl použit Kruskal-Wallisův test. Kruskal-Wallisův test

slouží k ověření shody úrovně spojitého sledovaného znaku v k nezávislých výběrech v případě, kdy není možné použít analýzu rozptylu jednoduchého třídění. Test se používá zejména v případě výběrů, které nemají normované normální rozdělení [43].

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

3.6 CHEMICKÁ ANALÝZA

3.6.1 MĚŘENÍ pH

POUŽITÝ PŘÍSTROJ – TECHNICKÁ DATA

pH-metr: GRYF 209 S - vpichový, digitální pH-metr

Výrobce: GRYF HB spol. s.r.o. - Havlíčkův Brod

Rozsah měření pH: 0 – 14 pH

Přesnost měření pH: $\pm 0,01$ pH ± 1 dig

Současně s mikrobiologickými rozbory bylo měřeno pH kůže chlazené drůbeže. Před samotným měřením byl pH-metr zkalibrován. Hodnota pH kůže byla měřena vždy před odebráním zkušebního vzorku k mikrobiologické analýze. Hodnota pH byla zjišťována vpichovým pH-metrem na povrchu kůže chlazené drůbeže. Kůže byla sterilními nůžkami nastříhnutá na předpokládaných místech měření. Elektroda byla ke kůži přiložena tak, aby byl zajištěn dotyk frity a povrchu kůže. Po ustálení byla odečtena z displeje hodnota naměřeného pH. U každého zkušebního vzorku bylo provedeno pět měření pH na různých místech, vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka výběru.

3.7 BAKTERIÁLNÍ IDENTIFIKACE

Úkolem identifikace bakteriální kultury je stanovení příslušnosti studovaného kmene k určité taxonomické skupině. Současné taxonomické schéma, které používá nejnovější poznatky, je Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Při identifikaci se sleduje několik skupin vlastností: morfologické, fyziologické a biochemické.

3.7.1 POUŽITÉ BIOCHEMICKÉ IDENTIFIKAČNÍ TESTY BAKTERIÍ

Výběr biochemických testů závisel na zařazení sledovaného kmene do určité skupiny, na základě morfologických a fyziologických vlastností. U všech kmenů byly provedeny

zvolené biochemické testy (KOH test, Voges - Proskauerův test a dále testy pro důkaz produkce katalázy, oxidázy a β -galaktozidázy). Tyto testy byly u vybraných kmenů doplněny vhodnými mikrotesty (ENTEROtest, NEFERMtest, STAPHYtest).

3.7.2 POSTUP A PRINCIP JEDNOTLIVÝCH BIOCHEMICKÝCH TESTŮ

Barvení podle Grama

Barvení podle Grama bylo provedeno standardním způsobem uvedeným v laboratorním manuálu Laboratorní cvičení z mikrobiologie [16]. Toto barvení je jedním z nejdůležitějších barvicích postupů aplikovaných při diagnostice bakterií. V podstatě jde o barvení fixovaného preparátu a následné moření buněk roztokem jodu, čímž vzniká komplex barvivo-jod-buněčné složky. Tento komplex lze z buněk některých druhů mikroorganismů vyplavit ethanolem nebo acetonem. Příslušné druhy jsou označovány jako gramnegativní (G-), jejich buněčné stěny jsou pro mikroskopická pozorování dobarvovány karbolfuchsinem. Pokud si buňky ponechávají zbarvení i po působení těchto rozpouštědel, jsou označovány jako grampozitivní (G+). Podstata grampozitivity není dodnes uspokojivě vysvětlena. Pravděpodobně se zde uplatňuje odlišné chemické složení buněčné stěny G+ a G- bakterií a její intaktnost.

KOH test

Gramovu reakci lze zjistit také pomocí testu s KOH. Tento test je založen na odlišném chemickém složení buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií. Silná peptidoglykanová vrstva buněčné stěny grampozitivních bakterií je vůči účinku louhu odolná a proto se nevytváří táhnoucí se viskózní hmota charakteristická pro gramnegativní bakterie [32].

Test byl proveden sklíčkovou metodou. Na podložní sklo byl nakápnut 2% roztok KOH a do něj za pomoci kličky rozetřena část bakteriální kolonie. Při pomalém odtahování kličky směrem vzhůru bylo sledováno, zda se vytváří viskózní hmota táhnoucí se ve formě nitky.

Důkaz produkce oxidázy

OXItest je individuální test pro detekci cytochromoxidázy. Přítomnost cytochromoxidázy je detekována barevnou reakcí N,N-dimethyl-1,4-fenylendiaminu s α -naftolem za vzniku indofenolové modři. Test se používá k diferenciaci druhů a rodu *Pseudomonas*, *Alcaligenes* a *Flavobacterium* [16].

Test důkazu produkce oxidázy byl proveden za pomoci diagnostických proužků OXItest vyrobených a dodávaných firmou PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o. Očkovací kličkou byla odebrána izolovaná kolonie testovaného kmene a vetřena do impregnované zóny proužku. Barevná reakce byla odečtena do jedné minuty. Při pozitivní reakci byla výsledná barva impregnované zóny modrá.

Důkaz produkce katalázy

Důkaz produkce katalázy je založen na faktu, že při některých biochemických procesech vzniká toxický peroxid vodíku. Některé bakterie mají schopnost produkovat enzym katalázu, který rozkládá H_2O_2 na vodu a molekulární kyslík. Anaerobní bakterie většinou tento enzym netvoří [16].

Test byl proveden sklíčkovou metodou. Na podložní sklíčko byl nakápnut 3% peroxid vodíku a do kapky kličkou rozetřena testovaná 24 hodinová kultura. Následně bylo sledováno zda se bezprostředně po přidání kultury uvolňují bublinky O_2 .

Důkaz produkce β -galaktozidázy

Testem je zjišťována produkce enzymu β -galaktosidázy. Tvorba enzymu se detekuje na syntetickém substrátu o-nitrofenylgalaktosidu, který působením enzymové hydrolýzy uvolňuje žlutě zbarvený nitrofenol [32] [16].

K provedení testu bylo použito diagnostických proužků ONPtest firmy PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o. Proužek byl vložen do suspenze testovaného kmene ve fyziologickém roztoku a inkuboval se v termostatu. Pozitivní reakce byla detekována žlutým zbarvením.

Voges - Proskauerův test

Tato reakce nazvaná podle svých objevitelů je určena pro detekci produkce acetoinu (diacetylu), meziprojektu rozkladu glukózy. Průkaz se provádí pomocí α -naftolu a KOH (případně pomocí detekčních proužků). Pozitivní reakce se projeví jako zčervenání asi do 20 minut. Reakce je typická pro rod *Enterobacter* [32].

Test byl proveden za pomoci detekčních proužků firmy PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o. Proužek VPtestu byl vložen do suspenze testovaného kmene ve fyziologickém roztoku a inkubován v termostatu. Po uplynutí inkubační doby se k suspenzi s proužkem přikápllo činidlo pro VPT I a činidlo pro VPT II. V případě tvorby acetoinu se objevilo červené zbarvení.

Identifikace gramnegativních střevních tyčků pomocí TSI

Triple Sugar Iron (TSI) Agar je médium používané pro identifikaci gramnegativních střevních tyčků. Médium obsahuje zejména tři cukry (glukózu, laktózu a sacharózu), síran železnatý a pH indikátor (fenolovou červeň). Výsledná barevná reakce závisí na schopnosti bakterií zkvašovat jednotlivé cukry a dále na tvorbě CO₂ a H₂S [89].

Test byl proveden zkumavkově. Zkumavky s šikmým agarem byly naočkovány testovanou kulturou. Inkubace probíhala po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Poté byla vyhodnocena barevná reakce.



Obr. 5. Fotografie znázorňuje výsledné barevné změny na médiu Triple Sugar Iron Agar které mohou být viditelné při identifikaci gram-negativních střevních tyčků

3.7.2 ID
EN

TIFIKACE POMOCÍ STANDARDIZOVANÝCH TESTOVACÍCH SYSTÉMŮ

Identifikace gramnegativních fermentujících tyčků

Souprava ENTEROtest 24 je určena pro definitivní identifikaci bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* a *Vibrionaceae* izolovaných na Endově či Levinově agaru. Pro odlišení kmenů čeledi *Vibrionaceae* (rody *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*) se provádí oxidázový test. Souprava umožňuje provedení 24 biochemických testů: IND (Indol), H₂S (Sirovodík), LYS (Lysin), ORN (Ornithin), URE (Ureáza), ARG (Arginin), SCI (Simmons citrát), MAL (Malonát), PHE (Fenylalanin), ONP (β-Galaktosidáza), INO (Inositol), ADO (Adonitol),

CEL (Cellobióza), SUC (Sacharóza), TRE (Trehalóza), MAN (Mannitol), VPT (Acetoin), ESL (Eskulin), SOR (Sorbitol), RHA (Rhamnóza), MLB (Melibióza), RAF (Raffinóza), DUL (Dulcitol) a GLU (Glukóza).

Identifikace gramnegativních nefermentujících bakterií

Souprava NEFERMtest 24 je určena pro identifikaci gramnegativních nefermentujících bakterií, izolovaných ať už z klinického materiálu, z vody nebo z potravin. Pomocí soupravy lze též provést identifikaci nejběžnějších zástupců oxidáza pozitivních fermentujících gramnegativních tyček. Souprava obsahuje 24 biochemických testů: IND (Indol), ARG (Arginin), URE (Ureáza), LYS (Lysin), GLU (Glukóza), FRU (Fruktóza), INO (Inositol), SUC (Sacharóza), PHS (Fosfatáza), bGA ((β -Galaktosidáza), bGL (β -Glukosidáza), NAG (N-Acetyl- β -Glukosaminidáza), MAN (Mannitol), XYL (Xylóza), CEL (Cellobióza), GAL (Galaktóza), NO₃ (Nitráty), NO₂ (Nitrity), ESL (Eskulin), GGT (γ -Glutamyl transferáza), LAC (Laktóza), MLT (Maltóza), TRE (Trehalóza) a SCI (Simmons citrát).

Identifikace zástupců rodu *Staphylococcus*

Souprava STAPHYtest 16 je souprava určena pro identifikaci zástupců rodu *Staphylococcus*. Souprava obsahuje 16 biochemických testů: URE (Ureáza), ARG (Arginin), ORN (Ornitin), GAL (β -Galaktosidáza), GLR ((β -Glukuronidáza), ESL (Eskulin), NIT (Nitráty), PHS (Fosfatáza), GAL (Galaktóza), SUC (Sacharóza), TRE (Trehalóza), MAN (Mannitol), XYL (Xylóza), MLT (Maltóza), MNS (Mannóza) a LAC (Laktóza).

3.7.3 VYHODNOCENÍ BIOCHEMICKÝCH TESTŮ

K vyhodnocení výsledků biochemických testů bylo kromě diferenční tabulky, indexu profilů a diagnostických registrů, použito identifikačního programu TNW-Lite, který dodává firma Lachema. Tento program využívá metody numerické identifikace. Obsahuje identifikační matice pro diferenciaci: enterobakterií; aeromonád a vibrií; stafylokoků a mikokoků; enterokoků a streptokoků; gramnegativních nefermentujících tyček; anaerobních bakterií a koryneformních bakterií. Výhodou identifikačního programu TNW-Lite je nejen rychlost a spolehlivost identifikace ale zejména standardnost interpretace dosažených výsledků.

4 VÝSLEDKY

V experimentální části byl zkoumán vliv přídavku kyseliny citronové a kyseliny mléčné na prodloužení údržnosti chlazené drůbeže. Veškeré experimenty byly provedeny ve dvou fázích. V první fázi pokusů bylo aplikováno 15 ± 2 ml roztoku kyseliny. Ve druhé fázi pokusů bylo celkové aplikované množství roztoku navýšeno o 5 ml, tedy na výsledné množství 20 ± 2 ml roztoku kyseliny. Naměřené výsledky jsou uvedeny ve formě tabulek a grafů a diskutovány v následující kapitole. V příslušných grafech je každá indikátorová skupina odlišena jinou barvou (aerobní mezofilní mikroorganismy – modrá, koliformní bakterie – červená, kvasinky a plísňe – zelená). Se zvyšující se koncentrací aplikovaného roztoku je intenzivnější odstín příslušné barvy.

4.1 ÚČINEK KYSELINY CITRONOVÉ

4.1.1 ÚČINEK KYSELINY CITRONOVÉ (aplikované množství 15 ± 2 ml)

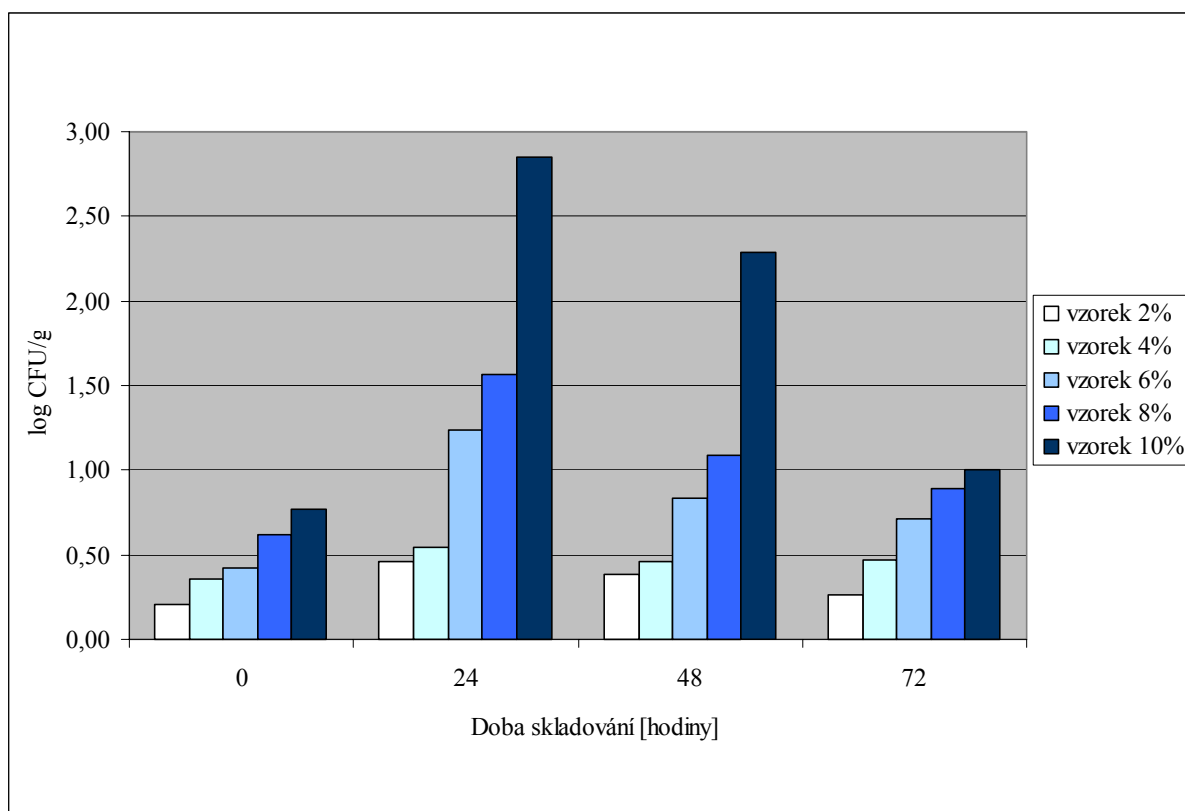
Vliv jednotlivých koncentrací kyseliny citronové, při aplikovaném množství 15 ± 2 ml, na údržnost chlazených kuřat je zachycen v tabulkách (*Tab. 10, Tab. 11, Tab. 12*). Z těchto hodnot byl vypočítán úbytek mikroorganismů (v log CFU/g kůže) u jednotlivých testovaných skupin oproti kontrolním vzorkům, který byl vyneseno do grafů podle indikátorových skupin (viz. *Obr. 6, Obr. 7, Obr. 8*).

Tabulka (*Tab. 10*) shrnuje celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů, které byly vykultivovány z povrchu chlazené drůbeže u jednotlivých testovaných skupin (aplikace 2, 4, 6, 8, a 10hm.% kyseliny citronové) a současně u kontrolních vzorků.

Roztok 2hm.% kyseliny citronové má nejmenší vliv na úbytek aerobních mezofilních mikroorganismů. Během celé doby skladování nedosahuje ani desetinásobku redukce počtu mezofilních mikroorganismů ve srovnání s kontrolou. Nejsilnější antimikrobiální účinek má 10hm.% roztok kyseliny. Maxima dosahuje po 24 hodinách chladírenského skladování, kde je redukce počtu mezofilních mikroorganismů oproti kontrole téměř tisícnásobná (viz. *Obr. 6*).

Tab. 10. Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 15±2 ml kyseliny citronové)

Doba skladování [hodiny]	log CFU/g kůže									
	Roztok kyseliny citronové [hm.%]					Kontroly k testovaným skupinám				
	2	4	6	8	10	K2	K4	K6	K8	K10
0	4,21	4,18	3,90	3,63	3,44	4,41	4,53	4,32	4,26	4,20
24	4,88	4,98	4,08	3,65	3,73	5,34	5,52	5,31	5,22	5,29
48	6,04	5,75	5,87	5,15	5,16	6,42	6,21	6,70	6,23	6,68
72	7,18	6,90	6,92	6,57	6,46	7,45	7,37	7,63	7,47	7,50

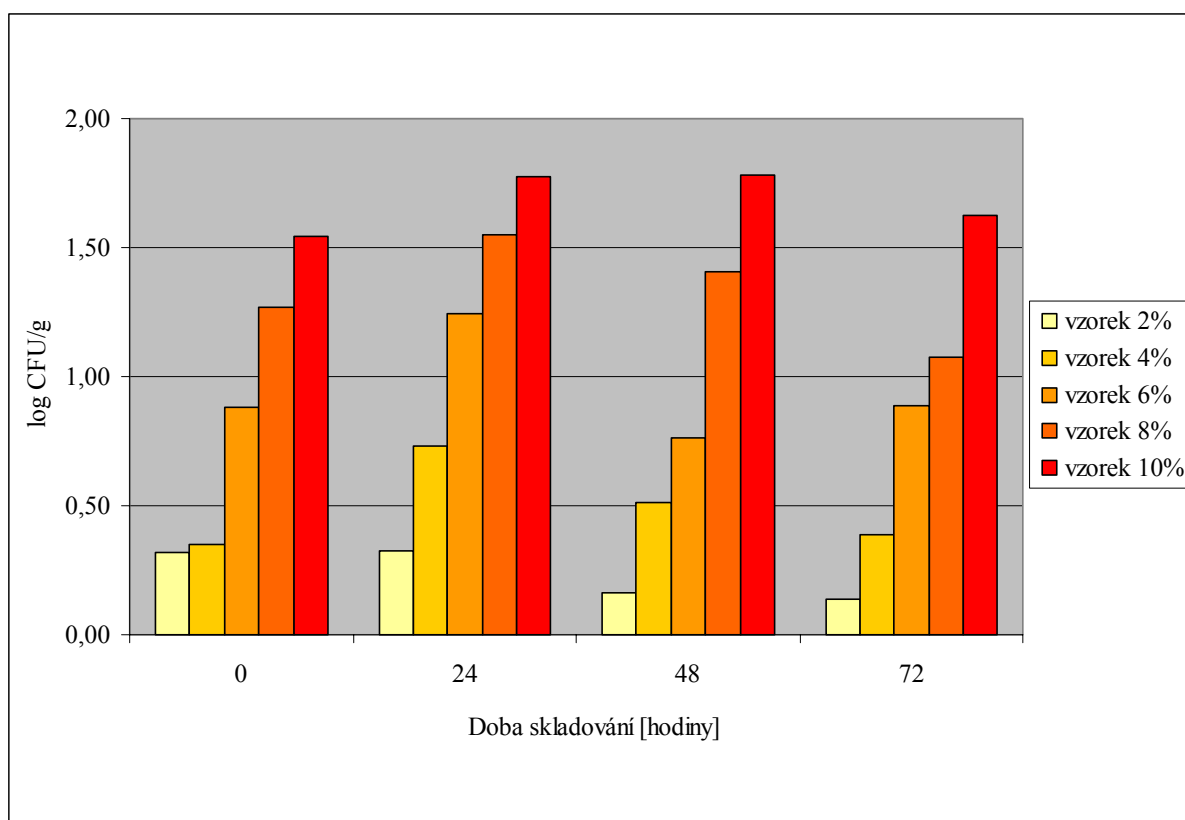


Obr. 6. Závislost úbytku aerobních mezofilních mikroorganismů na době skladování - působení pěti koncentrací kyseliny citronové (aplikované množství 15±2 ml)

Tabulka (Tab. 11) uvádí vliv přidavku kyseliny citronové na počty koliformních bakterií na povrchu kuřat během chladírenského skladování. Z obrázku (Obr. 7) je zřejmé, že antibakteriální účinek kyseliny citronové vůči koliformním bakteriím je srovnatelný nebo vyšší, než u mezofilních bakterií. Kyselina citronová měla výrazný vliv na úbytek koliformních bakterií již krátce po aplikaci. Roztok 2hm.% kyseliny citronové má opět nejnižší účinek. Významný je vliv 8 a 10hm.% roztoku kyseliny, který se po celou dobu skladování pohybuje v rozmezí 1,0 až 2,0 log redukce.

Tab. 11. Celkové počty koliformních bakterií vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 15±2 ml kyseliny citronové)

Doba skladování [hodiny]	log CFU/g kůže									
	Roztok kyseliny citronové [hm.%]					Kontroly k testovaným skupinám				
	2	4	6	8	10	K2	K4	K6	K8	K10
0	3,32	3,11	2,69	2,50	2,12	3,64	3,46	3,57	3,77	3,66
24	4,72	3,88	3,36	3,02	2,87	5,04	4,61	4,60	4,57	4,64
48	6,23	5,59	5,76	5,20	4,74	6,39	6,10	6,52	6,61	6,52
	7,49	6,87	6,78	6,54	6,04	7,62	7,25	7,66	7,61	7,67

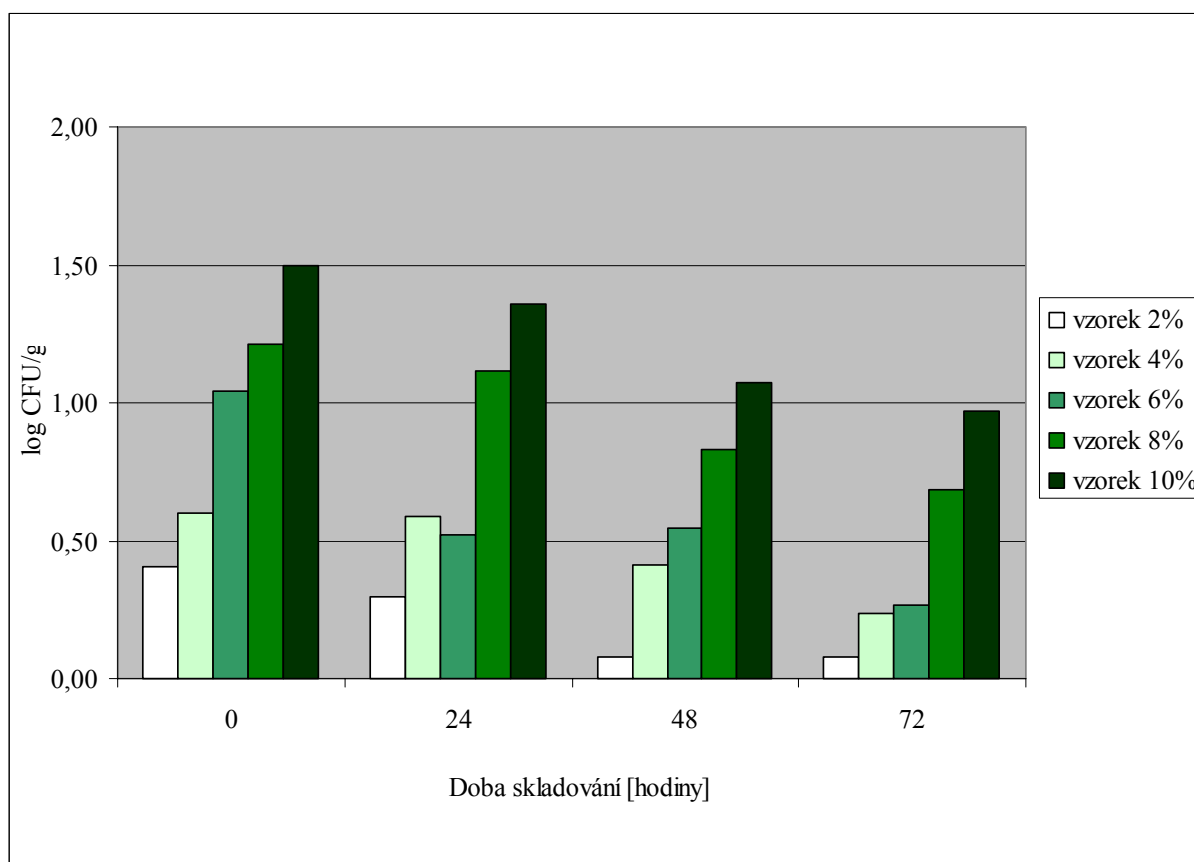


Obr. 7. Závislost úbytku koliformních bakterií na době skladování - působení pěti koncentrací kyseliny citronové (aplikované množství 15±2 ml)

Tabulka (Tab. 12) uvádí vliv kyseliny citronové na počty kvasinek a plísní v průběhu chladírenského skladování. Antimikrobiální efekt kyseliny citronové na kvasinky a plísně se po celou dobu chladírenského skladování pohybuje pod hranicí 1,5 log redukce celkového počtu. V případě 2 a 4hm.% roztoku kyseliny nedosahuje téměř ani 0,5 log redukce ve srovnání s kontrolou (viz. Obr. 8).

Tab. 12. Celkové počty kvasinek a plísní vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 15±2 ml kyseliny citronové)

Doba skladování [hodiny]	log CFU/g kůže									
	Roztok kyseliny citronové [hm. %]					Kontroly k testovaným skupinám				
	2	4	6	8	10	K2	K4	K6	K8	K10
0	3,18	2,63	2,33	2,07	1,96	3,59	3,23	3,37	3,29	3,46
24	4,69	4,16	4,34	3,85	3,59	4,98	4,75	4,86	4,97	4,95
48	6,15	5,75	6,01	5,50	5,14	6,23	6,16	6,55	6,33	6,21
	7,34	7,26	7,21	6,70	6,09	7,42	7,50	7,48	7,39	7,06



Obr. 8. Závislost úbytku kvasinek a plísní na době skladování - působení pěti koncentrací kyseliny citronové (aplikované množství 15±2 ml)

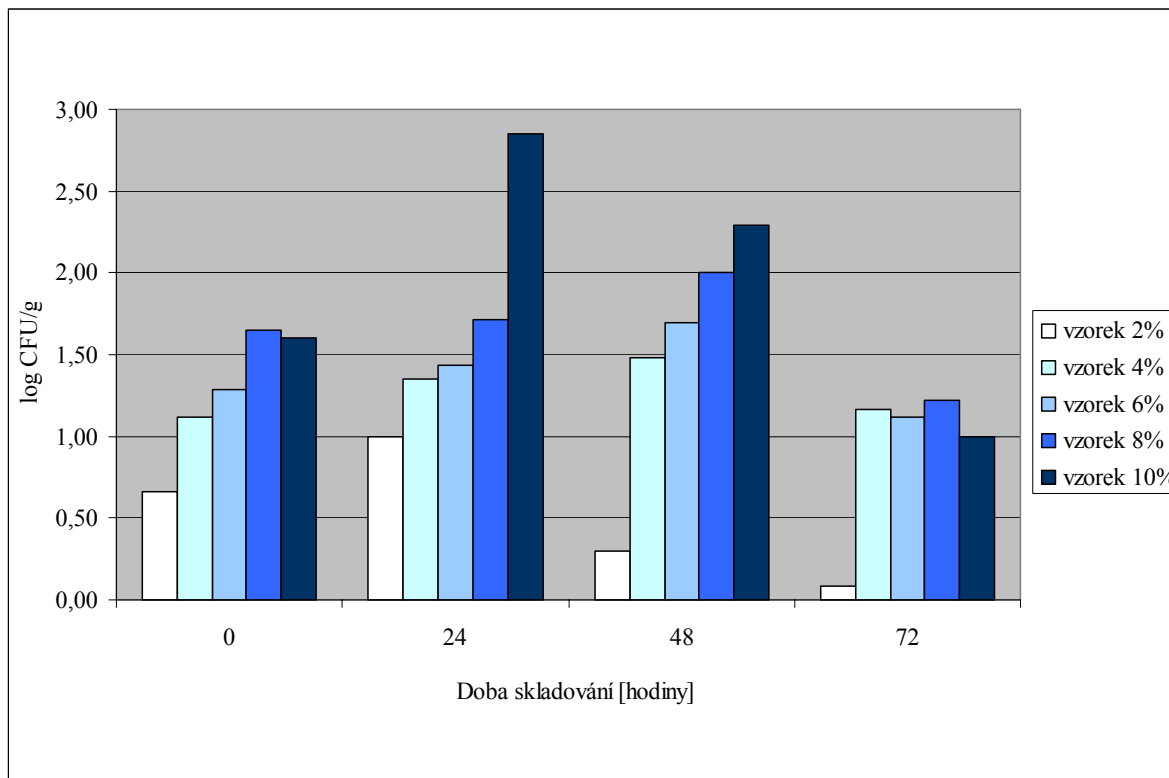
4.1.2 ÚČINEK KYSELINY CITRONOVÉ (aplikované množství 20±2 ml)

Ve druhé fázi pokusů bylo navýšeno množství aplikovaného roztoku kyseliny o 5 ml, tedy na celkové množství 20±2 ml. Výsledkem bylo signifikantní zvýšení účinnosti kyseliny citronové. Zejména vůči mezofilním mikroorganismům a koliformním bakteriím (viz. Obr. 9 a Obr. 10). Redukce počtu mezofilních mikroorganismů se v průměru zvýšila o 0,5 log,

ve srovnání s první fází pokusů (viz. *Tab. 13* a *Obr. 28*). Přídavek kyseliny citronové se výrazně projevil na snížení počtu koliformních bakterií (viz. *Tab. 14* a *Obr. 29*). Nejvýraznější byl vliv 10hm.% kyseliny kde redukce, v prvním dni skladování, dosáhla téměř dvojnásobku oproti výsledkům z první fáze pokusů. Významný byl také inhibiční účinek 6 a 8hm.% kyseliny na koliformní bakterie. Celkové počty kvasinek a plísní nebyly účinkem většího množství kyseliny citronové statisticky významně ovlivněny (viz. *Tab. 15*, *Obr. 11* a *Obr. 30*).

Tab. 13. Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 20±2 ml kyseliny citronové)

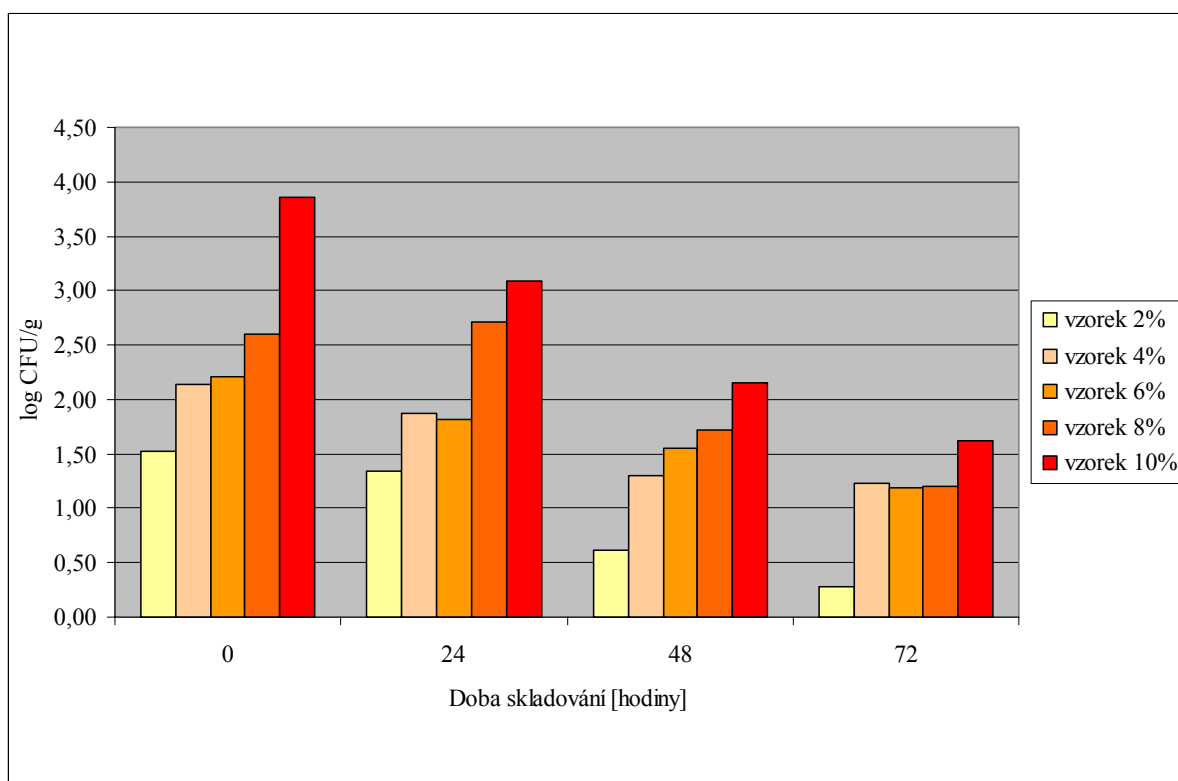
Doba skladování [hodiny]	log CFU/g kůže									
	Roztok kyseliny citronové [hm.%]					Kontroly k testovaným skupinám				
	2	4	6	8	10	K2	K4	K6	K8	K10
0	3,94	3,44	3,09	3,14	2,97	4,60	4,55	4,37	4,79	4,58
24	4,59	4,25	4,04	3,93	3,24	5,59	5,60	5,48	5,64	5,72
48	6,63	5,52	5,16	5,40	5,10	6,93	7,01	6,85	7,41	7,43
72	7,47	6,02	6,36	6,36	6,22	7,55	7,19	7,48	7,58	7,96



Obr. 9. Závislost úbytku aerobních mezofilních mikroorganismů na době skladování - působení pěti koncentrací kyseliny citronové (aplikované množství 20±2 ml)

Tab. 14. Celkové počty koliformních bakterií vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 20±2 ml kyseliny citronové)

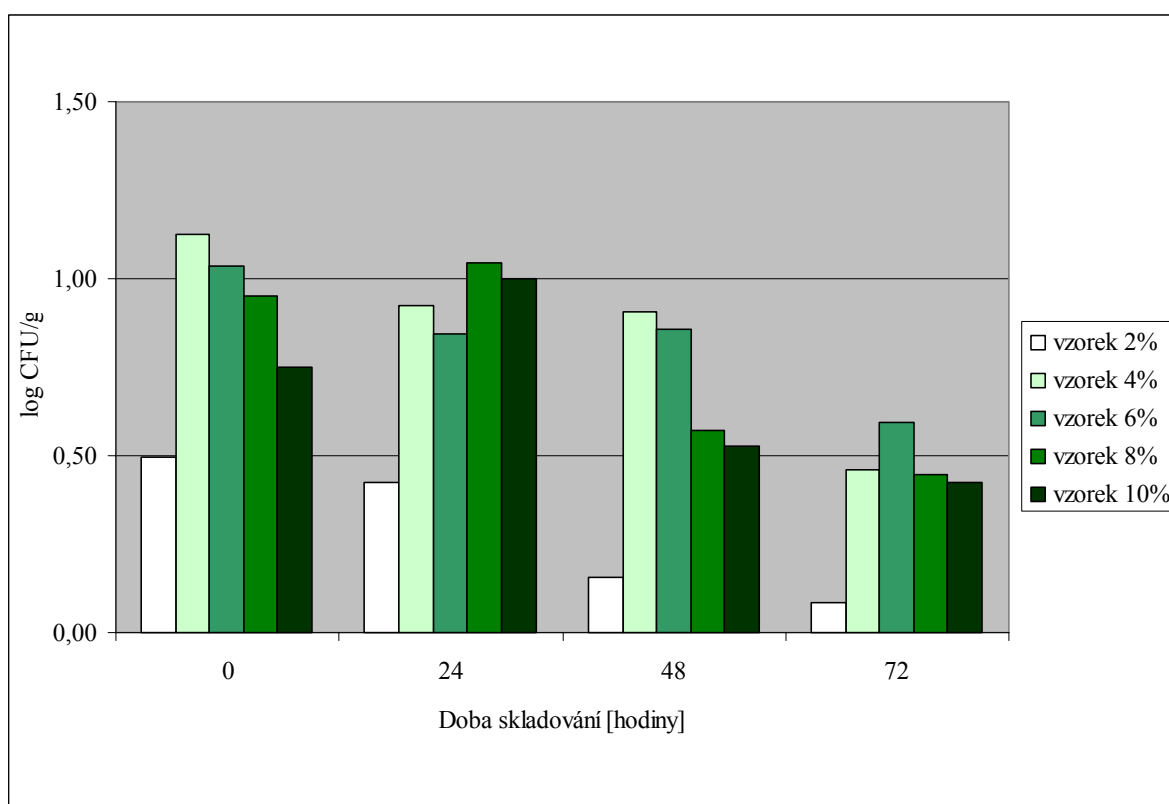
Doba skladování [hodiny]	log CFU/g kůže									
	Roztok kyseliny citronové [hm.%]					Kontroly k testovaným skupinám				
	2	4	6	8	10	K2	K4	K6	K8	K10
0	2,34	1,70	1,68	1,69	0,00	3,87	3,84	3,90	4,29	3,86
24	4,24	3,31	3,31	3,16	2,45	5,58	5,18	5,12	5,86	5,54
48	6,10	5,47	5,17	5,22	4,83	6,72	6,77	6,72	6,94	6,98
	7,11	6,28	6,61	6,62	6,52	7,39	7,51	7,80	7,82	8,15



Obr. 10. Závislosti úbytku koliformních bakterií na době skladování - působení pěti koncentrací kyseliny citronové (aplikované množství 20±2 ml)

Tab. 15. Celkové počty kvasinek a plísni vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 20±2 ml kyseliny citronové)

Doba skladování [hodiny]	log CFU/g kůže									
	Roztok kyseliny citronové [hm.%]					Kontroly k testovaným skupinám				
	2	4	6	8	10	K2	K4	K6	K8	K10
0	3,35	2,88	2,89	3,28	3,17	3,85	4,00	3,93	4,23	3,92
24	4,37	4,29	4,28	4,52	4,41	4,79	5,22	5,12	5,57	5,41
48	6,43	5,24	5,46	5,95	5,90	6,55	6,15	6,31	6,52	6,43
	7,27	6,54	6,77	7,32	7,15	7,25	7,00	7,36	7,53	7,43



Obr. 11. Závislost úbytku kvasinek a plísni na době skladování - působení pěti koncentrací kyseliny citronové (aplikované množství 20±2 ml)

4.2 SLEDOVÁNÍ VLIVU SMĚSÍ ORGANICKÝCH KYSELIN - PILOTNÍ POKUS

4.2.1 SLEDOVÁNÍ VLIVU SMĚSÍ ORGANICKÝCH KYSELIN

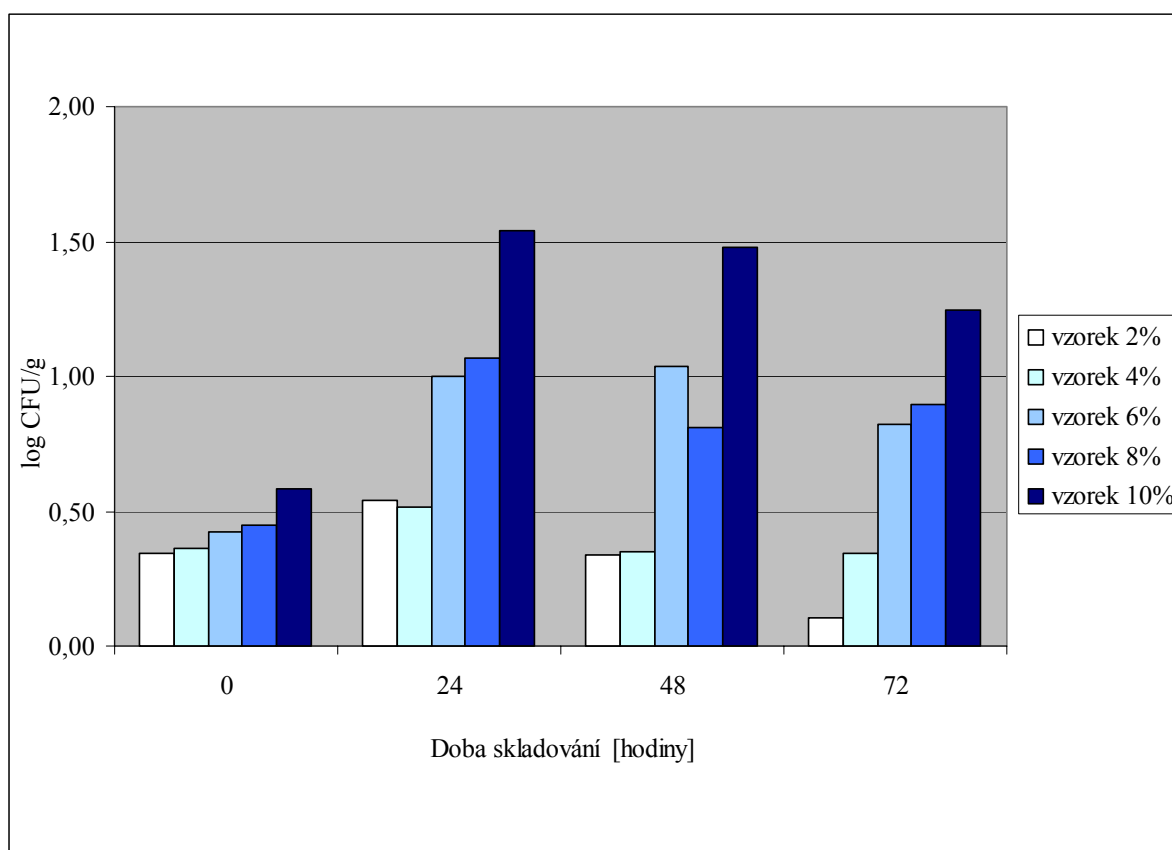
(aplikované množství 15±2 ml)

Vliv přidavku směsi organických kyselin na celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů uvádí tabulka (Tab. 16). Nejvýraznější redukce počtu mezofilních

mikroorganismů je viditelná u 10hm.% roztoku kyseliny citronové ve směsi s kyselinou mléčnou (viz. Obr. 12). Redukce počtu mezofilních mikroorganismů se u 6 a 8hm.% roztoku kyseliny citronové ve směsi udržuje téměř po celou dobu skladování na desetinásobku. U ostatních koncentrací se redukce pohybuje pod 0,5 log.

Tab. 16. Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 15±2 ml směsí organických kyselin)

Doba skladování [hodiny]	log CFU/g kůže									
	Směs kyseliny citronové [hm.%] a 1obj.% kyseliny mléčné					Kontroly k testovaným skupinám				
	2	4	6	8	10	K2	K4	K6	K8	K10
0	4,15	4,28	4,08	4,04	3,96	4,49	4,64	4,51	4,49	4,54
24	4,84	4,97	4,04	4,62	4,04	5,38	5,49	5,04	5,69	5,58
48	6,23	5,80	5,53	6,76	5,86	6,57	6,15	6,57	7,57	7,34
72	7,18	7,18	6,18	7,08	6,59	7,28	7,52	7,00	7,97	7,84



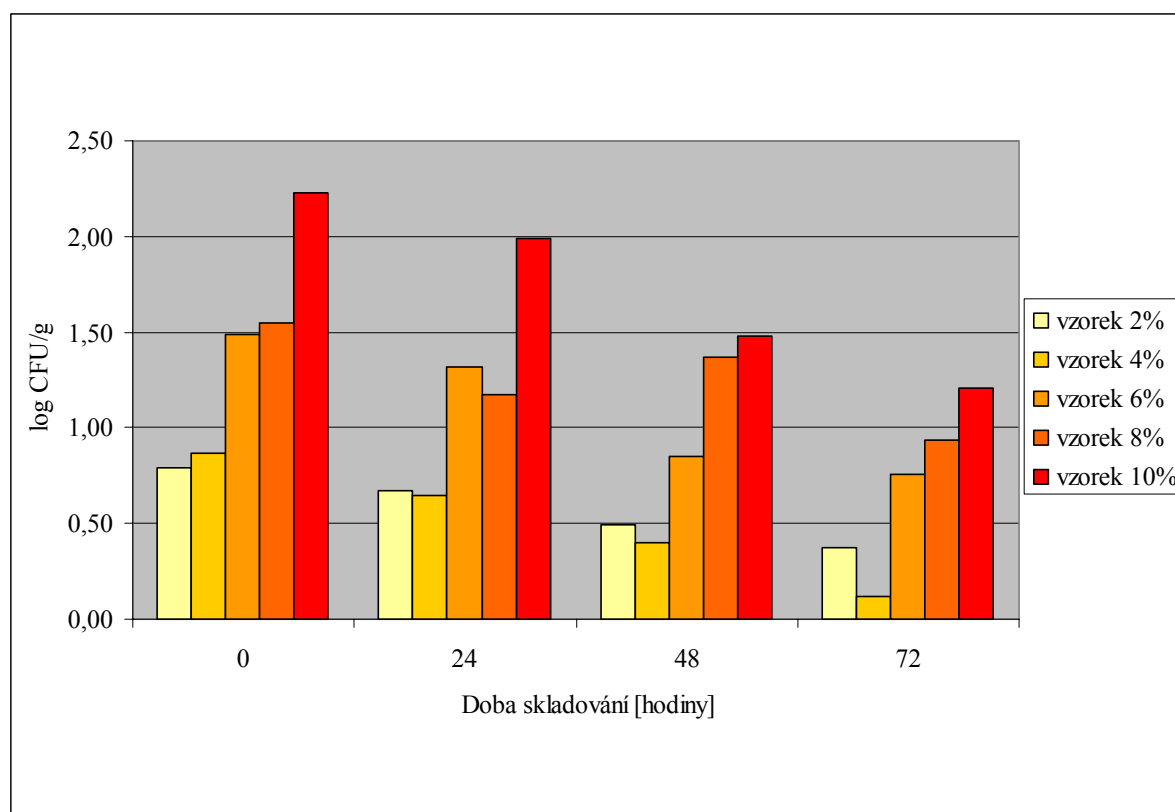
Obr. 12. Závislost úbytku aerobních mezofilních mikroorganismů na době skladování - působení pěti koncentrací směsí organických kyselin (aplikované množství 15±2 ml)

Celkové počty koliformních bakterií po aplikaci směsí organických kyselin uvádí tabulka (Tab. 17). Výrazný inhibiční účinek na koliformní bakterie mají 6, 8 a 10hm.%

roztok kyseliny citronové ve směsi s kyselinou mléčnou. Jejich redukce se během prvního a druhého dne skladování pohybuje v rozmezí 1,0 až 2,5 log (viz. Obr. 13). Inhibiční účinek roztoku 2 a 4hm.% kyseliny citronové ve směsi nedosahuje ani desetinásobku redukce ve srovnání s kontrolními vzorky.

Tab. 17. Celkové počty koliformních bakterií vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 15 ± 2 ml směsí organických kyselin)

Doba skladování [hodiny]	log CFU/g kůže									
	Směs kyseliny citronové [hm.%] a 1obj.% kyseliny mléčné					Kontroly k testovaným skupinám				
	2	4	6	8	10	K2	K4	K6	K8	K10
0	3,46	3,59	1,69	2,26	2,00	4,26	4,46	3,18	3,81	4,23
24	4,88	4,72	3,94	4,34	3,76	5,56	5,36	5,26	5,52	5,75
48	6,65	6,20	5,62	5,93	5,36	7,15	6,60	6,48	7,30	6,84
72	7,11	7,20	6,87	6,96	6,57	7,49	7,32	7,62	7,90	7,78

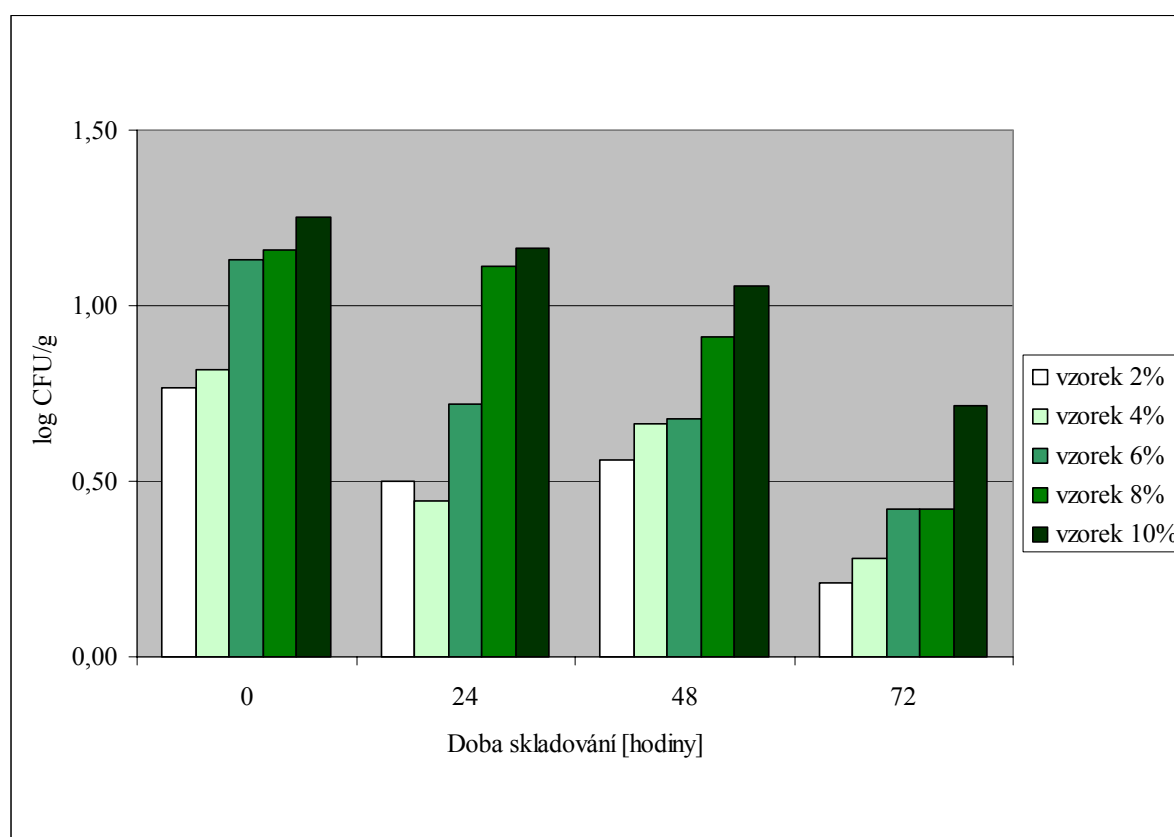


Obr. 13. Závislost úbytku koliformních bakterií na době skladování - působení pěti koncentrací směsí organických kyselin (aplikované množství 15 ± 2 ml)

Vliv směsí organických kyselin na kvasinky a plísně dosahuje maximálně desetinásobné redukce. Nižší koncentrace směsí kyselin se pohybují téměř po celou dobu skladování okolo 0,5 log redukce (viz. Tab. 18 a Obr. 14).

Tab. 18. Celkové počty kvasinek a plísní vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 15±2 ml směsí organických kyselin)

Doba skladování [hodiny]	log CFU/g kůže									
	Směs kyseliny citronové [hm. %] a 1obj. % kyseliny mléčné					Kontroly k testovaným skupinám				
	2	4	6	8	10	K2	K4	K6	K8	K10
0	3,61	3,64	3,30	3,53	3,15	4,38	4,46	4,43	4,69	4,40
24	4,36	4,90	4,84	4,48	4,41	4,86	5,34	5,56	5,59	5,58
48	6,32	6,41	6,77	6,89	6,57	6,88	7,08	7,45	7,80	7,62
72	7,32	7,08	6,00	7,45	7,04	7,53	7,36	6,41	7,87	7,76



Obr. 14. Závislost úbytku kvasinek a plísní na době skladování - působení pěti koncentrací směsí organických kyselin (aplikované množství 15±2 ml)

4.2.2 SLEDOVÁNÍ VLIVU SMĚSÍ ORGANICKÝCH KYSELIN

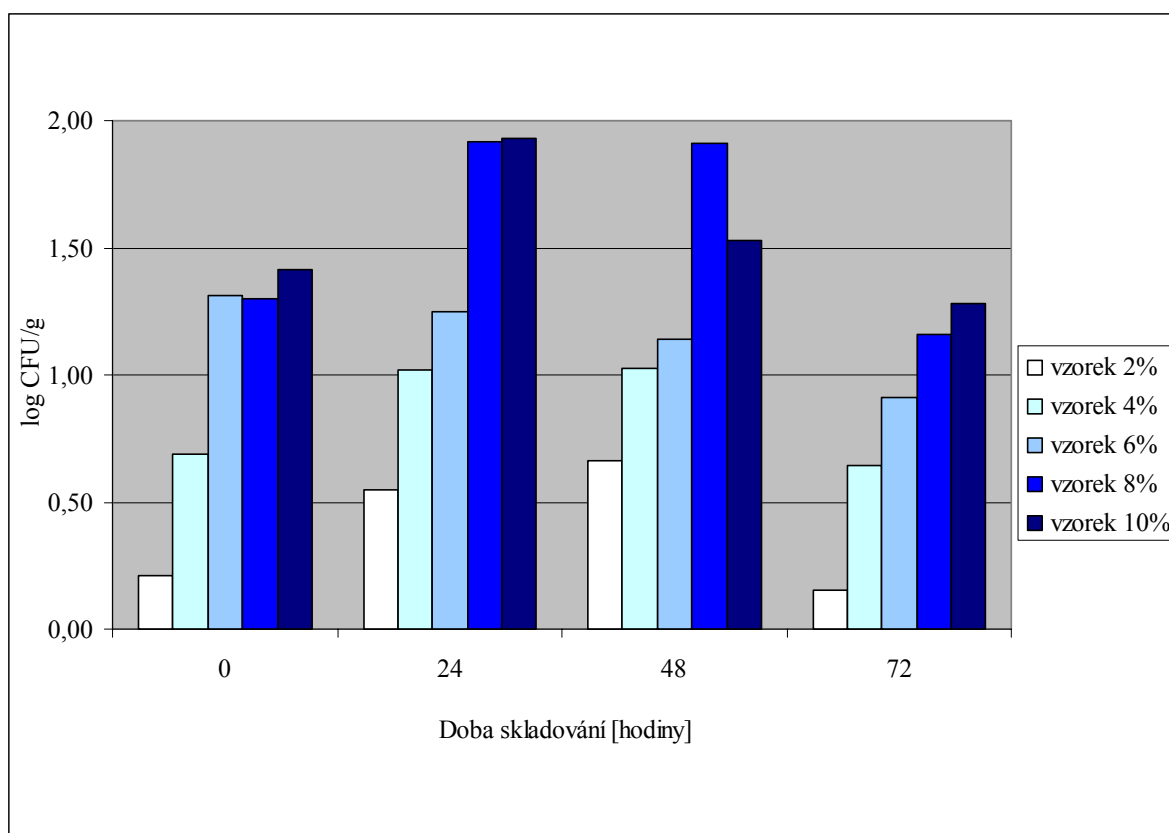
(aplikované množství 20±2 ml)

V následujícím pokusu, který navazuje na sledování vlivu organických kyselin (tedy směsí kyseliny citronové a mléčné), bylo opět při ošetření chlazené drůbeže aplikováno celkové množství 20±2 ml roztoku směsi.

Tabulka (Tab. 19) uvádí celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů v průběhu chladírenského skladování. Redukce počtu mezofilních mikroorganismů oproti kontrole dosáhla u 8 a 10hm.% roztoku kyseliny citronové ve směsi s kyselinou mléčnou 2,0 log (viz. Obr. 15, Obr. 31 a Obr. 32). V případě 2 a 4hm.% roztoku kyseliny citronové ve směsi bylo dosaženo maximálně desetinásobné redukce počtu mezofilních mikroorganismů.

Tab. 19. Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 20±2 ml směsí organických kyselin)

Doba skladování [hodiny]	log CFU/g kůže									
	Směs kyseliny citronové [hm.%] a 1obj.% kyseliny mléčné					Kontroly k testovaným skupinám				
	2	4	6	8	10	K2	K4	K6	K8	K10
0	4,00	3,81	2,99	3,04	2,89	4,20	4,49	4,30	4,34	4,30
24	4,45	3,86	3,72	3,46	3,72	5,00	4,88	4,97	5,38	5,64
48	5,41	5,20	5,32	4,58	4,70	6,08	6,23	6,46	6,49	6,23
	6,89	6,61	6,70	5,58	5,40	7,04	7,26	7,61	6,74	6,68

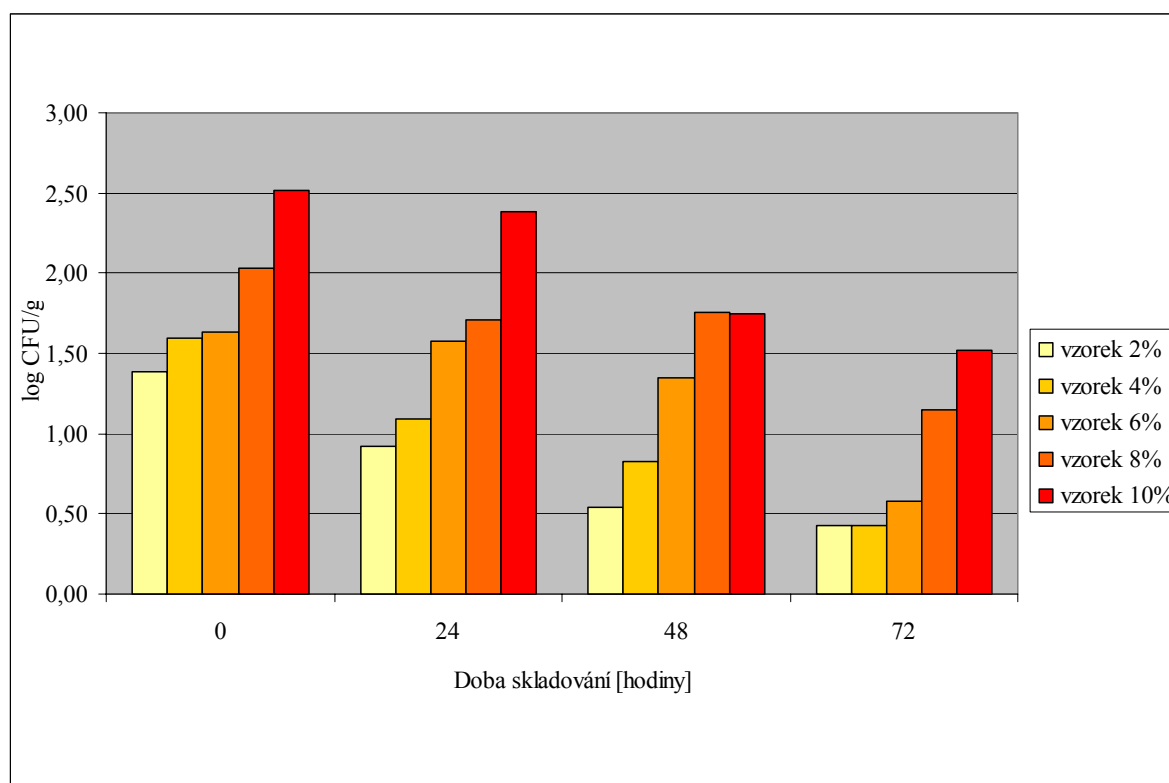


Obr. 15. Závislost úbytku aerobních mezofilních mikroorganismů na době skladování – působení pěti koncentrací směsi organických kyselin (aplikované množství 20±2 ml)

Roztok 10hm.% kyseliny citronové ve směsi má nejvýznamnější antibakteriální vliv na koliformní bakterie. Redukce počtu koliformních bakterií se u ostatních koncentrací směsi organických kyselin pohybuje mezi 0,5 až 2,0 log. Podrobnější informace udává tabulka (Tab. 20), a grafické znázornění redukce počtu mikroorganismů vůči kontrole obrázek (Obr. 16, Obr. 33 a Obr. 34).

Tab. 20. Celkové počty koliformních bakterií vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 20±2 ml směsi organických kyselin)

Doba skladování [hodiny]	log CFU/g kůže									
	Směs kyseliny citronové [hm.%] a 1obj.% kyseliny mléčné					Kontroly k testovaným skupinám				
	2	4	6	8	10	K2	K4	K6	K8	K10
0	1,99	2,00	1,91	1,36	1,08	3,38	3,59	3,54	3,40	3,59
24	3,08	2,90	2,60	2,69	2,08	4,00	3,99	4,18	4,40	4,46
48	5,34	5,00	5,15	4,23	3,86	5,89	5,82	6,49	5,98	5,61
72	6,52	6,41	6,36	5,30	4,48	6,94	6,85	6,94	6,45	6,00



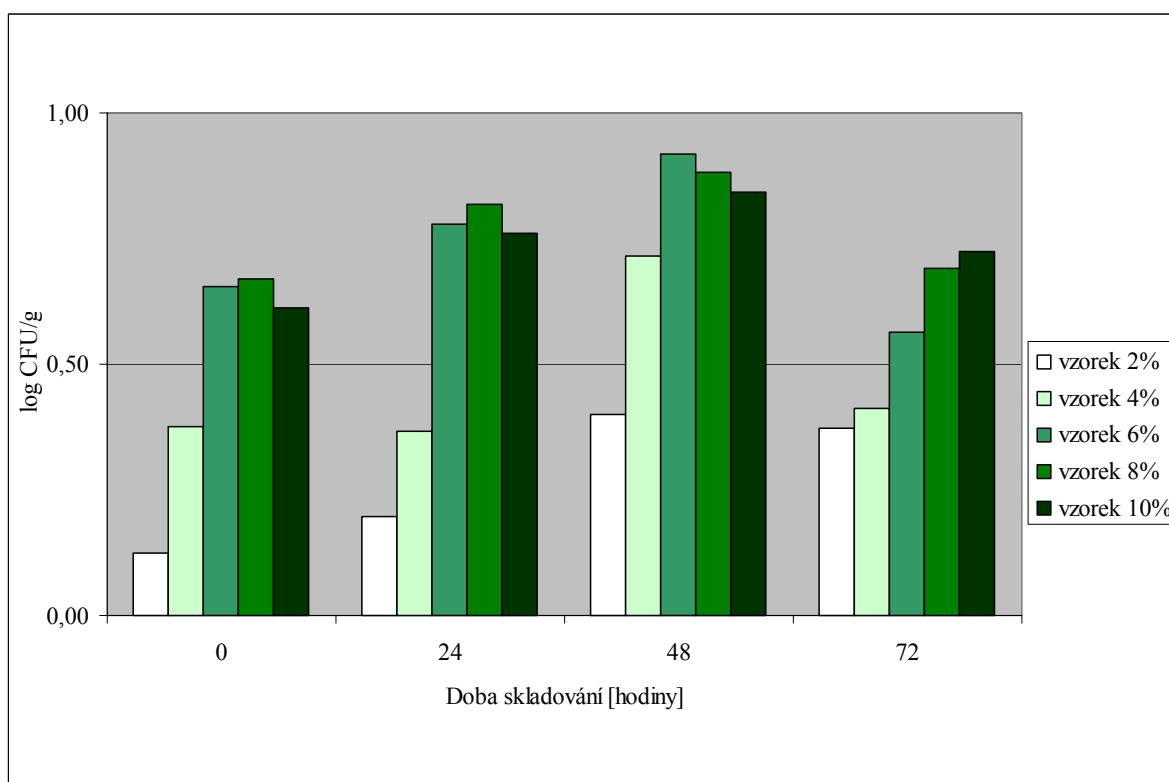
Obr. 16. Závislost úbytku koliformních bakterií na době skladování - působení pěti koncentrací směsi organických kyselin (aplikované množství 20±2 ml)

Antimikrobiální efekt směsi organických kyselin na redukci počtů kvasinek a plísní je podstatně menší než u předchozích indikátorových skupin. Roztok 6, 8 a 10hm.%

kyseliny citronové ve směsi s kyselinou mléčnou má téměř shodný vliv na celkové počty kvasinek a plísni. Redukce u těchto koncentrací byla po celou dobu skladování vyrovnaná a pohybovala v rozpětí 0,5 až 1,0 log. Přesné hodnoty poskytuje tabulka (Tab. 21) a grafické znázornění obrázky (Obr. 17, Obr. 35 a Obr. 36).

Tab. 21. Celkové počty kvasinek a plísni vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 20 ± 2 ml směsi organických kyselin)

Doba skladování [hodiny]	log CFU/g kůže									
	Směs kyseliny citronové [hm.%] a 1obj.% kyseliny mléčné					Kontroly k testovaným skupinám				
	2	4	6	8	10	K2	K4	K6	K8	K10
0	3,18	2,77	2,49	3,08	2,89	3,30	3,15	3,15	3,75	3,51
24	4,32	4,59	4,30	4,15	4,08	4,52	4,96	5,08	4,96	4,84
48	5,52	5,46	5,36	5,32	5,36	5,92	6,18	6,28	6,20	6,20
	6,95	6,76	6,69	6,67	6,20	7,32	7,18	7,26	7,36	6,93



Obr. 17. Závislost úbytku kvasinek a plísni na době skladování - působení pěti koncentrací směsi organických kyselin (aplikované množství 20 ± 2 ml)

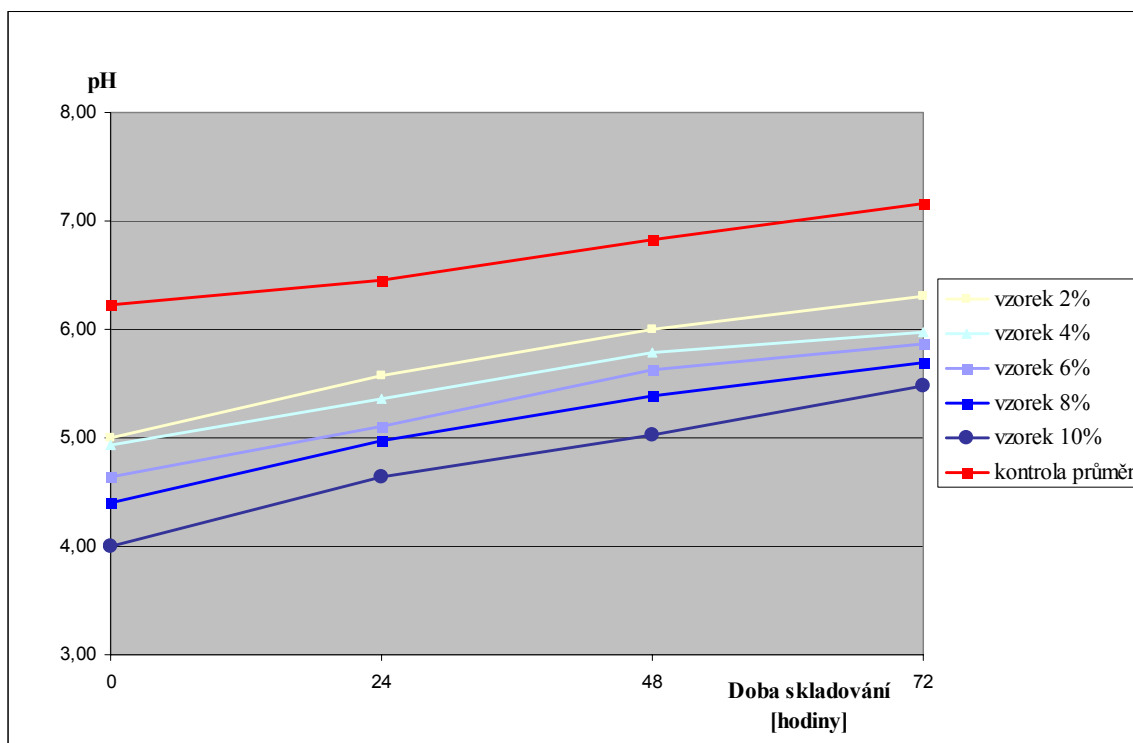
4.3 VÝVOJ HODNOTY PH V ZÁVISLOTI NA DRUHU KYSELINY, JEJÍ KONCENTRACI A DOBĚ SKLADOVÁNÍ

4.3.1 VLIV KYSELINY CITRONOVÉ

Hodnoty pH byly měřeny po celou dobu chladírenského skladování vždy s 24 hodinovým odstupem. Obecně lze říci, že bezprostředně po ošetření povrchu kyselinou citronovou došlo ke snížení pH (viz. *Obr. 18* a *Obr. 19*), během chladírenského skladování se však tento rozdíl pozvolna snižoval. Snížení pH závisí přímo úměrně na koncentraci aplikovaného roztoku. Nejvýraznější rozdíl mezi hodnotou pH ošetřených vzorků a kontrolou byl bezprostředně po aplikaci roztoku kyseliny. Tehdy průměrná hodnota pH neošetřených vzorků dosáhla hodnoty 6,23. Zatímco hodnoty pH ošetřených vzorků se pohybovaly až o dvě jednotky níže a v případě aplikace 20 ± 2 ml 10hm.% kyseliny citronové bylo snížení hodnoty pH ještě výraznější. Konkrétní hodnoty pH pro jednotlivá aplikovaná množství jsou uvedeny v tabulkách (*Tab. 22* a *Tab. 23*).

Tab. 22. Vliv přídavku kyseliny citronové na průběh hodnoty pH kůže kuřat během chladírenského skladování (aplikované množství 15 ± 2 ml)

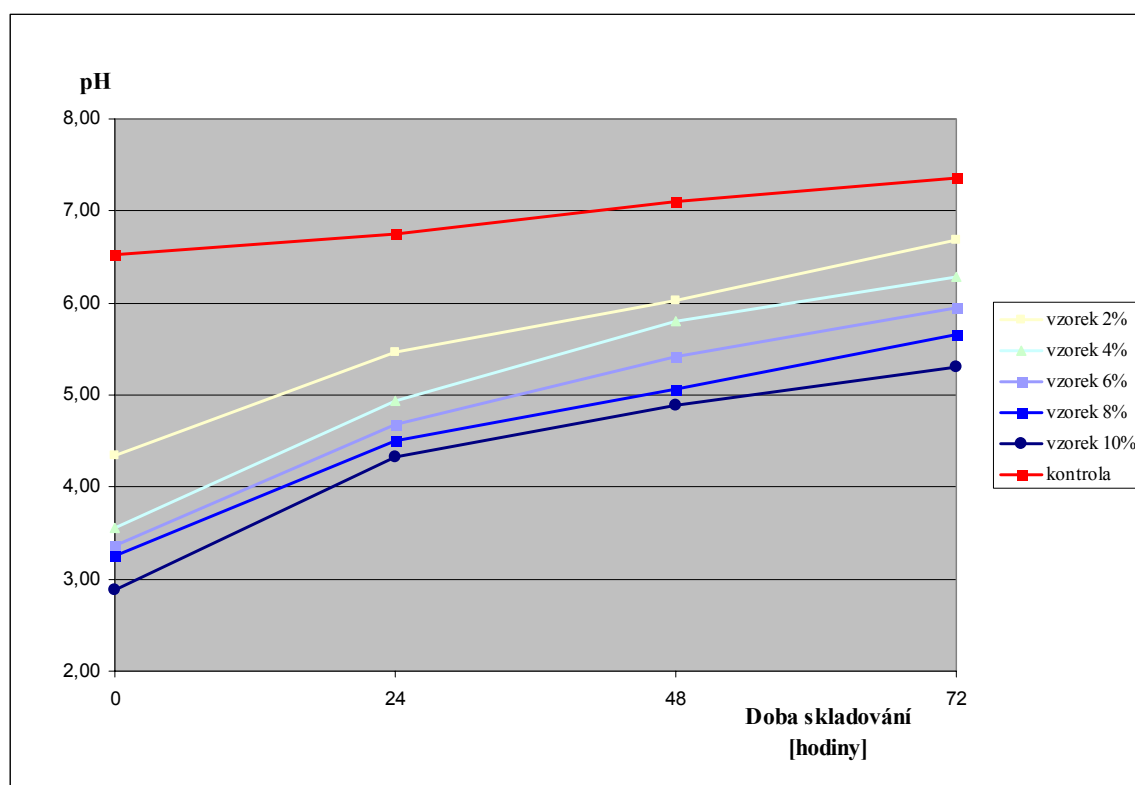
Doba skladování í hodiny	Přídavek kyseliny citronové										Kontrola (průměr)	
	2hm.%		4hm.%		6hm.%		8hm.%		10hm.%			
	pH	σ	pH	σ	pH	σ	pH	σ	pH	σ	pH	σ
0	5,00	0,14	4,93	0,20	4,64	0,38	4,40	0,26	4,00	0,38	6,23	0,13
24	5,58	0,33	5,36	0,35	5,11	0,22	4,98	0,26	4,64	0,24	6,45	0,24
48	6,00	0,37	5,79	0,34	5,63	0,47	5,39	0,21	5,03	0,22	6,83	0,46
72	6,31	0,14	5,97	0,16	5,87	0,15	5,69	0,33	5,49	0,20	7,17	0,55



Obr. 18. Vývoj pH v závislosti na koncentraci roztoku kyseliny citronové použité k ošetření (aplikované množství 15 ± 2 ml)

Tab. 23. Vliv přidavku kyseliny citronové (aplikované množství 20 ± 2 ml) na průběh hodnoty pH kůže kuřat během chladirenského skladování

Doba skladování í hodiny	Přídavek kyseliny citronové										Kontrola (průměr)	
	2hm. %		4hm. %		6hm. %		8hm. %		10hm. %			
	pH	σ	pH	σ	pH	σ	pH	σ	pH	σ	pH	σ
0	4,35	0,25	3,56	0,14	3,37	0,15	3,25	0,14	2,89	0,18	6,53	0,24
24	5,46	0,27	4,93	0,28	4,68	0,14	4,51	0,20	4,32	0,29	6,75	0,37
48	6,03	0,29	5,81	0,18	5,41	0,25	5,06	0,24	4,88	0,25	7,10	0,49
72	6,69	0,41	6,29	0,25	5,94	0,24	5,66	0,38	5,30	0,37	7,36	0,50



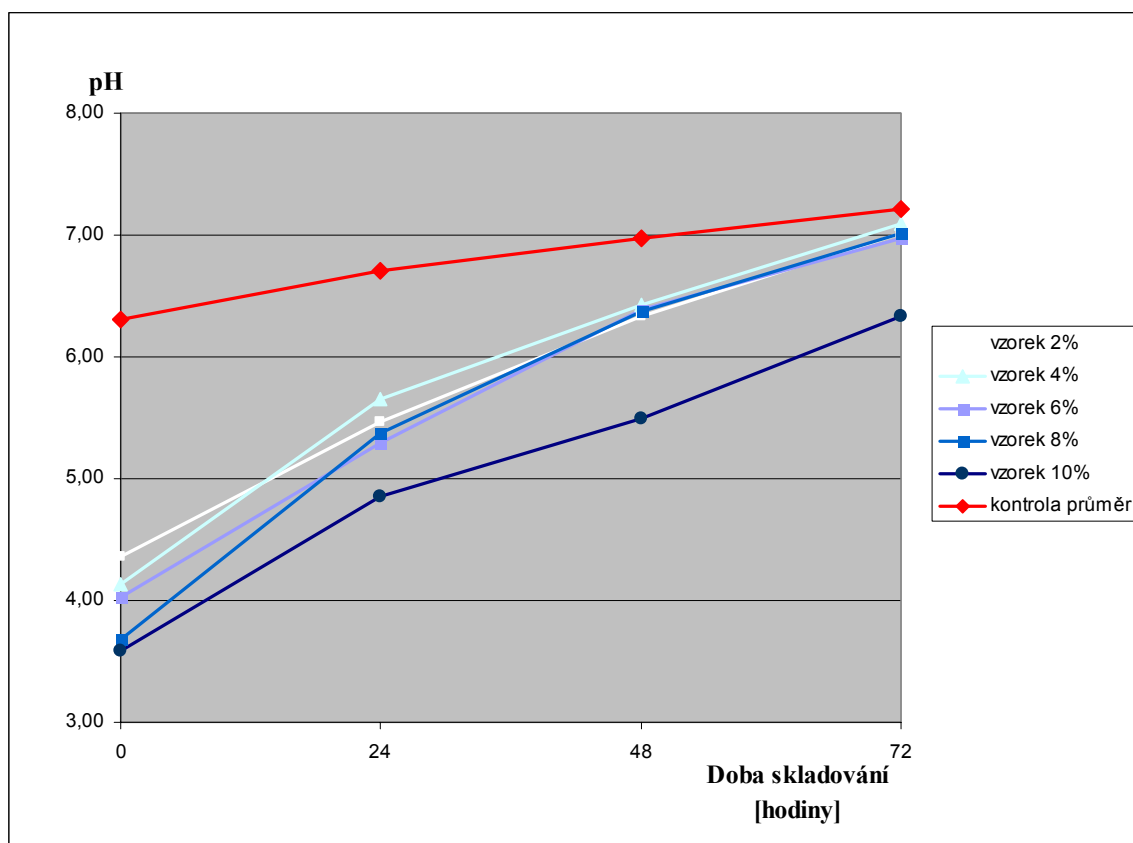
Obr. 19. Vývoj pH v závislosti na koncentraci roztoku kyseliny citronové použité k ošetření (aplikované množství 20 ± 2 ml)

4.3.2 VLIV SMĚSÍ ORGANICKÝCH KYSELIN

Největší rozdíl mezi hodnotou pH ošetřených (aplikované množství 15 ± 2 ml) a kontrolních vzorků byl rovněž během prvního dne skladování. Dále se v průběhu chladírenského skladování hodnota pH ošetřených vzorků postupně zvyšuje až na úroveň shodnou s hodnotou neošetřených vzorků. Přesné hodnoty pro jednotlivé koncentrace jsou uvedeny v tabulce (Tab. 24), grafické znázornění poskytuje obrázek (Obr. 20).

Tab. 24. Vliv směsi kyseliny citronové a mléčné (aplikované množství 15 ± 2 ml) na průběh hodnoty pH kůže kuřat během chladírenského skladování

Doba skladování í hodiny	Roztoku kyseliny citronové [hm.%] a 1obj.% kyseliny mléčné										Kontrola (průměr)	
	2hm.%		4hm.%		6hm.%		8hm.%		10hm.%		pH	σ
	pH	σ	pH	σ	pH	σ	pH	σ	pH	σ		
0	4,36	0,30	4,14	0,28	4,03	0,24	3,68	0,28	3,59	0,09	6,31	0,14
24	5,47	0,44	5,66	0,18	5,30	0,17	5,38	0,45	4,85	0,29	6,71	0,29
48	6,34	0,34	6,43	0,29	6,39	0,22	6,38	0,27	5,50	0,30	6,98	0,42
72	7,02	0,75	7,09	0,55	6,97	0,52	7,02	0,29	6,34	0,28	7,21	0,52

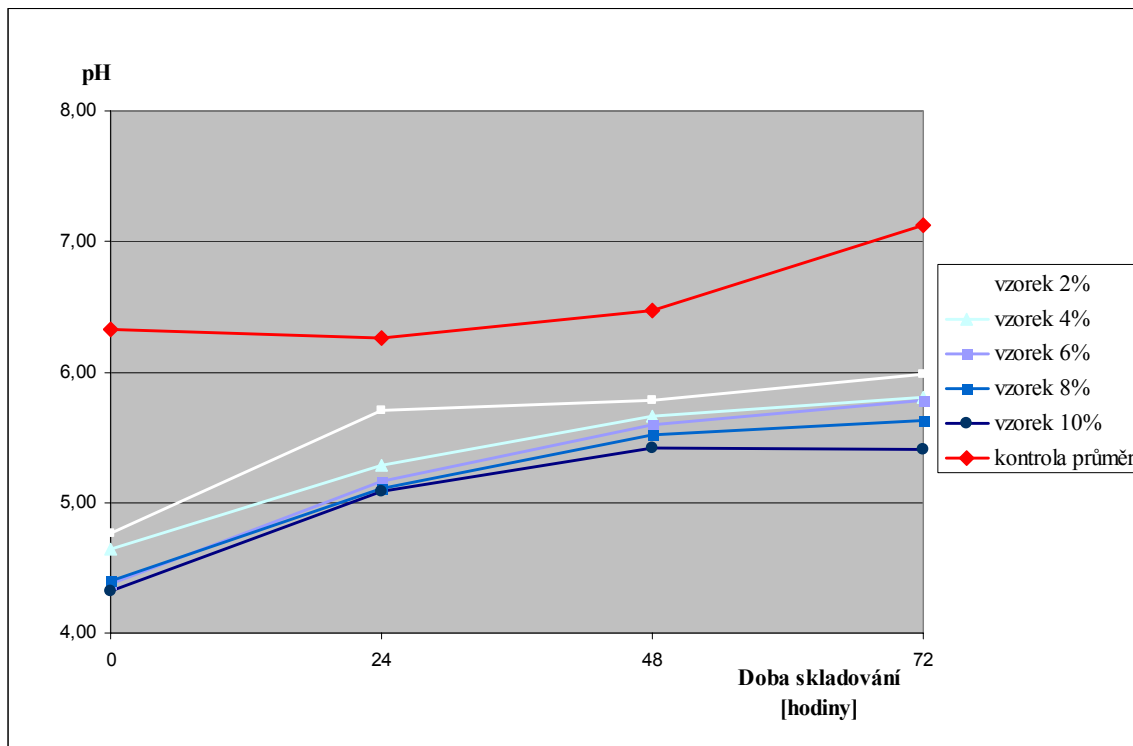


Obr. 20. Vývoj pH v závislosti na koncentraci směsi kyseliny citronové a mléčné použité k ošetření (aplikované množství 15 ± 2 ml)

Ošetření 20 ± 2 ml roztoku směsi organických kyselin vedlo k podobnému průběhu vývoje pH jako při aplikaci menšího množství. Rozdíl je zde však ve zřetelném zpomalení nárůstu hodnoty pH v průběhu dalšího skladování. U všech ošetřených vzorků nepřesáhlo naměřené pH po 72 hodinách skladování hranici 6,00 (viz. Tab. 25). Grafické znázornění uvádí obrázek (Obr. 21).

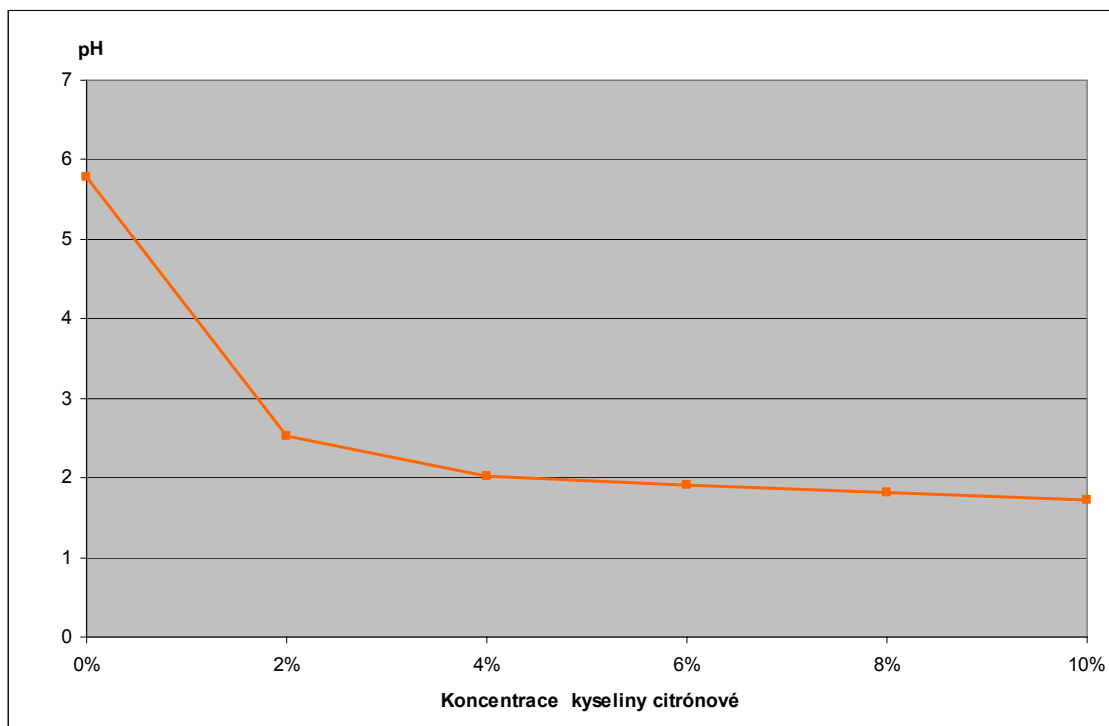
Tab. 25. Vliv směsi kyseliny citronové a mléčné na průběh hodnoty pH kůže kuřat během chladiřenského skladování (aplikované množství 20 ± 2 ml)

Doba skladování í hodiny	Roztoku kyseliny citronové [hm%] a 1obj.% kyseliny mléčné										Kontrola (průměr)	
	2hm.%		4hm.%		6hm.%		8hm.%		10hm.%			
	pH	σ	pH	σ	pH	σ	pH	σ	pH	σ	pH	σ
0	4,77	0,02	4,64	0,11	4,38	0,17	4,40	0,10	4,32	0,19	6,32	0,12
24	5,71	0,03	5,28	0,37	5,16	0,12	5,11	0,04	5,09	0,05	6,26	0,14
48	5,78	0,11	5,66	0,24	5,60	0,03	5,52	0,26	5,42	0,20	6,47	0,38
72	5,98	0,20	5,81	0,30	5,78	0,29	5,63	0,37	5,41	0,57	7,13	0,37



Obr. 21. Vývoj pH v závislosti na koncentraci směsi kyseliny citronové a mléčné použité k ošetření (aplikované množství 20 ± 2 ml)

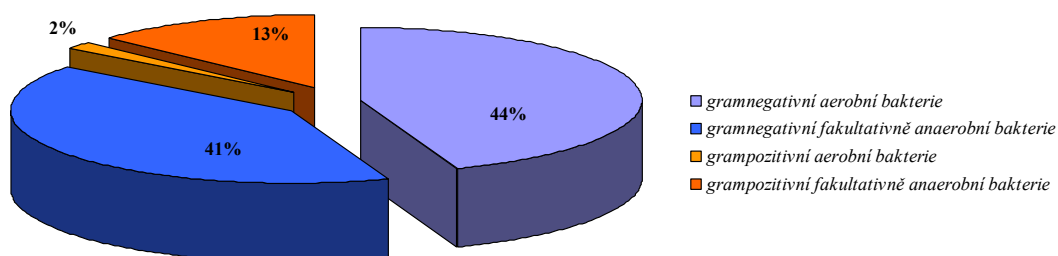
Obrázek (Obr. 22) znázorňuje závislost mezi snížením hodnoty pH a koncentrací roztoku kyseliny citronové. Z grafu je patrné, že se zvyšující se koncentrací roztoku kyseliny citronové klesá hodnota pH stále méně. Vysvětlením může být skutečnost, že s rostoucí koncentrací klesá hodnota pH výrazně jen u silných kyselin, zatímco u slabých kyselin (kyselina citronová i mléčná) je k dosažení nižších hodnot pH zapotřebí daleko většího molárního množství těchto kyselin.



Obr. 22. Vliv koncentrace kyseliny citrónové na hodnotu pH roztoku

4.4 BAKTERIÁLNÍ IDENTIFIKACE

V této části byly bakteriální kmeny izolované z kůže chlazené drůbeže zařazeny do taxonomických skupin a eventuálně rodově či druhově dourčeny. U všech 54 izolovaných kmenů byly provedeny zvolené biochemické testy (bližší popis je uveden v kapitole 3.7.1). Výsledky těchto testů jsou shrnuty ve formě tabulky, která je uvedena v příloze P III. Obrázek (Obr. 23) znázorňuje procentuální zastoupení izolovaných bakteriálních kmenů, které jsou rozděleny na základě barvitelnosti buněčné stěny podle Grama a dále na základě vztahu ke kyslíku. Výsledky identifikace gramnegativních střevních tyček pomocí TSI jsou uvedeny v příloze P IV.



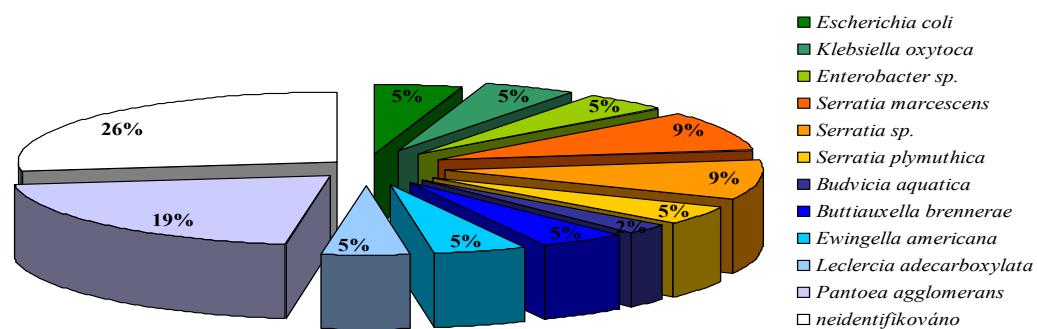
Obr. 23. Rozdělení izolovaných kmenů na grampozitivní a gramnegativní s podrozdělením na aerobní a fakultativně anaerobní bakterie

Biochemické testy byly u vybraných kmenů doplněny vhodnými mikrotesty (ENTEROtest, NEFERMtest, STAPHYtest). Výsledky těchto testů byly vyhodnoceny identifikačním programem TNW-Lite a jsou shrnuty ve formě tabulek (Tab. 26, Tab. 27 a Tab. 28) a obrázků (Obr. 24 a Obr. 25), které graficky znázorňují jejich procentuální zastoupení. Tabulky i grafy jsou rozděleny do tří kategorií podle použitých komerčních mikrotestů. Ve všech tabulkách je uvedeno, kromě názvu identifikovaného kmene, také procento identifikace a T-index. Procento identifikace (% id.) udává pravděpodobnost, s jakou daný výsledek odpovídá danému taxonu. T-index (Tin) je hodnota udávající, do jaké míry daný výsledek odpovídá nejtypičtějším výsledku pro daný taxon.

4.4.1 ENTEROtest

Tab. 26. Výsledky identifikace – souprava ENTEROtest 24

ČÍSLO KMENU	IDENTIFIKACE	% id.	Tin
1	<i>neidentifikováno</i>	-	-
2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	79,81	0,332
3	<i>Serratia marcescens</i>	37,81	0,487
4	<i>Serratia marcescens</i>	37,81	0,487
17	<i>Escherichia coli</i>	98,47	0,726
21	<i>Budvicia aquatica/ Pantoea agglomerans</i>	88,73/ 95,48	0,198/ 0,48
22	<i>neidentifikováno</i>	-	-
24	<i>Serratia sp.</i>	79,91	0,370
26	<i>Pantoea sp.</i>	96,24	0,493
27	<i>neidentifikováno</i>	-	-
31	<i>Pantoea agglomerans</i>	99,94	0,880
33	<i>neidentifikováno</i>	-	-
35	<i>Buttiauxella brennerae</i>	98,20	0,648
36	<i>Enterobacter sp.</i>	97,76	0,370
40	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	97,03	0,490
45	<i>Pantoea agglomerans</i>	99,94	0,880
46	<i>Pantoea agglomerans</i>	99,94	0,880
48	<i>Serratia plymuthica</i>	89,75	0,445
49	<i>neidentifikováno</i>	-	-
50	<i>neidentifikováno</i>	-	-
52	<i>Ewingella americana</i>	89,55	0,793
53	<i>Serratia sp.</i>	82,48	0,550

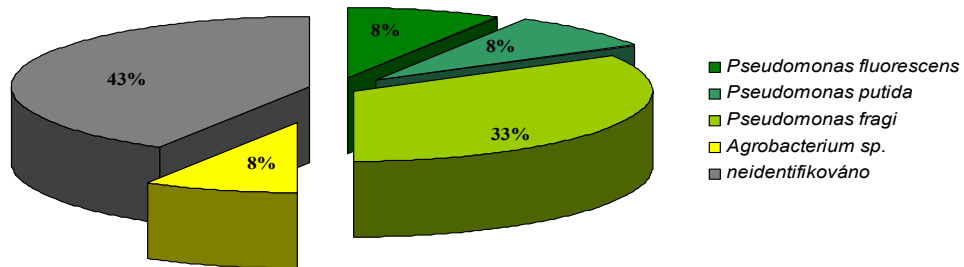


Obr. 24. Procentuální zastoupení jednotlivých identifikovaných bakteriálních kmenů (souprava ENTEROtest 24)

4.4.2 NEFERMtest

Tab. 27. Výsledky identifikace – souprava NEFERMtest

ČÍSLO KMENU	IDENTIFIKACE	% id.	Tin
11	neidentifikováno	-	-
13	neidentifikováno	-	-
15	neidentifikováno	-	-
23	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99,70	0,440
25	<i>Pseudomonas putida</i>	91,06	0,579
28	neidentifikováno	-	-
30	<i>Pseudomonas fragi</i>	96,30	0,635
32	<i>Agrobacterium sp.</i>	100,00	0,324
43	<i>Pseudomonas fragi</i>	97,49	0,764
47	<i>Pseudomonas fragi</i>	89,43	0,650
51	<i>Pseudomonas fragi</i>	87,08	0,734
54	neidentifikováno	-	-



Obr. 25. Procentuální zastoupení jednotlivých identifikovaných bakteriálních kmenů (souprava NEFERMtest)

STAPHYtest

Tab. 28. Výsledky identifikace – souprava STAPHYtest

ČÍSLO KMENU	IDENTIFIKACE	% id.	Tin
5	<i>Staphylococcus lentus</i>	89,62	0,876
6	<i>Staphylococcus sciuri</i>	86,11	0,847
14	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,47	1,000
7	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,47	1,000
16	neidentifikováno	-	-
18	neidentifikováno	-	-

Procentuálně nejvíce byl zastoupen rod *Staphylococcus aureus* (33 %), ostatní identifikované rody byly zastoupeny shodně 17 %.

4.4.3 KVASINKY A PLÍSNĚ

Identifikační testy u kvasinek a plísní nebyly provedeny, jelikož jejich identifikace nebyla cílem této práce. Na základě morfologie kolonií a zejména jejich barevné pigmentace bylo možné rozlišit několik skupin. Typy barevných pigmentů, které se vyskytovaly na médiu



Obr. 26. Barevně pigmentující kvasinky izolované z živné půdy YGA (foceno na odlišném podkladu)

Chloramphenicol Yeast Agar zobrazuje obrázek (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Rozlišitelné byly tyto barvy: oranžová, světle zelená - průhledná, žlutá, bílá, černá (šedá) a krémová bílá.

Na základě mikroskopie a cytologie buněk, byly blíže identifikovány pouze dva izolované kmeny kvasinek. Pravděpodobně se jedná o rod *Rhodoturula* a rod *Geotrichum*. Pro přesnou identifikaci druhu by bylo zapotřebí provést další biochemické identifikační testy.

5 DISKUSE

5.1 ÚČINEK KYSELINY CITRONOVÉ

Z výsledků experimentů je patrné, že aplikace kyseliny citronové (obě aplikovaná množství) na povrch chlazené drůbeže snižuje mikrobiální četnosti a zpožďuje okamžik nástupu fáze logaritmického nárůstu mikroorganismů. Příčinnou je s největší pravděpodobností snížení pH povrchové tkáně, a tím ovlivnění růstu mikroorganismů.

Přídavek kyseliny citronové vedl k okamžitému snížení hodnot pH kůže. Při vyšší koncentraci kyseliny byl pokles pH výraznější. Nejvýraznějšího poklesu pH, až na hodnotu 2,28, bylo dosaženo aplikací celkového množství 20 ± 2 ml 10 hm.% kyseliny citronové. S výší pH přímo úměrně koresponduje redukce počtu aerobních mezofilních mikroorganismů a koliformních bakterií. V případě kvasinek a plísní je vliv nižšího pH vzhledem k redukci počtů spíše opačný.

5.1.1 ÚČINEK KYSELINY CITRONOVÉ NA AEROBNÍ MEZOFILNÍ MIKROORGANISMUSY

Z obrázků (*Obr. 6* a *Obr. 9*) lze vidět, že vyšší koncentrace kyseliny citronové v aplikovaném roztoku měla signifikantně větší vliv na úbytek aerobních mezofilních mikroorganismů. Antimikrobiální účinek byl ještě více podpořen aplikací většího množství kyseliny. Inhibiční účinek nepřímě úměrně odpovídá snížené hodnotě pH. Hodnoty pH v závislosti na koncentraci aplikovaného roztoku popisuje tabulka (*Tab. 22* a *Tab. 23*).

Roztok 2hm.% a 4hm.% kyseliny citronové (aplikované množství 15 ± 2 ml) nedosahuje po celou dobu skladování ani desetinásobku redukce aerobních mezofilních mikroorganismů ve srovnání s kontrolou. Výsledky statistické analýzy také potvrzují, že mezi celkovými počty mezofilních mikroorganismů nalezených na ošetřených vzorcích a jejich kontrolními vzorky nejsou statisticky významné rozdíly. V případě aplikace většího množství se úbytek vyšplhal u 2hm.% roztoku kyseliny v průběhu 24 hodin na desetinásobek a u 4hm.% roztoku se po celou dobu skladování pohybuje nad touto hranicí.

Aplikace 6hm.% a 8hm.% roztoku kyseliny citronové má velmi podobný vliv na inhibici růstu mezofilních mikroorganismů. V první fázi pokusů, při aplikaci menšího množství kyseliny, se redukce celkového počtu mikroorganismů po 24 hodinách skladování pohybovala v rozmezí 1,0 až 1,5 log. V průběhu dalších dvou dnů pozvolna klesla až pod 1,0 log. Účinek 6hm.% a 8hm.% kyseliny citronové při větším aplikovaném množství byl

výraznější, po celou dobu chladírenského skladování neklesla redukce počtu mezofilních mikroorganismů pod desetinásobek úbytku oproti kontrole. Aplikací 8hm.% roztoku bylo, v průběhu třetího dne skladování, dosaženo až stonásobné redukce mezofilních mikroorganismů ve srovnání s kontrolou.

Roztok 10hm.% kyselina citronová vykazuje nejsilnější antibakteriální účinek již po 24 hodinách skladování, kdy dosahuje téměř tisícinásobné redukce oproti kontrolním vzorkům. Zajímavé je, že ačkoliv byla aplikována rozdílná množství kyseliny, inhibiční účinek je téměř shodný. Výjimkou je pouze první den, kdy se aplikace většího množství ihned odrazila v inhibičním účinku a redukce počtu mezofilních mikroorganismů přesáhla 1,5 log.

Mikrobiální limity pro celkové počty mezofilních mikroorganismů, dané vyhláškou MZe č. 375/2003 Sb., byly při aplikaci obou rozdílných množství kyseliny citronové překročeny pouze u 2 hm.% roztoku a to v posledním dni skladování. U všech ostatních koncentrací byly celkové počty mezofilních mikroorganismů, po celou dobu chladírenského skladování, pod hranicí stanovenou vyhláškou. Pro srovnání u kontrolních vzorků byly limitní hodnoty překročeny již v průběhu třetího dne skladování.

S 95% spolehlivostí lze říci, že mezi jednotlivými ošetřenými vzorky a jejich kontrolou existují statisticky významné rozdíly. Tento závěr je platný pro všechny koncentrace roztoků kyseliny citronové a obě aplikovaná množství. Výjimkou je ošetření 15 ± 2 ml 2 a 4hm.% roztoku kyseliny citronové.

5.1.2 ÚČINEK KYSELINY CITRONOVÉ NA KOLIFORMNÍ BAKTERIE

Vedle omezení růstu celkového počtu mikroorganismů měl přídavek kyseliny citronové vliv i na pokles počtu koliformních bakterií (viz. *Tab. 11* a *Tab. 14*). Vliv kyseliny citronové na úbytek koliformních bakterií byl signifikantní již po 24 hodinách skladování.

Roztok 2hm.% kyseliny citronové při nižším aplikovaném množství neměl téměř žádný antimikrobiální efekt na koliformní bakterie, ale při aplikaci 20 ± 2 ml kyseliny dosáhla redukce již v první den skladování desetinásobku a v průběhu dalšího skladování prudce klesla.

Účinek 4hm.% kyseliny byl oproti 2hm.% účinnější vůči koliformním bakteriím. Při aplikaci většího množství kyseliny se redukce v průběhu chladírenského skladování pohybovala mezi desetinásobkem až stonásobkem. Téměř shodných výsledků bylo dosaženo

i při aplikaci 6hm.% a 8hm.% kyseliny. Významnější odchylka byla u 8hm.% kyseliny jen v průběhu prvních dvou dnů skladování, kde redukce dosáhla hodnoty 2,5 log.

Roztok 10hm.% kyseliny vykazoval nejsilnější antibakteriální účinek na koliformní bakterie, který byl ještě výraznější při aplikaci většího množství kyseliny. Redukce počtu koliformních bakterií oproti kontrole dosáhla již několik hodin po aplikaci téměř 4,0 log. V průběhu dalšího skladování se redukce snižovala vždy v průměru o jeden řád vůči redukcí z předchozího dne, nicméně neklesla pod desetinásobek.

V první fázi pokusů aplikace kyseliny citronové, byly limity počtu koliformních bakterií překročeny již po třech dnech skladování. Výjimkou byly pouze vzorky ošetřené 10hm.% roztokem kyseliny citronové. U kontrolních vzorků došlo k překročení zákonem stanovaných limitů o den dříve. V druhé fázi pokusů (při aplikaci 20±2 ml roztoku kyseliny citronové), byly celkové počty koliformních bakterií, dané příslušnou komoditní vyhláškou, překročeny rovněž v průběhu třetího dne skladování. Kromě vzorků, které byly ošetřeny 10hm.% roztokem kyseliny, zde byly povolené limity překročeny o den později.

Na hladině významnosti 5,00 % bylo zjištěno, že mezi počty koliformních bakterií na ošetřených vzorcích 2hm.% kyselinou citronovou a jejich kontrolou nebyly statisticky významné rozdíly. U všech ostatních koncentrací byl statisticky významný rozdíl potvrzen.

Závěrem lze říci, že kyselina citronová vykazovala do určité míry selektivní antimikrobiální účinek proti koliformním bakteriím na povrchu chlazené drůbeže.

5.1.3 ÚČINEK KYSELINY CITONOVÉ NA KVASINKY A PLÍSNĚ

Antimikrobiální efekt kyseliny citronové na kvasinky a plísňe je oproti předchozím indikátorovým skupinám podstatně nižší. Na základě výsledků z experimentu lze vyvodit závěr, že úbytek nepřímo souvisí s koncentrací a množstvím roztoku kyseliny citronové použité k ošetření. Může to být způsobeno tím, že na rozdíl od většiny bakterií, které rostou v neutrálním nebo slabě alkalickém prostředí, je pro kvasinky optimální kyselé prostředí (pH 4,8 až 5,5). Optimální pH pro většinu plísní je poblíž neutrálních hodnot, ale obecně se plísňe rozmnožují ve velmi širokém rozmezí hodnot pH (od 1,2 až po 11,0) [16].

Redukce celkového počtu kvasinek a plísní se při aplikovaném množství 15±2 ml u 2, 4 a 6hm.% kyseliny citronové pohybuje po celou dobu skladování okolo 0,5 log. Výjimkou je pouze 6hm.% kyselina která dosahuje v prvním dni desetinásobné redukce.

Roztok 8 a 10hm.% kyseliny (při aplikaci menšího množství) dosahuje maximální redukce 1,5 log v prvním dni skladování. Dále se redukce snižuje až pod desetinásobek oproti kontrole.

Při aplikaci 20±2 ml kyseliny citronové se redukce 2hm.% kyseliny pohybuje pod hranicí pětinasobku. Redukce ostatních koncentrací se pohybuje mezi desetinásobkem až pětinasobkem vůči kontrolním vzorkům.

Přípustné mikrobiální hodnoty byly u indikátorové skupiny kvasinek a plísní, v první fázi pokusů, překročeny až v průběhu posledního dne chladírenského skladování a to u vzorků ošetřených 2, 4 a 6hm.% kyselinou citronovou. Ve druhé fázi pokusů (aplikace vyššího množství kyseliny) došlo k překročení povolených limitů rovněž v poslední den skladování a to u všech vzorků s výjimkou toho, kde byla aplikována 4hm.% kyselina. U kontrolních vzorků k testovaným skupinám došlo k překročení přípustných mikrobiálních hodnot také během čtvrtého dne skladování.

Na základě provedených statistických analýz existuje statisticky významný rozdíl mezi vzorky a jejich kontrolou pouze u 8 a 10hm.% roztoku kyseliny citronové (aplikace 15±2 ml). V případě aplikace většího množství kyseliny citronové byl signifikantní rozdíl potvrzen jen u 4hm.% roztoku.

5.2 ÚČINEK SMĚSÍ ORGANICKÝCH KYSELIN

V této části pokusů bylo k jednotlivým koncentracím kyseliny citronové (tj. 2, 4, 6, 8, a 10hm.%) přidáno určité množství 1obj.% kyseliny mléčné. Jednotlivé roztoky byly smíchány v poměru 1:1. Opět byl kromě různých koncentrací testován i vliv celkového množství roztoku použitého k ošetření chlazených kuřat (tj. 15 a 20 ml).

5.2.1 ÚČINEK SMĚSÍ ORGANICKÝCH KYSELIN NA AEROBNÍ MEZOFILNÍ MIKROORGANISMUSY

Nejvýraznější antimikrobiální efekt na aerobní mezofilní mikroorganismy má 10hm.% roztok kyseliny citronové ve směsi s 1obj.% kyseliny mléčné. Důležitý je vliv přídavku kyseliny mléčné na celkový inhibiční efekt, který v tomto případě nebyl zvýšen, ale naopak poklesl. Grafické znázornění poskytuje obrázek (*Obr. 12*), ve srovnání s obrázkem (*Obr. 6*) je patrný výrazný pokles inhibičního účinku 10hm.% roztoku směsi organických kyselin. Pokles dosahuje ve druhém a třetím dni skladování téměř 1,0 log redukce, oproti redukci vyvolané stejným aplikovaným množstvím a stejnou koncentrací kyseliny citronové.

Antimikrobiální účinky ostatních koncentrací směsi zůstaly srovnatelné s účinkem roztoku kyseliny citronové bez přídavku 1obj.% kyseliny mléčné (viz. *Obr. 6* a *Obr. 12*). Tedy ani zde nepřispěl přídavek kyseliny mléčné ke zvýšení antimikrobiálního účinku.

V druhé fázi pokusu bylo opět při ošetření chladené drůbeže aplikováno celkové množství 20 ± 2 ml roztoku směsi. Redukce počtu mezofilních mikroorganismů ve srovnání s kontrolními vzorky dosáhla u 8 a 10hm.% roztoku směsi 2,0 log (viz. *Obr. 15*). Inhibiční účinek, ve srovnání s první fází pokusu byl výraznější zejména během prvního dne skladování, v průběhu dalších dnů skladování byly antimikrobiální účinky srovnatelné. Přídavek kyseliny mléčné pozitivně ovlivnil antibakteriální účinek 4hm.% roztoku kyseliny citronové, jejíž redukce se v průběhu 72 hodin pohybovala mezi 0,5 – 1,0 log. Je to významné zvýšení redukce při srovnání s první fází tohoto pokusu.

Maximální přípustné mikrobiální hodnoty byly v první fázi pokusu překročeny pouze u 2 a 4hm.% roztoku směsi organických kyselin. Aplikací většího množství směsi nedošlo k nárůstu aerobních mezofilních bakterií na kůži kuřat nad povolenou hodnotu 10^7 v 1 g. U kontrolních vzorků byla povolená hodnota překročena v průběhu třetího dne skladování.

5.2.2 ÚČINEK SMĚSI ORGANICKÝCH KYSELIN NA KOLIFORMNÍ BAKTERIE

Antibakteriální aktivita směsi vůči koliformním bakteriím je nepatrně výraznější než tomu bylo u mezofilních bakterií. Zřetelný je zejména inhibiční účinek 10hm.% roztoku kyseliny citronové ve směsi, který dosahuje stonásobku. Redukce počtu koliformních bakterií je v případě 2 a 4hm.% roztoku kyseliny citronové ve směsi s kyselinou mléčnou téměř shodná s výslednou redukcí dosaženou u aerobních mezofilních mikroorganismů. Oproti výsledkům dosaženým při aplikaci samotné kyseliny citronové byly přídavkem 1obj.% kyseliny mléčné ovlivněny pouze inhibiční účinky 2hm.% roztoku směsi. Ostatní koncentrace nebyly přídavkem kyseliny mléčné významně ovlivněny. Výjimkou je pouze první den skladování, kdy došlo ke zvýšení redukce počtu koliformních bakterií vůči kontrole u 4, 6 a 10hm.% roztoku kyseliny citronové ve směsi s kyselinou mléčnou (viz. *Obr. 7* a *Obr. 13*).

Inhibiční aktivita nebyla přídavkem 5 ml roztoku směsi organických kyselin signifikantně ovlivněna. Snížení počtu koliformních bakterií, při srovnání s první fází pokusu, bylo zaznamenáno pouze u 2 a 4hm.% roztoku kyseliny citronové ve směsi, kde se redukce v průběhu prvního a druhého dne pohybovala v rozmezí 1,5 až 1,0 log. Podrobnější

informace udává tabulka (*Tab. 20*) a grafické znázornění redukce počtu mikroorganismů vůči kontrole obrázků (*Obr. 16*).

Při aplikaci roztoku směsi organických kyselin došlo k prodloužení lag fáze, ale i přesto byla mezní hodnota 10^5 g^{-1} překročena po 72 hodinách skladování, a to shodně u obou aplikovaných množství. U neošetřených vzorků bylo hodnoty 10^5 g^{-1} dosaženo již po 48 hodinách skladování.

5.2.3 ÚČINEK SMĚSI ORGANICKÝCH KYSELIN NA KVASINKY A PLÍSNĚ

Antimikrobiální efekt směsi organických kyselin na kvasinky a plísně dosahuje maximálně desetinásobné redukce. Nižší koncentrace se pohybují téměř po celou dobu skladování okolo 0,5 log redukce (viz. *Tab. 18* a *Obr. 14*). Přídavek 1obj.% kyseliny mléčné tedy neměl statisticky významný vliv na redukci počtu kvasinek a plísní.

Antimikrobiální efekt směsi organických kyselin, ani při navýšení celkového aplikovaného množství na 20 ± 2 ml, nevykazoval významný inhibiční efekt. Po celou dobu skladování nepřesáhla redukce celkového počtu kvasinek a plísní ani desetinásobku ve srovnání s kontrolou (viz. *Obr. 17*). Na druhou stranu u vyšších koncentrací (6, 8 a 10hm.%) byla redukce v průběhu celé doby chladírenského skladování poměrně vyrovnaná (v rozmezí 1,0 až 0,6 log).

U indikátorové skupiny kvasinek a plísní byly přípustné hodnoty mikrobiální kontaminace překročeny pouze při aplikaci menšího množství směsi organických kyselin a to konkrétně v průběhu posledního dne skladování. U kontrolních vzorků byly zákonem stanovené limity překročeny o 24 hodin dříve. Při aplikaci většího množství roztoku směsi nebyly maximální přípustné mikrobiální hodnoty překročeny.

O inhibičním účinku kyseliny citronové se zmiňuje velmi málo publikací. V dostupné literatuře byl její antimikrobiální efekt zpravidla testován v kombinaci s dalšími látkami, například s nisinem [54], nebo byl její účinek testován za zcela jiných podmínek. Z toho důvodu není snadné srovnat dosažené výsledky s výsledky již publikovanými. Nicméně všechny výsledky se shodují v tom, že antimikrobiální účinek kyseliny mléčné je signifikantně větší než účinek stejné koncentrace kyseliny citronové. A to při jakékoliv teplotě, ačkoliv je známo, že antimikrobiální efekt kyseliny mléčné závisí na teplotě. Dosažené výsledky se shodují s odbornou literaturou také v tom, že při nižších

koncentracích nebo při vyšším pH je antimikrobiální účinek obou organických kyselin příliš nízký.

5.3 VÝVOJ HODNOTY PH V ZÁVISLOTI NA DRUHU KYSELINY, JEJÍ KONCENTRACI A DOBĚ SKLADOVÁNÍ

Hodnota pH je obecně považována za významný indikátor průběhu postmortálních změn masa a je tedy i ukazatelem aktuálního biochemického stavu kuřecího masa se vztahem k jeho hygienickým, senzorickým a technologickým vlastnostem. Hodnoty pH byly měřeny ve 24 hodinových intervalech. Protože výsledky měření pH na různých místech povrchu chlazené drůbeže vykazovaly velkou variabilitu (výrazné rozdíly byly zejména mezi prsní a stehenní částí kůže), bylo zapotřebí měření ustálit. Celkem bylo měřeno na pěti odlišných místech povrchu jatečně opracované drůbeže: horní stehno, dolní stehno, prsa, křídlo a hřbet, z těchto hodnot byl vypočten aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Z tabulky 14 lze vidět, že hodnoty směrodatné odchylky se s dobou skladování zvyšují. Pravděpodobnou příčinou je zvětšující se míra variability pH na povrchu kůže kuřete s prodlužující se dobou skladování.

Naměřené hodnoty pH u neošetřených vzorků se pohybovaly během chladírenského skladování v rozmezí 6,23 až 7,36. Tyto dosažené výsledky jsou shodné s výsledky které byly publikovány [30] [34] [44]. Vlastní vývoj pH u neošetřených vzorků je charakteristický velmi mírným vzestupem hodnot (viz. *Obr. 19* – kontrolní vzorek).

Po aplikaci roztoků kyseliny citronové stejně jako i po aplikaci směsí organických kyselin, došlo vždy ke snížení hodnoty pH, ta se v průběhu chladírenského skladování postupně přibližovala k hodnotě neošetřených vzorků. Opětný vzrůst hodnoty pH je pravděpodobně zapříčiněn postupnou difúzí kyseliny mléčné do hlubších vrstev svaloviny, pufováním složkami masa a jejich rozkladem. Z obrázků (*Obr. 18* a *Obr. 19*) je patrné, že pokles hodnoty pH odpovídal aplikovanému množství. Přičemž konečná hodnota pH, tedy po čtyřech dnech skladování, byla přibližně stejná bez ohledu na aplikované množství kyseliny.

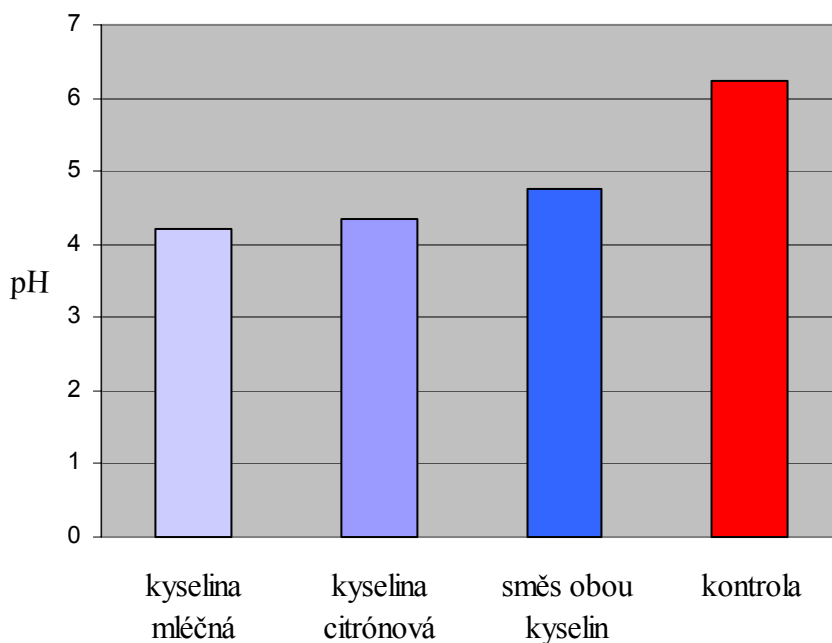
Aplikace většího množství kyseliny citronové (20 ± 2 ml) byla účinnější vůči snížení hodnoty pH, než aplikované roztoky v menším množství. Relativně největší pokles, na hodnotu pH 2,89, byl u 10hm.% kyseliny citronové (aplikované množství 20 ± 2 ml) a také naměřená hodnota pH po 72 hodinách chladírenského skladování byla signifikantně nižší než u kontrolního vzorku.

Ošetření 15 ± 2 ml směsi organických kyselin vyvolalo zpočátku větší pokles pH, ale o to rychleji tato hodnota stoupala v průběhu skladování (viz. *Obr. 20*). Po aplikaci 20 ± 2 ml směsi kyseliny citronové s kyselinou mléčnou hodnota pH stoupala velmi pozvolna a ani po 72 hodinách skladování nepřesáhla hranici pH 6,00 (viz. *Obr. 21*).

Absolutně největší pokles pH způsobila aplikace 10hm.% kyselina citronové. Pokud ale srovnáme výslednou hodnotu pH s koncentrací roztoku která způsobila tento pokles, dostaneme zcela jiný závěr. Roztok 2hm.% kyseliny citronové snížil hodnotu pH na polovinu konečné hodnoty pH snížené 10hm.% roztok (viz. *Tab. 23*). Rozhodující ale je, že její koncentrace je pětkrát nižší a tudíž je její účinek i ve vztahu k ostatním koncentracím roztoku kyseliny citronové relativně nejvyšší.

Při komplexním posouzení lze vyslovit závěr, že 2hm.% roztok kyseliny citronové způsobil významný pokles hodnoty pH, ostatní roztoky se v menší míře odchyľují od této hodnoty a to v závislosti na koncentraci. Další výrazný pokles pH je způsoben až 10hm.% roztokem kyseliny citronové. U slabých kyselin tedy od určité koncentrace nemají další přídavky kyseliny téměř žádný vliv na hodnotu pH (viz. *Obr. 22*).

Pro srovnání vlivu kyseliny mléčné a kyseliny citronové na snížení hodnoty pH na povrchu chlazené drůbeže jsou použity kromě dosažených výsledků z této práce také výsledky z jiných publikací [34]. Jak je patrné z níže uvedeného grafu (viz. *Obr. 27*), aplikací roztoku kyseliny mléčné byla hodnota pH kůže kuřat snížena na 4,22. Ve srovnání s hodnotou neošetřeného vzorku ($\text{pH} = 6,23$) způsobila aplikace 2hm.% kyseliny mléčné signifikantní pokles pH. Při ošetření 2hm.% roztokem kyseliny citronové dosáhlo pH hodnoty 4,35. Směs 2hm.% kyseliny citronové a 1obj.% kyseliny mléčné v poměru 1:1 snížila hodnotu pH kůže chlazené drůbeže na 4,77. Roztok kyseliny mléčné má tedy větší vliv na snížení hodnoty pH než stejná koncentrace kyseliny citronové, ale tento rozdíl je vzhledem k zvolenému experimentálnímu materiálu a zejména pak k jeho variabilitě nevýznamný.



Obr. 27 Srovnání vlivu aplikace rozdílných 2hm.% roztoků kyselin na hodnoty pH kůže kuřat v prvním dni chladiřenského skladování

5.4 BAKTERIÁLNÍ IDENTIFIKACE

Odborná literatura se obecně shoduje, že mikroflóra chlazené drůbeže může být kontaminována zejména těmito podmíněně patogenními zástupci rodů: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Escherichia*, *Clostridium* a *Staphylococcus*. Přítomné dále bývají psychrofilní bakterie rodu *Pseudomonas*, bakterie mléčného kvašení a v neposlední řadě kvasinky [89] [4] [15].

Z celkového počtu 54 izolovaných kmenů z povrchu kůže chlazené drůbeže bylo 85 % bakterií gramnegativních a zbývajících 15 % byly grampozitivní bakterie. I přesto, že výběr kmenů určených k izolaci byl náhodný, lze vzhledem k velkému procentuálnímu rozdílu vyvodit závěr, že gramnegativní bakterie jsou na povrchu kůže chlazené drůbeže zastoupeny v hojnějších počtech než grampozitivní.

Největší procentuální zastoupení z čeledi *Enterobacteriaceae* měla bakterie *Pantoea agglomerans* (19 %), následuje ji rod *Serratia* s 18 %. Ostatní identifikované bakteriální kmény byly zastoupeny pěti nebo méně procenty. Kromě typických bakterií vyskytujících se na drůbežím mase byly identifikovány i rody jako je *Budvicia aquatica* nebo *Ewingella americana*. Odborná literatura se o výskytu těchto rodů zmiňuje velmi mlhavě a jejich

výskyt nespojuje s kontaminací drůbežního masa. Bakterie *Ewingella americana* byla izolována u pacientů v Koreji a nebezpečí vyvolala pouze u těch, kteří měli oslabený imunitní systém [63]. *Budvicia aquatica* patří mezi nové druhy a poprvé byla izolována roku 1983 v Československu z vodního prostředí [2]. *Budvicia aquatica* je nepatogenní kmen, který dosud nebyl izolován z klinického materiálu.

Z celkového počtu šesti grampozitivních fakultativně anaerobních bakterií byly pomocí STAHPYtestu rodově určeny pouze čtyři původně izolované kmeny. Všechny izolované bakteriální kmeny patřily do čeledi *Staphylococcus*, konkrétně to byly rody: *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri* a *Staphylococcus aureus*. Všechny kmeny byly výborně odlišeny a hodnoty T-indexu i procenta identifikace byly vysoké. *Staphylococcus aureus* se běžně vyskytuje na kůži ptáků, může však být izolován i z nosohltanu. V drůbežím mase se zpravidla vyskytuje v relativně nízkých dávkách, avšak pokud má příznivé podmínky pro růst, může vyvolat alimentární intoxikaci [4].

Při identifikaci izolovaných bakteriálních kmenů pomocí NEFERMtestu dominoval rod *Pseudomonas*. Procentuálně nejvíce byl zastoupen druh *Pseudomonas fragi* (34 %), dále se zde vyskytovaly druhy *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* a *Agrobacterium sp.*, tyto druhy byly zastoupeny shodně osmi procenty. Téměř všechny kmeny byly velmi dobře odlišeny a v případě *Pseudomonas fragi* se jednalo o typický kmen. Výsledky identifikace gramnegativních nefermentujících bakterií, izolovaných z povrchu kůže drůbeže jsou shodné s těmi, které uvádí zahraniční studie. Odborné publikace řadí mezi běžně izolované bakterie z povrchu drůbeže následující rody: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella* a *Shewanella putrefaciens* [1] [15] [39]. Přičemž z 85 % dominují jak pigmentující tak i nepigmentující druhy rodu *Pseudomonas* (*P. fragi*, *P. fluorescens*, *P. putida* a *P. lundensis*) [15] [39]. *Pseudomonas fragi* je v odborné literatuře považován za nejvýznamnější druh způsobující kažení chlazeného masa [3] [78]. Provedená identifikace je v souladu s dosud publikovanými fakty.

Důvodů, proč se některé izolované bakteriální kmeny nepodařilo zařadit do taxonomických skupin, může být několik. Jednou z možných příčin mohlo být použití nízké nebo naopak příliš vysoké hustoty suspenze k inokulaci mikrotestů, eventuálně použití smíšené kultury. Dalším důvodem mohl být fakt, že zadanému profilu nebylo možné spolehlivě přiřadit žádný z uvedených taxonů. V takovém případě by bylo zapotřebí některé z testů opět opakovat nebo provést jiné identifikační testy.

Identifikační testy u kvasinek a plísní nebyly provedeny. Pomocí mikroskopie a cytologie buněk, byly blíže identifikovány pouze dva izolované kmeny kvasinek. S největší pravděpodobností se jedná o rod *Rhodotorula* a rod *Geotrichum*.

Rod *Rhodotorula* obsahuje vnitrobuněčné karotenoidy, jež zbarvují buňky i celé kolonie žlutě, oranžově až sytě růžově. Její identita se dobře dokazuje právě díky této červené karotenoidní pigmentaci. Kolonie jsou hladké, lesklé a okraj kolonie je ucelený. Všechny druhy rodu *Rhodotorula* hromadí v buňkách značné množství tuku (až 60 % sušiny) [37]. Rod *Rhodotorula* je rozšířený po celém světě. Tato kvasinka byla izolována ze vzduchu, půdy, z povrchu rostlin, ale i z různých orgánů živočišného těla [64]. Některé kmeny mohou být za určitých podmínek patogenní.

Rod *Geotrichum* s jediným druhem (*Geotrichum candidum* dříve *Oospora lactic*) má bohaté mycelium s artrosporami a bílé sametové až vatovité kolonie. Tvoří přechod mezi kvasinkami a plísněmi. Nemá kvasné schopnosti. Vyskytuje se jako častá kontaminace mléčných výrobků, hlavně tvarohu a jogurtu, droždí a tukových tkání masa, neboť obsahuje proteolytické a lipolytické enzymy [37] [76].

Výskyt těchto rodů kvasinek na živočišných produktech je poměrně běžný. Odborná literatura uvádí mezi nejčastějšími druhy kvasinek, které byly izolovány z drůbežího masa následující rody: *Candida*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Pichia* a *Hansenula*, přičemž většina kvasinek se vyskytuje zejména na povrchu [61]. Kontaminace drůbežího masa kvasinkami odráží úroveň hygieny ve zpracovatelském provozu. Výskyt kvasinek na povrchu masa drůbeže je však málokdy odpovědný za jeho mikrobiální kažení. Kažení masa zejména na povrchu je zapříčiněno striktně aerobními kmeny *Pseudomonas*. Pseudomonády nemají tak specifické požadavky na růst a proto rostou podstatně rychleji než kvasinky, jejichž růst tím potlačí [61].

ZÁVĚR

Výsledky experimentální části potvrzují, že aplikace kyseliny citronové na povrch chlazené drůbeže stejně jako aplikace její směsi s kyselinou mléčnou, snižují mikrobiální četnosti a zpožďují okamžik nástupu fáze logaritmického nárůstu mikroorganismů. Pravděpodobnou příčinou je snížení hodnoty pH povrchové tkáně a následné ovlivnění růstu mikroorganismů. Ošetření roztokem kyseliny citronové a její směsi s kyselinou mléčnou vedlo k okamžitému snížení hodnot pH kůže. Při aplikaci vyšší koncentrace roztoku kyseliny byl pokles hodnoty pH výraznější. Z výsledků obecně vyplývá, že hodnota pH přímo úměrně koresponduje s redukcí počtu aerobních mezofilních mikroorganismů a koliformních bakterií. V případě indikátorové skupiny kvasinek a plísní nebyl vliv nižšího pH na redukcii celkových počtů jednoznačný.

Nejsilnější antibakteriální účinek na aerobní mezofilní mikroorganismy a také na koliformní bakterie vykazoval 10hm.% roztok kyseliny citronové. Rovněž statistická analýza potvrdila signifikantní rozdíl mezi celkovými počty mikroorganismů u neošetřených vzorků a vzorků ošetřených 10hm.% roztokem kyseliny citronové. Zajímavý je fakt, že ačkoliv byla aplikována rozdílná množství kyseliny, inhibiční účinek byl téměř shodný. U ostatních koncentrací roztoků kyseliny citronové vedla aplikace většího množství kyseliny citronové až k několika násobnému zvýšení antibakteriálního účinku. Nejnižší inhibiční efekt měl 2hm.% roztok kyseliny citronové a to bez rozdílu na aplikované množství. Mikrobiálním požadavkům na celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů stanoveným vyhláškou MZe ČR č. 375/2003 Sb., vyhověly téměř všechny ošetřené vzorky. Výjimkou byl 2hm.% roztok kyseliny citronové, kde došlo k překročení povolených limitů v průběhu čtvrtého dne skladování. Pro srovnání u neošetřených vzorků byly limitní hodnoty počtů mezofilních mikroorganismů překročeny již v průběhu třetího dne chladírenského skladování.

Vedle omezení růstu celkového počtu mezofilních mikroorganismů měl přídavek kyseliny citronové vliv i na pokles počtu koliformních bakterií. Vliv kyseliny citronové na úbytek koliformních bakterií byl signifikantní již po 24 hodinách skladování. Na základě této skutečnosti lze říci, že kyselina citronová vykazovala do určité míry selektivní antimikrobiální účinek proti koliformním bakteriím na povrchu chlazené drůbeže.

Lze konstatovat, že koncentrace kyseliny citronové s výraznějším inhibičním působením na mezofilní a koliformní bakterie leží v rozmezí 6 až 10hm.%. V případě

aplikace většího množství kyseliny citronové spadá do tohoto „účinného rozmezí“ i 4hm.% roztok kyseliny citronové. Významný antimykotický účinek kyseliny citronové na mikroflóru povrchu kuřat nebyl prokázán. Odrazem této skutečnosti je fakt, že přípustné mikrobiální hodnoty byly u této indikátorové skupiny překročeny v průběhu čtvrtého dne skladování a to shodně u vzorků ošetřených kyselinou citronovou i u vzorků neošetřených.

Ošetření povrchu chlazené drůbeže roztokem směsi organických kyselin také vedlo k okamžitému snížení povrchové kontaminace. Nejvýraznější antimikrobiální účinek měl 10hm.% roztok kyseliny citronové ve směsi s 1obj.% kyseliny mléčné. Přídavek 1 obj.% kyseliny mléčné k 10hm.% kyseliny citronové však způsobil snížení celkového inhibičního účinku tohoto roztoku. Přídavek kyseliny mléčné pozitivně ovlivnil antibakteriální účinek 2 a 4hm.% roztoku kyseliny citronové. Inhibiční účinky ostatních koncentrací roztoků zůstaly srovnatelné s účinkem roztoků kyseliny citronové bez přídavku kyseliny mléčné. Antibakteriální aktivita směsi organických kyselin vůči koliformním bakteriím byla nepatrně výraznější ve srovnání s účinkem na mezofilní mikroorganismy. Antibakteriální efekt směsi organických kyselin na kvasinky a plísně dosahoval maximálně desetinásobné redukce. Přídavek 1obj.% kyseliny mléčné neměl statisticky významný vliv na redukci počtů kvasinek a plísní. Přestože inhibiční efekt směsi kyselin na kvasinky a plísně byl nevýrazný, prodloužil údržnost ošetřených vzorků o jeden den.

Závěrem lze říci, že ošetření povrchu chlazené drůbeže roztokem kyseliny citronové (samotné) nebo její směsí s kyselinou mléčnou vedlo k okamžitému snížení povrchové kontaminace. Účinek byl zpravidla ještě výraznější při aplikaci většího množství roztoku (20 ± 2 ml). Ukazuje se tedy, že testovaný způsob ošetření povrchu masa roztokem kyseliny citronové a její směsí s kyselinou mléčnou zpomaluje mikrobiální nárůst, což v konečném důsledku znamená výrazné zvýšení údržnosti chlazené drůbeže. Náklady na dekontaminaci mohou být kompenzovány zejména garancí a stabilizací jakostních znaků. Ovšem je nutné připomenout, že žádná technologická překážka nemůže nahradit vstupní jakost suroviny stejně jako vysokou hygienu výroby a provozu v potravinářských závodech.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ADAMS, M.R., MOSS, M.O. *Food Microbiology*. 2nd edition. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2002. 479 s. ISBN 0-85404-611-9
- [2] ALDOVA, E., HAUSNER, O., GABRHELOVA, M. et al. A hydrogen sulphide producing gram-negative rod from water. *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. [A]*, March 1983, vol. 254, no. 1, s. 95-108, ISSN 0176-6694
- [3] ALQUATI, C., GIOIA, L., SANTAROSSA, G. et al. The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*. *European Journal of Biochemistry*, 2002, vol. 269, s. 332 - 3328, ISSN 0014-2956
- [4] BARBUT, Shai. *Poultry Products Processing - An Industry Guide*. 1st edition. Boca Raton: CRC Press, 2002. 548 s. ISBN 1-58716-060-9
- [5] BERGSSON, G., ARNFINNSSON, J., STEINGRIMSSON, O., et al. Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *APMIS*, July 2001, vol. 109, s. 670-678, ISSN 0903-4641
- [6] BÉZA, T. *Výskyt alimentárních onemocnění a AČR se zaměřením na kampylobakteriозy*. Vyškov, 2004. 151 s. Doktorská disertační práce na Fakultě ekonomiky a managementu VVŠPV ve Vyškově na katedře materiálu a služeb. Školitel disertační práce Jan Šimůnek.
- [7] BLATNÁ, D. *Neparametrické metody – Testy založené na pořádkových a pořadových statistikách*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola ekonomická v Praze, Fakulta informatiky a statistiky, 1996. 217 s. ISBN 80-7079-607-3
- [8] BOLDER, N. M. Decontamination of meat and poultry carcasses. *Trends in Food Science & Technology*, July 1997, vol. 8, ISSN 0924-2244
- [9] BRENNER, D. J. – KRIEG, N. R. – STANLEY, J. T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2 – The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria. 2nd edition. Springer Science+Business Media, 2005. 1106 s. ISBN 0-387-24144-2
- [10] BRUL, S. – COOTE, P. Preservative Agents in Foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, vol. 50, s. 1-17, ISSN 0168-1605
- [11] BŘEZINOVÁ, K. *Výskyt termofilních Campylobacter sp. v potravním řetězci*. Brno, 2003. 91 s. Atestační práce na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně. Školitel atestační práce Iva Steinhäuserová

- [12] COROLLER, L., GUERROT, V., HUCHET, V. et al. Modelling the influence of single acid and mixture on bacterial growth. *International Journal of Food Microbiology*, October 2005, vol. 100, s. 167 – 178, ISSN 0168-1605
- [13] CORRY, J. E. L., JAMES. C., JAMES. S. J. *Salmonella, Campylobacter and Escherichia coli* 0157:H7 decontamination techniques for the future. *International Journal of Food Microbiology*, 1995, vol. 28, s. 187-196, ISSN 0168-1605
- [14] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*. 1. vyd. Praha: SNTL; Bratislava: ALFA, 1983. 629 s. ISBN 04-815-83
- [15] DAVIES, A., BOARD, R. *The Microbiology of Meat and Poultry*. 1st edition. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 327 s. ISBN 0-7514-0398-9
- [16] DEMNEROVÁ, K., et al. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. 3. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2001. 179 s. ISBN 80-7080-415-7
- [17] DINCER, A. H., BAYSAL, T. Decontamination Techniques of Pathogen Bacteria in Meat and Poultry. *Critical Reviews in Microbiology*. April 2004, vol. 30, s. 197-204, ISSN: 1040-841X
- [18] DUCKOVÁ, V., ČANIGOVÁ, M. Výskyt psychrotrofných mikroorganizmů v máse a možnosti ich obmedzenia. *Maso*. 2005, vol. 16, no. 3, s. 29-31, ISSN 1210-4086
- [19] FRIEDRICH, V. *Statistika I. Vysokoškolská učebnice pro distanční studium*. 1. vyd. Plzeň: Západočeská univerzita v Plzni, 2002. 398 s. ISBN 80-7082-913-3
- [20] GÖRNER, F., VALÍK, L'. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľství Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7
- [21] GPFFERTOVÁ, D., et al. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena*. 3. vyd. Praha: Nakladatelství TRITON, 2002. 148 s. ISBN 80-7254-223-0
- [22] GREENWOOD, D. – SLACK RICHARD C.B. – PEUTHERER, J.F., et al. *Lékařská mikrobiologie – přehled infekčních onemocnění: patogenese, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. 1. vyd. Havlíčkův Brod: Grada Publishing, 1999. 690 s. ISBN 80-7169-365-0
- [23] GROSSMAN, M. *Mikrobiologie v hygieně – speciální část*. 1. vyd. Vyškov: Vysoká vojenská škola pozemního vojska, 1998. 127 s. ISBN 80-7231-037-2

- [24] HASSINEN, J. B., DURBIN, G. T., BERNHART, F. W. The Bacteriostatic Effects of Saturated Fatty Acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1951, vol. 31, s. 183-189
- [25] HINTON, A., INGRAM, K.D. Use of Oleic Acid To Reduce the Population of the Bacterial Flora of Poultry Skin. *Journal of Food Protection*, March 2000, vol. 63, no. 9, s. 1282-1286, ISSN 0362-028X
- [26] HRABĚ, J., KRÍŽ, O., BUŇKA, F. *Statistické metody v senzorické analýze potravin*. 1. vyd. Vyškov: Vysoká škola pozemního vojska ve Vyškově, 2001. 114 s. ISBN 80-7231-086-0
- [27] HRUBÝ, S., TUREK, B. *Mikrobiologická problematika ve výživě*. 1. vyd. Vyškov: Vysoká vojenská škola pozemního vojska ve Vyškově, 1996. 145 s. ISBN 80-7013-232-9
- [28] HSIAO, CH-P., SIEBERT, K.J. Modelling the Inhibitory Effect of Organic Acids on Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. January 1999, vol. 47, s. 189-201, ISSN 0168-1605
- [29] INGR, I. *Základy konzervace potravin*. 1. vyd. 1999 (dotisk). Brno: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2002. 130 s. ISBN 80-7157-396-5
- [30] INGR, I., BOŽEK, R. MÍKA, O. et al. Dynamika postmortálních změn pH v prsní a stehenní svalovině kuřat. *Czech Journal of Animal Science*, 1997, vol. 42, no. 11, s. 517-522, ISSN 1212-1819
- [31] International Commission on Microbiological Specifications for Foods *Microorganisms in Foods 7 – Microbiological Testing in Food Safety Management*. III. Series. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2002. 362 s. ISBN 0-306-47262-7
- [32] JANDOVÁ, B. – KOTOUČKOVÁ, L. *Praktikum z mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 1996. 64 s. ISBN: 80-210-1374-5
- [33] JIČÍNSKÁ, E. – HAVLOVÁ, J. *Mikrobiologická kontrola potravin a potravinářských surovin v legislativě EU*. 1. vyd. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1998. 76 s., ISBN 80-85120-95-X
- [34] KADAŇOVÁ, V. *Údržnost masa a masných výrobků*. Praha, 1996. 31 s. Diplomová práce na Fakultě potravinářské a biochemické technologie VŠCHT v Praze na ústavu konzervace potravin a technologie masa. Vedoucí diplomové práce Petr Pipek.

- [35] KADLEC, P., et al. *Technologie potravin I*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. 300 s. ISBN 80-7080-509-9
- [36] KEENER, K. M., BASHOR, M. P., CURTIS, P. A., et al. Comprehensive Review of *Campylobacter* and Poultry Processing. *Comprehensive Reviews in Food and Food Safety* – Institute of Food Technologies, 2004, vol. 3
- [37] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo Alfa, 1990. 704 s. ISBN 80-05-00644-6
- [38] KONEČNÝ, S. Nemoci, o kterých bychom měli vědět. Méně známí původci bakteriálních onemocnění z potravin (II). *Maso*. 2001, vol. 12, no. 6, s. 22-26, ISSN 1210-4086
- [39] KÖRCKEL, L., HECHELMANN, H. Mikrobiologie der Kühlung, Kühllagerung und Fleischreifung. *Fleischwirtschaft*. 1999, vol. 79, no. 3, s. 90-93
- [40] KRŮŽ, L., PROCHÁZKA, O. *Zpracování a ošetření drůbežích produktů*. 1. vyd. Praha: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR, 1997. 29 s. ISBN 80-7105-085-7
- [41] KYZLINK, V. *Teoretické základy konzervace potravin*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství SNTL; Bratislava. Nakladatelství ALFA, 1988. 511 s. typové číslo L18 C3 IV 31/88471
- [42] MALEŘ, Josef. *Zpracování masa*. 1. vyd. Praha: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR, 1994. 36 s. ISBN 80-7105-085-7
- [43] MARC, Y. L., HUCHET, V., BOURGEOIS, C.M., et al. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology*, August 2002, vol. 73, s. 219-237, ISSN 0168-1605
- [44] MAREL, G. M., LOGTESTIJN, J. G., MOSSEL, D. A. A. Bacteriological quality of broiler carcasses as affected by in-plant lactic acid decontamination. *International Journal of Food Microbiology*, 1988, vol. 6., s. 31-42, ISSN 0168-1605
- [45] MAROUNEK, M., SKŘIVANOVÁ, E., RADA, V. Susceptibility of *Escherichia coli* to C2-C18 Fatty Acids. *Folia Microbiologica*, May 2003, vol 48, no. 6, s. 731-735, ISSN 0015-5632

- [46] MATYÁŠ, Z., et al. *Podklady pro zavedení HACCP do oboru zpracování surovin a potravin živočišného původu*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2002. 141 s. ISBN 80-7305-428-0
- [47] MEAD, G.C. Current Trends in the Microbiological Safety of Poultry Meat. *World's Poultry Science Journal*, March 2004, vol. 60, s. 112-118, ISSN 0043-9339
- [48] *Mikrobiologické kontaminanty v potravinách*. Brno: Státní zdravotní ústav - Vědecký výbor pro potraviny, 2004. 29 s. kód publikace: MIKRO/2003/2/deklas
- [49] MOJTO, J., ZAUJEC, K. Aktuálne údaje o chemickom zložení a nutričnej hodnote mäsa hospodárskych a divých zvierat. *Maso*. 2001, vol. 12, no. 4, s. 39-41, ISSN 1210-4086
- [50] NAKAI, S. A., SIEBERT, K.J. Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acid. *International Journal of Food Microbiology*, November 2003, vol. 86, s. 249-255, ISSN 0168-1605
- [51] NÁPRAVNÍKOVÁ, E., PAVLÍČEK, J. Ošetření povrchu jatečně ošetřené drůbeže preparátem GELFORMT. *Maso*, 1999, vol. 5, s. 39-42, ISSN 1210-4086
- [52] Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1831/2003 z 22. září 2003, o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat
- [53] NETTEN, P., MOSSEL, D. A. A., HUIS IN 'T VELD, J. Lactic acid decontamination of fresh pork carcasses: a pilot plant study. *International Journal of Food Microbiology*, March 1995, vol. 25, s. 1-9, ISSN 0168-1605
- [54] PHILLIPS, C. A., DUGGAN, J. The effect of temperature and citric acid, alone, and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture. *Food Control*, 2002, vol. 13, s. 463-468, ISSN 0965-7135
- [55] PIPEK, P. *Technologie masa II*. 2. vyd. Praha: Kostelecké uzeniny, 1994. 303 s. ISBN 80-7080-106-9
- [56] PIPEK, P., BAČO, B., BRYCHTA, J. Použití kyseliny mléčné k dekontaminaci povrchu masa (II). *Maso*, 1997, vol. 1., s. 65 – 68, ISSN 1210-4086
- [57] PIPEK, P., FÍLA, P., JELENÍKOVÁ, et al. Technological aspects of acid decontamination of carcasses. *Chemické listy*, 2004, vol. 98. s. 865 – 869, ISSN 1213-7103
- [58] PIPEK, P., JELENÍKOVÁ, J., ŠIKULOVÁ, M. Dekontaminace jatečně upravených těl kombinací páry a kyseliny mléčné. *Potravinářská Revue*, 2004, vol. 2, s. 20-23

- [59] *Přídavné látky (aditiva) v potravinách*. Brno: Státní zdravotní ústav - Vědecký výbor pro potraviny, 2004. 9 s. kód publikace: ADIT/2003/1/deklas
- [60] RICKE, S.C. Perspectives on the Use of Organic Acids and Short Chain Fatty Acids as Antimicrobials. *Poultry Science*, December 2003, vol. 82, s. 632-639
- [61] ROSE, A. H. – HARRISON, J. S. *The Yeasts*. Volume 5. Yeast Technology. 2nd edition. London: ACADEMIC PRESS, 1993. 620 s. ISBN 0-12-596415-3
- [62] ROSICKÝ, B. – SIXL, W. , et al. *Salmonelózy – Aktuální informace pro lékaře, veterinární lékaře a potravinářskou praxi*. 1. vyd. Praha: SCIENTIA MEDICA, 1994. 208 s. ISBN 80-85526-23-9
- [63] RYOO, N-H., HA, J-S., JEON, D-S. et al. A case of Pneumonia Cause by *Ewingella americana* in a Patient with Chronic Renal Failure. *Journal of Korean Medical Science*, 2005, vol. 20, s. 143-145, ISSN 1011-8934
- [64] SENSES-ERGUL, S., ÁGOSTON, R., BELÁK, A. et al. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *International Journal of Food Microbiology*, April 2006, vol. 108, no. 1, s. 120 – 124, ISSN 0168-1605
- [65] SIMEONOVÁ, J., INGR, I., GAJDŮŠEK, S. *Zpracování a zbožíznalství živočišných produktů*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003. 122 s. ISBN 80-7157-708-1
- [66] SIMEONOVÁ, J., et al. *Technologie drůbeže, vajec a minoritních živočišných produktů*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1999. 247 s. ISBN 80-7157-405-8
- [67] SINHAMAHAPATRA, M., BISWAS, S., DAS, A.K., et al. Comparative study of different surface decontaminants on chicken quality. *British Poultry Science*, October 2004, vol. 45, no. 5, s. 624-630, ISSN 007-1668
- [68] SKÁLA, M. Vodní aktivita a růstové podmínky mikroorganismů. *Maso*. 2001, vol. 12, no. 4, s. 19-21, ISSN 1210-4086
- [69] SKŘIVANOVÁ, E. *Účinky mastných kyselin na enteropathogenní bakterie trávicího traktu hospodářských zvířat*. Brno 2005. 107 s. Doktorská disertační práce na Fakultě Veterinární hygieny a ekologie na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně. Školitel disertační práce Pavel Suchý.
- [70] Směrnice Evropského parlamentu a Rady 94/34/ES ze dne 30. června 1994, kterou se mění směrnice 89/107/EHS o sblížení právních předpisů členských států

týkajících se potravinářských přídatných látek povolených pro použití v potravinách určených k lidské spotřebě

- [71] SMULDERS, F. J. M., GREER, G. G. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, vol. 44, s. 149 -169, ISSN 0168-1605
- [72] STATVYD [program na CD-ROM]. Ver. 2.0 beta. Zlín, 2005. Počítačový program pro zpracování a vyhodnocení statistických dat. Pracuje pod programem MS Excel verze 97 a vyšší.
- [73] STEINHAUSER, L., et al. *Hygiena a technologie masa*. 1. vyd. Brno: Vydavatelství potravinářské literatury LAST, 1995. 664 s. ISBN 80-900260-4-4
- [74] STEINHAUSER, L. *HACCP v oboru jatečnictví a zpracování masa*. Potravinářská Revue. 2004, vol. 1, s. 16-18
- [75] STEINHAUSEROVÁ, I., et al. *Produkce a zpracování drůbeže, vajec a medu*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2003. 82 s. ISBN 80-7305-462-0
- [76] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd. Praha: Nakladatelství VICTORIA PUBLISHING, 1995. 361 s. ISBN 80-85605-71-6
- [77] TNW-lite [program na CD-ROM]. Ver. 4.0., PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o., Počítačový program určený pro identifikaci mikroorganismů. Pracuje pod OS Windows/9x/ME/NT/2000/XP.
- [78] TRYFINOPOULOU, P., TSAKALIDOU, E., NYCHAS, G.-J. E. Characterization of *Pseudomonas spp.* Associated with Spoilage of Gilt-Head Sea Bream Stored under Various Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, January 2002, vol. 68, no. 1, s. 65-72, ISSN 0099-2240
- [79] VAŘEJKA, F. – MRÁZ, O. – SMOLA, J. *Speciální veterinární mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1989. 264 s. ISBN 80-209-0042-X
- [80] VEČEREK, V., HERZIG, I. Bezpečnost potravin živočišného původu. *Veterinářství*, 2004, vol. 54, s. 38-44
- [81] VELICHOVÁ, H. *Kvalitativní aspekty výroby potravin s prodlouženou údržností*. Vyškov, 2002. 120. s. Doktorská disertační práce na Fakultě ekonomiky obrany státu a logistiky VVŠPV ve Vyškově na katedře ekonomiky a hygieny výživy. Školitel disertační práce Pavel Březina.

- [82] VELÍŠEK, J., et al. *Chemie potravin III*. 1. vyd. Tábor: Vydala firma OSSIS, 1999, 368 s. ISBN 80-902391-5-3
- [83] VIRTO, R., SANZ, D., ÁLVAREZ, I., et al. Inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* by citric and lactic acid at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, vol. 103, s. 251-257, ISSN 0168-1605
- [84] VLKOVÁ, A. Zlepšení mikrobiologické kvality drůbeže při zpracování. In *Potravinářství IV*. 1. vyd. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1997. Kapitola 6. 117-126 s. ISBN 80-85120-56-9
- [85] Vyhláška MZ ČR č. 304/2003 Sb., ze dne 6. května 2004, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných a pomocných látek při výrobě potravin. Praha: 2004
- [86] Vyhláška MZ ČR č. 318/2003 Sb., ze dne 12. září 2003, kterou se mění vyhláška č. 54/2002 Sb, kterou se stanoví zdravotní požadavky na identitu a čistotu přídatných látek. Praha: 2003
- [87] Vyhláška MZe ČR č. 375/2003 Sb., ze dne 30. října 2003, kterou se provádějí některá ustanovení zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon), ve znění pozdějších předpisů, a o veterinárních požadavcích na živočišné produkty. Praha: 2003.
- [88] *Výskyt vybraných hlášených alimentárních infekcí a intoxikací v ČR v letech 2000 – 2005* [online] Praha: Státní zdravotní ústav, 2006-2-22 [citováno 2006-5-18]. Dostupné z URL <http://www.szu.cz/cem/zpravy/default.htm>. Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie – Epidat
- [89] YOUSEF, A.E. - CARLSTROM, C. *Food Microbiology: A Laboratory Manual*. 1st edition. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003. 277 s. ISBN 0-472-39205-0
- [90] Zákon č. 110/1997 Sb., ze dne 24. dubna 1997, o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. Praha: Agrospoj, 1998.
- [91] ZEITOUN, A. A. M., DEBEVERE, J. M. Decontamination with lactic acid/sodium lactate buffer in combination with modified atmosphere packaging effects on the shelf life of fresh poultry. *International Journal of Food Microbiology*, April 1992, vol. 16, s. 89-98, ISSN 0168-1605

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

% id.	procento identifikace
a_w	vodní aktivita
CCFAC	Codex Committee on Food Additives and Contaminants
CEM	Centrum epidemiologie a mikrobiologie
CFU	Colony Forming Units
CPM	celkový počet mikroorganismů
ČR	Česká republika
EFSA	European Food Safety Authority
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemoragická
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvazivní
ENDO	Endo Agar
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogenní
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigenní
EU	Evropská unie
FAO	Food and Agriculture Organization
G ⁻	gramnegativní
G ⁺	grampozitivní
hm.%	hmotnostní procento
ICMSF	International Commission for the Microbiological Specifications for Foods
JOT	jatečně opracované těla
KAT	důkaz produkce katalázy
KOH	KOH test
MID	minimální infekční dávka
MSA	Mannitol Salt Agar

MZ	Ministerstvo zdravotnictví
MZe	Ministerstvo zemědělství
NPM	nejvyšší povolené množství
obj.%	objemové procento
ONP	důkaz produkce β -galaktosidázy
OXI	důkaz produkce oxidázy
PCA	Plate Count Agar
pKa	disociační konstanta kyselin
SZÚ	Státní zdravotní ústav
Tin	T-index
TPC	Total Plate Count
TSI	Triple Sugar Iron Agar
VPT	Voges – Proskauerův test
WHO	World Health Organization
YEP	Yellow Pigment
YGA	Chloramphenicol Yeast Glucose Agar
σ	směrodatná odchylka

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Dendrogram znázorňuje vzájemnou podobnost kyselin na základě jejich charakteristických vlastností. Osm tučně zvýrazněných kyselin, z daných 17, představuje skupinu těch, které mají charakteristické vlastnosti velmi odlišné [28]	38
Obr. 3. Kombinace doby působení a koncentrace kyseliny citronové (A) a kyseliny mléčné (B) potřebné k obdržení 3 log redukce při teplotě 4°C (—), 20°C (.....) a 40°C (-----) [83].....	40
Obr. 4. Grafické znázornění molekuly kyseliny mléčné	41
Obr. 6. Závislost úbytku aerobních mezofilních mikroorganismů na době skladování - působení pěti koncentrací kyseliny citronové (aplikované množství 15±2 ml).....	56
Obr. 7. Závislost úbytku koliformních bakterií na době skladování - působení pěti koncentrací kyseliny citronové (aplikované množství 15±2 ml).....	57
Obr. 8. Závislost úbytku kvasinek a plísni na době skladování - působení pěti koncentrací kyseliny citronové (aplikované množství 15±2 ml).....	58
Obr. 9. Závislost úbytku aerobních mezofilních mikroorganismů na době skladování - působení pěti koncentrací kyseliny citronové (aplikované množství 20±2 ml).....	59
Obr.10. Závislosti úbytku koliformních bakterií na době skladování - působení pěti koncentrací kyseliny citronové (aplikované množství 20±2 ml).....	60
Obr.11. Závislost úbytku kvasinek a plísni na době skladování - působení pěti koncentrací kyseliny citronové (aplikované množství 20±2 ml).....	61
Obr.12. Závislost úbytku aerobních mezofilních mikroorganismů na době skladování - působení pěti koncentrací směsí organických kyselin (aplikované množství 15±2 ml).....	62

Obr.13. Závislost úbytku koliformních bakterií na době skladování - působení pěti koncentrací směsí organických kyselin (aplikované množství 15±2 ml).....	63
Obr.14. Závislost úbytku kvasinek a plísní na době skladování - působení pěti koncentrací směsí organických kyselin (aplikované množství 15±2 ml).....	64
Obr.15. Závislost úbytku aerobních mezofilních mikroorganismů na době skladování - působení pěti koncentrací směsí organických kyselin (aplikované množství 20±2 ml).....	65
Obr.16. Závislost úbytku koliformních bakterií na době skladování - působení pěti koncentrací směsí organických kyselin (aplikované množství 20±2 ml).....	66
Obr.17. Závislost úbytku kvasinek a plísní na době skladování - působení pěti koncentrací směsí organických kyselin (aplikované množství 20±2 ml).....	67
Obr.18. Vývoj pH v závislosti na koncentraci roztoku kyseliny citronové použité k ošetření (aplikované množství 15±2 ml)	69
Obr.19. Vývoj pH v závislosti na koncentraci roztoku kyseliny citronové použité k ošetření (aplikované množství 20±2 ml)	70
Obr.20. Vývoj pH v závislosti na koncentraci směsi kyseliny citronové a mléčné použité k ošetření (aplikované množství 15±2 ml)	71
Obr.21. Vývoj pH v závislosti na koncentraci směsi kyseliny citronové a mléčné použité k ošetření (aplikované množství 20±2 ml)	72
Obr.22. Vliv koncentrace kyseliny citronové na hodnotu pH roztoku	73
Obr.23. Rozdělení izolovaných kmenů na grampozitivní a gramnegativní s podrozdělením na aerobní a fakultativně anaerobní bakterie	74
Obr.24. Procentuální zastoupení jednotlivých identifikovaných bakteriálních kmenů (souprava ENTEROtest 24).....	76
Obr.25. Procentuální zastoupení jednotlivých identifikovaných bakteriálních kmenů (souprava NEFERMtest)	77

- Obr.27. Srovnání vlivu aplikace rozdílných 2hm.% roztoků kyselin na hodnoty pH kůže kuřat v prvním dni chladiřenského skladování 87
- Obr.28. Srovnání tří ploten na živné půdě PCA po 72 hodinách skladování (ředění 10^{-4}) 115
- Obr.29. Srovnání tří ploten na Endo agaru po 72 hodinách skladování (ředění u kontroly a 2hm.% vzorku je 10^{-4} a u 10hm.% vzorku 10^{-2}) 115
- Obr.30. Srovnání tří ploten na živné půdě YGA po 72 hodinách skladování (ředění u kontroly je 10^{-4} u zbývajících dvou vzorků 10^{-3}) 115
- Obr.31. Srovnání tří ploten na živné půdě PCA, odběr byl proveden ihned po aplikaci roztoku organických kyselin (ředění 10^0)..... 116
- Obr.32. Srovnání tří ploten na živné půdě PCA po 72 hodinách skladování (ředění 10^{-4}) 116
- Obr.33. Srovnání tří ploten na Endo agaru, odběr byl proveden ihned po aplikaci roztoku organických kyselin (ředění 10^0)..... 116
- Obr.34. Srovnání tří ploten na Endo agaru po 72 hodinách skladování (ředění u kontroly a 2hm.% vzorku je 10^{-4} a u 10hm.% vzorku 10^{-2}) 117
- Obr.35. Srovnání tří ploten na živné půdě YGA, odběr byl proveden ihned po aplikaci směsi kyselin (ředění u kontroly a 2hm.% vzorku bylo 10^{-1} , u 10hm.% vzorku 10^0) 117
- Obr.36. Srovnání tří ploten na živné půdě YGA po 72 hodinách skladování (ředění u kontroly je 10^{-4} u zbývajících dvou vzorků 10^{-3}) 117

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Základní chemické složení masa drůbeže – kuře [49, upraveno].....	13
Tab. 2. Obsah cholesterolu v mase drůbeže (kuře) a kvalita tuku [49, upraveno]	14
Tab. 3. Počet bakterií na pokožce kuřat při jednotlivých operacích jatečného zpracování [20, upraveno]	17
Tab. 4. Výskyt vybraných hlášených alimentárních infekcí a intoxikací v České republice v letech 2000-2005 (Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie SZU Praha, [88]).....	25
Tab. 5. Teplotní rozmezí pro růst jednotlivých skupin mikroorganismů [73].....	28
Tab. 6. Nejdůležitější rody bakterií, jejich optimální růstová teplota a teplotní rozmezí růstu (které ovšem nelze určit přesně) [27, upraveno]	29
Tab. 7. Minimální a maximální hodnoty pH pro růst vybraných mikroorganismů [20, upraveno].....	30
Tab. 8. Přidatné látky – kyselina citronová a mléčná, jejich E-kód a výše nejvyššího povoleného množství [výňatek z vyhlášky č. 304/2004 Sb]	33
Tab. 9. Přehled nejčastěji používaných organických kyselin a jejich disociační konstanty ve vztahu k procentu nedisociované kyseliny při různých hodnotách pH [51]	36
Tab.10. Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 15±2 ml kyseliny citronové).....	56
Tab.11. Celkové počty koliformních bakterií vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 15±2 ml kys. citronové).....	57
Tab.12. Celkové počty kvasinek a plísní vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 15±2 ml kys. citronové).....	58

Tab.13. Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 20±2 ml kyseliny citronové).....	59
Tab.14. Celkové počty koliformních bakterií vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 20±2 ml kyseliny citronové)	60
Tab.15. Celkové počty kvasinek a plísní vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 20±2 ml kyseliny citronové).....	61
Tab.16. Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 15±2 ml směsí organických kyselin).....	62
Tab.17. Celkové počty koliformních bakterií vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 15±2 ml směsí organických kyselin).....	63
Tab.18. Celkové počty kvasinek a plísní vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 15±2 ml směsí organických kyselin).....	64
Tab.19. Celkové počty aerobních mezofilních mikroorganismů vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 20±2 ml směsí organických kyselin).....	65
Tab.20. Celkové počty koliformních bakterií vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 20±2 ml směsí organických kyselin).....	66
Tab.21. Celkové počty kvasinek a plísní vyjádřené jako log CFU/g kůže v průběhu 72 hodin skladování (aplikace 20±2 ml směsí organických kyselin).....	67
Tab.22. Vliv přídavku kyseliny citronové na průběh hodnoty pH kůže kuřat během chladírenského skladování (aplikované množství 15±2 ml)	68
Tab.23. Vliv přídavku kyseliny citronové (aplikované množství 20±2 ml) na průběh hodnoty pH kůže kuřat během chladírenského skladování	69
Tab.24. Vliv směsi kyseliny citronové a mléčné (aplikované množství 15±2 ml) na průběh hodnoty pH kůže kuřat během chladírenského skladování	70

Tab.25. Vliv směsi kyseliny citronové a mléčné na průběh hodnoty pH kůže kuřat během chladírenského skladování (aplikované množství 20 ± 2 ml).....	71
Tab.26. Výsledky identifikace – souprava ENTEROtest 24	75
Tab.27. Výsledky identifikace – souprava NEFERMtest.....	76
Tab.28. Výsledky identifikace – souprava STAPHYtest	77

SEZNAM PŘÍLOH

P I: ZÁKLADNÍ SCHÉMA OPRACOVÁNÍ DRŮBEŽE

P II: MIKROBIOLOGICKÉ POŽADAVKY NA ŽIVOČIŠNÉ PRODUKTY

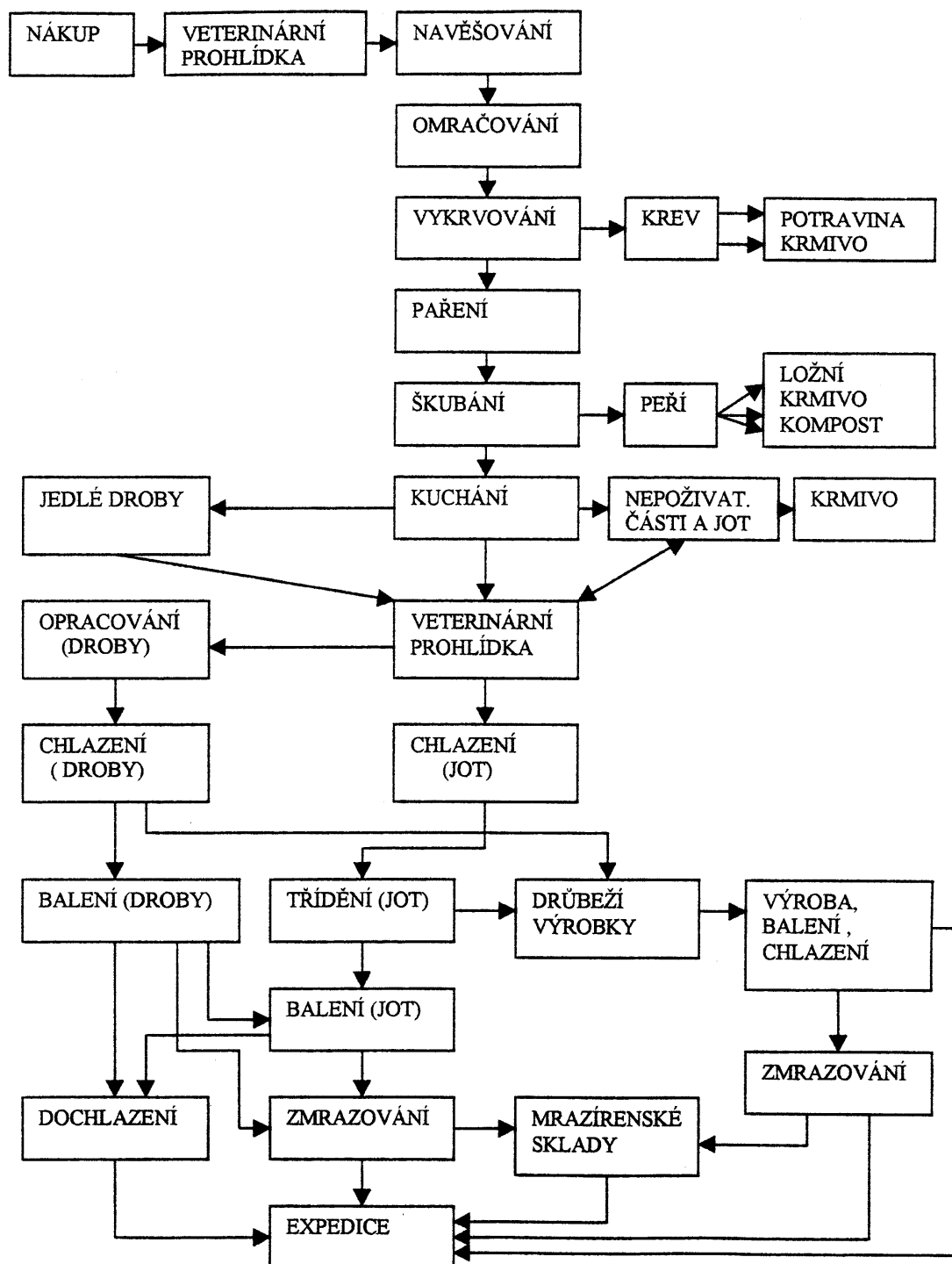
P III: VÝSLEDKY BIOCHEMICKÝCH TESTŮ

P IV: VÝSLEDKY ZKUMAVKOVÝCH TESTŮ (TSI)

P V: FOTOGRAFIE PLOTEN SLEDOVANÝCH INDIKÁTOROVÝCH
SKUPIN – APLIKACE ROZTOKU KYSELINY CITRONOVÉ (20±2 ml)

P VI: FOTOGRAFIE PLOTEN SLEDOVANÝCH INDIKÁTOROVÝCH
SKUPIN – APLIKACE SMĚSÍ ORGANICKÝCH KYSELIN (20±2 ml)

PŘÍLOHA P I: ZÁKLADNÍ SCHÉMA OPRACOVÁNÍ DRŮBEŽE



* JOT = JATEČNĚ OPRACOVANÁ TĚLA

**PŘÍLOHA P II: MIKROBIOLOGICKÉ POŽADAVKY NA ŽIVOČIŠNÉ
PRODUKTY**

	I	II ¹⁾						
		a)	b)	c)		d)	e)	f)
				ca)	cb)			
A. Původci kažení a indikátorové mikroorganismy								
Aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy v 1 g (ml) ²⁾	$5 \cdot 10^7$	10^5	$5 \cdot 10^7$	10^4	10^6	$5 \cdot 10^4$	10^5 $5 \cdot 10^5$ (mléko kozí a ovčí)	10^2
Koliformní mikroorganismy v 1 g (ml) ²⁾	$5 \cdot 10^5$	10^4	$5 \cdot 10^5$	10^2	10^4	0		
Escherichia coli v 1 g (ml) ²⁾	10^5	10^3	10^5	0	10^2			
Kvasinky v 1 g (ml) ²⁾	$5 \cdot 10^7$	10_6	$5 \cdot 10^7$	10^2	0			
Plísně v 1 g (ml) ²⁾	⁴⁾	10^4	⁴⁾	10^2	10^4	0		
B. Původci onemocnění z potravin								
Bacillus cereus v 1 g (ml)	$5 \cdot 10^5$	10^4	$5 \cdot 10^5$	$<10^1$	10^3	0		
Pseudomonas aeruginosa v 1 g (ml)	10^5	10^3	10^5	0	10^2	0		
Staphylococcus aureus v 1 g (ml)	$5 \cdot 10^5$	10^3	$5 \cdot 10^5$	$<10^1$	10^4	0	$5 \cdot 10^2$	
Sulfitredukující klostridia v 1 g (ml)	$5 \cdot 10^5$	10^3	$5 \cdot 10^5$	$<10^1$	10^3	0		
Salmonella spp. v 25 g (ml), popř. v 50 g (ml) ³⁾	0/25	0/25	0/25	0/50	0/50	0/25	0/25	0/25
Escherichia coli 0157 v 25 g (ml) ³⁾	0	0	0	0	0	0	0	0
Campylobacter jejuni v 25 g (ml)		0		0				
Yersinia enterocolitica (enteropatogenní serotypy v 25 g (ml) ³⁾	0	0	0	0	0	0	0	0
Listeria monocytogenes v 25 g (ml) ³⁾		0					0	
Vibrio parahaemolyticus v 25 g (ml) ^{3), 5)}	0	0	0	0	0			
Stafylokokové enterotoxiny	neprokazatelné testem RPLA							
Mykotoxiny	nejvyšší přípustné limity stanoví vyhláška č. 53/2002 Sb., ve znění pozdějších předpisů							

Vysvětlivky:

(I) Mezní mikrobiální hodnoty

(II) Přípustné mikrobiální hodnoty pro hlavní skupiny výrobků

- 1) Skupiny výrobků: a) výrobky tepelně neopracované, určené k přímé spotřebě bez tepelného opracování. Tyto hodnoty platí i pro krev jatečných zvířat určenou k prodeji; b) výrobky, které budou před uvedením do oběhu a spotřeby tepelně opracovány; c) výrobky pro kojeneckou výživu – ca) k přímé spotřebě, cb) ke spotřebě po tepelné úpravě; d) mléko a jiné tepelně ošetřené živočišné produkty určené jako surovina pro výrobu potravin živočišného původu; e) syrové mléko k přímé spotřebě; f) vejce.
- 2) Bez mikroorganismů patřících ke kulturní mikroflóře
- 3) Od mezní hodnoty nebo jejího zjišťování může být upuštěno,
 - a) zajišťuje-li technologický proces nebo tepelné kuchyňské opracování bezpečnou devitalizaci mikroorganismů, jsou-li splněny stanovené veterinární podmínky a požadavky při výrobě a vzhledem k balení a oddělení od jiných potravin neexistuje zdravotní riziko,
 - b) pocházejí-li suroviny ze zvířat, která nejsou nositeli těchto původců nákaz.
- 4) Bez viditelného růstu; při nálezů toxinogenních plísní je třeba vyšetření na mykotoxiny.
- 5) Týká se pouze ryb, měkkýšů, korýšů z vod tropických a subtropických pásem.

PŘÍLOHA P III: VÝSLEDKY BIOCHEMICKÝCH TESTŮ

ČÍSLO KMENU	IZOLOVÁNO Z MÉDIA	PROFIL	TVAR; OKRAJE	BARVA;LESK/MAT	GRAM morfologie	KOH	KAT	OXI	VPT	ONP	YEP
1	ENDO	pupkovitý	okrouhlý, rovné	kovovězelený lesk	tyčky	-	+	-	-	+	-
2	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	fialová barva, lesklá	krátké tyčky až kokotyčky	-	+	-	+	+	-
3	PCA	vypouklý	okrouhlý, rovné	pastelově růžová až oranžová; lesklá	koky	-	+	-	+	+	růžová
4	PCA	vypouklý	okrouhlý, rovné	tmavě vínová, světlejší okraj; lesklá	koky	-	+	-	+	+	červená
5	PCA	zvýšený	okrouhlý, rovné	bílá, neprůhledná, lesklá	koky	+	+	-	-	N	-
6	PCA	zvýšený	okrouhlý, rovné	světle žlutá, pastelová, lesklá	koky	+	+	-	-	N	-
7	PCA	ploché	okrouhlý, rovné	citronově žlutá, neprůhledná, lesklá	koky	+	+	-	+	N	+
8	PCA	zvýšený	okrouhlý, rovné	žlutozelená, neprůhledná, lesklá	koky	+	+	-	-	N	-
9	PCA	vypouklý	okrouhlý, rovné	bílá - velká, polopřehledná, lesklá	kokotyčky - krátké tyčky	-	+	+	-	-	-
10	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	bílý okraj, uprostřed zelenožlutá, lesklá	krátké tyčky	-	+	+	-	+	-
11	ENDO	ploché	okrouhlý, rovné, tvar kulatý, okraj nepravidelný	průhledná zeleno-žlutá, lesklá	krátké tyčky	-	+	+	+	-	-
12	ENDO	zvýšený	okrouhlý, rovné	tmavě vínová, kovový lesk	krátké tyčky	-	+	+	+	+	-
13	ENDO	zvýšený	okrouhlý, rovné	podobná č. 12 jen o odstín tmavější	kokotyčky	-	+	+	-	+	-
14	PCA	zvýšený	okrouhlý, rovné	jasně žlutá, lesklá	koky	+	+	-	+	N	+
15	ENDO	zvýšený	okrouhlý, rovné	tmavě fialová, ke středu několik soustředných kruhů, na okraj světlejší, lesklá	krátké tyčky	-	+	+	-	+	-
16	PCA	knoflíkovitý	tvar kulatý, okraj zvlněný	krémová barva, matná	koky	+	+	-	-	N	-
17	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné, okraj malinko vrubovaný	světle růžová, ke středu tmavější, lesklá	kokotyčky	-	+	-	-	+	-
18	PCA	knoflíkovitý	okrouhlý, rovné	krémová až nažloutlá barva, matně lesklá	kokotyčky	+	+	-	-	N	-
19	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	světle růžová barva, uprostřed tmavější, malá velikost, lesk	dlouhé tyčky	-	+	+	-	-	-
20	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	světle růžová barva, velká velikost, lesk	tyčky	-	+	+	+	+	-
21	PCA	ploché	okrouhlý, rovné	žlutá, drobné velikosti, polopřehledná, lesklá	krátké tyčky	-	+	-	+	+	+
22	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	oranžová, uprostřed tmavější, lesklá	tyčky	-	+	-	+	+	+
23	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	světle růžová barva, uprostřed tmavější, malá velikost, lesk	dlouhé tyčky	-	+	+	-	-	-
24	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	světle růžová barva, velká velikost, lesk	kokotyčky	-	+	-	+	+	-
25	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	oranžová, uprostřed tmavější, lesklá	dlouhé tyčky	-	+	+	-	-	-
26	PCA	zvýšený	okrouhlý, rovné	žlutá, drobné velikosti, polopřehledná, lesklá	tyčky	-	+	-	+	+	+
27	PCA	vypouklý/ knoflíkový	okrouhlý; lehce zubatý okraj	bílá krémová barva, velká velikost	tyčky	-	+	-	-	+	-

ČÍSLO KMENU	IZOLOVÁNO Z MÉDIA	PROFIL	TVAR; OKRAJE	BARVA;LESK/MAT	GRAM morfologie	KOH	KAT	OXI	VPT	ONP	YEP
28	ENDO	zvýšený	okrouhlý, rovné	tmavě růžová až vínová, uprostřed tmavější, lesklá	kokotýčky	-	+	+	+	+	-
29	PCA	vypouklé	okrouhlý, rovné	bílá, malá velikost, lesk	N	-	+	+	-	-	-
30	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	světle růžová barva, velká velikost, lesk	dlouhé tyčky	-	+	+	-	-	-
31	PCA	zvýšený / plochý	okrouhlý, rovné	žlutá, drobné velikosti, poloprůhledná, lesklá	krátké tyčky	-	+	-	+	+	+
32	ENDO	zvýšený	okrouhlý, rovné	tmavě růžová až vínová, uprostřed tmavější, lesklá	krátké tyčky až kokotýčky	-	+	+	-	+	-
33	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	oranžová, drobná velikost, lesklá	krátké tyčky	-	+	-	+	+	+ (-)
34	MSA		nerovný okraj	žlutá, matná	kokotýčky	-	+	+	-	+	-
35	MSA	mírně vypouklé	okrouhlý, hladký okraj	červená	kokotýčky	-	+	-	-	+	-
36	MSA	vypouklá	lehce vrásčitý okraj	růžová, lesklá	kokotýčka - krátké tyčky, koky	-	+	-	+	+	-
37	PCA	vypouklý/ knoflíkový	okrouhlý/rovný až lehce zubatý okraj	bílá krémová barva, velká velikost		+	+	+	+	N	-
38	PCA	vypouklé	okrouhlý, rovné	bílá, malá velikost, lesk	krátké tyčky	-	+	+	-	-	-
39	ENDO	zvýšený	okrouhlý, rovné	tmavě růžová až vínová, uprostřed tmavější, lesklá	kokotýčky	-	+	+	+	+	-
40	PCA	zvýšený	okrouhlý, rovné	žlutá, drobné velikosti, poloprůhledná, lesklá	kokotýčky	-	+	-	-	+	-
41	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	světle růžová barva, velká velikost, lesk	kokotýčky	-	+	+	-	+	-
42	PCA	vypouklé	okrouhlý, rovné	bílá, malá velikost, lesk	tyčky	-	+	+	-	-	-
43	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	světle růžová barva, uprostřed tmavější, malá velikost, lesk	dlouhé tyčky	-	+	+	-	-	- (+)
44	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	světle růžová barva, velká velikost, lesk	kokotýčky	-	+	+	+	+	-
45	PCA	zvýšený	okrouhlý, rovné	žlutá, drobné velikosti, poloprůhledná, lesklá	kokotýčky	-	+	-	+	+	+
46	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	oranžová, uprostřed tmavější, lesklá	tyčky	-	+	-	+	+	+
47	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	světle růžová barva, uprostřed tmavější, malá velikost, lesk	dlouhé tyčky	-	+	+	-	-	-
48	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	světle růžová barva, velká velikost, lesk	kokotýčky	-	+	-	+	- (+)	-
49	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	oranžová, uprostřed tmavější, lesklá	krátké tyčky	-	+	-	+	-	+
50	PCA	zvýšený	okrouhlý, rovné	žlutá, drobné velikosti, poloprůhledná, lesklá	krátké tyčky	-	+	-	+	+	+
51	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	světle růžová barva, velká velikost, lesk	dlouhé tyčky	-	+	+	-	-	-
52	PCA	zvýšený	okrouhlý, rovné	žlutá, drobné velikosti, poloprůhledná, lesklá	krátké tyčky	-	+	-	+	+	+
53	ENDO	vypouklý	okrouhlý, rovné	oranžová, drobná velikost, lesklá	krátké tyčky	-	+	-	+	+	+(-)
54	ENDO	zvýšený	okrouhlý, rovné	tmavě růžová až vínová, uprostřed tmavější, lesklá	kokotýčky	-	+	+	-	+	-

PŘÍLOHA P IV: VÝSLEDKY ZKUMAVKOVÝCH TESTŮ (TSI)

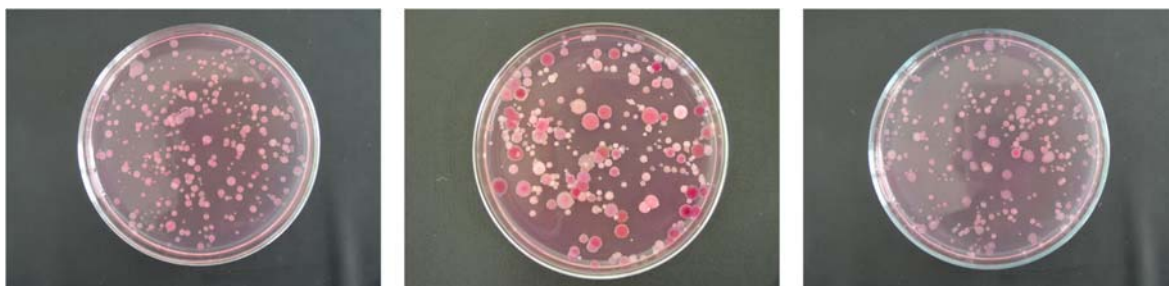
ČÍSLO KMENU	IZOLOVÁNO Z MÉDIA	DEAMINACE AMINOKYSELIN	FERMENTACE GLUKÓZY	FERMENTACE LAKÓZY A SACHARÓZY	PRODUKCE H ₂ S
1	PCA	-	-	-	-
2	PCA	-	-	-	-
3	PCA	+	+	-	-
4	PCA	+	+	-	-
5	PCA	N	N	N	N
6	PCA	N	N	N	N
7	PCA	N	N	N	N
8	PCA	N	N	N	N
9	PCA	-	-	-	-
10	ENDO	-	-	-	-
11	ENDO	-	-	-	-
12	ENDO	+	-	-	-
13	ENDO	-	-	-	-
14	PCA	N	N	N	N
15	ENDO	-	-	-	-
16	PCA	N	N	N	N
17	ENDO	+	+	+	-
18	PCA	N	N	N	N
19	ENDO	-	-	-	-
20	ENDO	-	-	-	-
21	PCA	+	+	-	-
22	ENDO	+	+	-	-
23	ENDO	+	-	-	-
24	ENDO	+	+	-	-
25	ENDO	-	-	-	-
26	PCA	-	-	-	-
27	PCA	-	-	-	-
28	ENDO	-	-	-	-
29	PCA	-	-	-	-
30	ENDO	-	-	-	-
31	PCA	+	+	-	-
32	ENDO	-	-	-	-
33	ENDO	+	-	-	-
34	MSA	-	-	-	-
35	MSA	-	-	-	-
36	MSA	+	-	-	-
37	PCA	N	N	N	N
38	PCA	-	-	-	-
39	ENDO	-	-	-	-
40	PCA	-	-	-	-
41	ENDO	-	-	-	-
42	PCA	-	-	-	-
43	ENDO	-	-	-	-
44	ENDO	-	-	-	-
45	PCA	+	+	-	-
46	ENDO	+	+	-	-
47	ENDO	-	-	-	-
48	ENDO	+	+	-	-
49	ENDO	-	-	-	-
50	PCA	-	-	-	-
51	ENDO	-	-	-	-
52	PCA	-	-	-	-
53	ENDO	+	+	-	-
54	ENDO	-	-	-	-

PŘÍLOHA P V: FOTOGRAFIE PLOTEN SLEDOVANÝCH INDIKÁTOROVÝCH SKUPIN – APLIKACE ROZTOKU KYSELINY CITRONOVÉ (20±2 ml)

Všechny níže uvedené fotografie jsou seřazeny následujícím způsobem: vlevo kontrola, uprostřed vzorek po aplikaci 2hm.% kyseliny citronové a vpravo vzorek po aplikaci 10hm.% kyseliny citronové.



Obr. 28 Srovnání tří ploten na živné půdě PCA po 72 hodinách skladování (ředění 10^{-4})



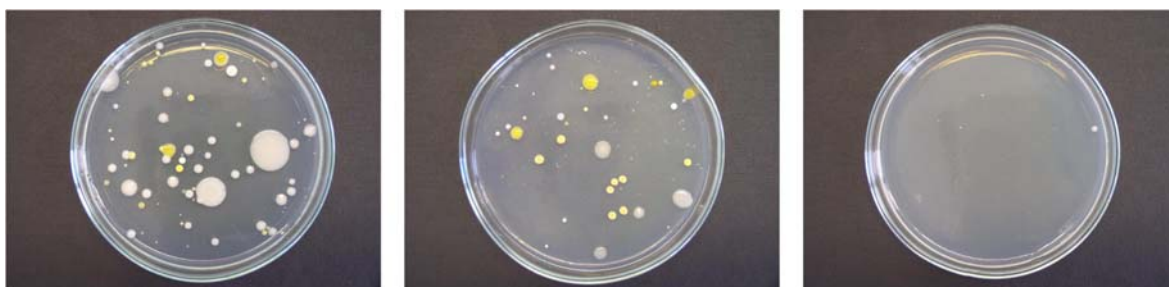
Obr. 29 Srovnání tří ploten na Endo agaru po 72 hodinách skladování (ředění u kontroly a 2hm.% vzorku je 10^{-4} a u 10hm.% vzorku 10^{-2})



Obr. 30 Srovnání tří ploten na živné půdě YGA po 72 hodinách skladování (ředění u kontroly je 10^{-4} u zbývajících dvou vzorků 10^{-3})

PŘÍLOHA P VI: FOTOGRAFIE PLOTEN SLEDOVANÝCH INDIKÁTOROVÝCH SKUPIN – APLIKACE SMĚSÍ ORGANICKÝCH KYSELIN (20±2 ml)

Všechny níže uvedené fotografie jsou seřazeny následujícím způsobem: vlevo kontrola, uprostřed vzorek po aplikaci 2hm.% kyseliny citronové ve směsi s kyselinou mléčnou a vpravo vzorek po aplikaci 10hm.% kyseliny citronové ve směsi.



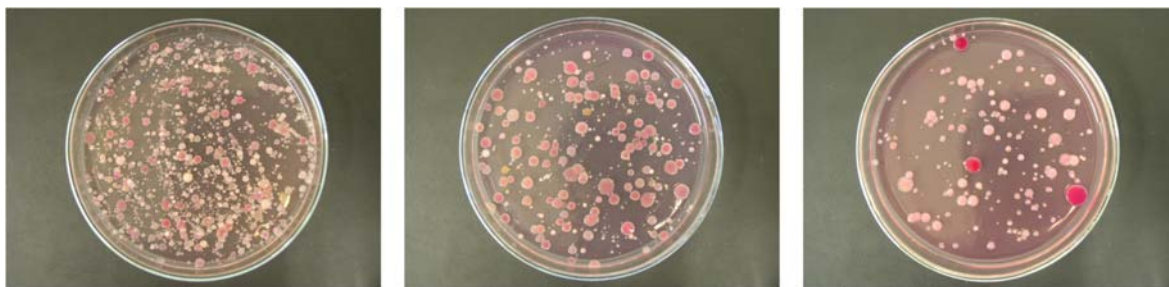
Obr. 31 Srovnání tří ploten na živné půdě PCA, odběr byl proveden ihned po aplikaci roztoku organických kyselin (ředění 10^0)



Obr. 32 Srovnání tří ploten na živné půdě PCA po 72 hodinách skladování (ředění 10^4)



Obr. 33 Srovnání tří ploten na Endo agaru, odběr byl proveden ihned po aplikaci roztoku organických kyselin (ředění 10^0)



Obr. 34 Srovnání tří ploten na Endo agaru po 72 hodinách skladování (ředění u kontroly a 2hm.% vzorku je 10^{-4} a u 10hm.% vzorku 10^{-2})



Obr. 35 Srovnání tří ploten na živné půdě YGA, odběr byl proveden ihned po aplikaci směsí kyselin (ředění u kontroly a 2hm.% vzorku bylo 10^{-1} , u 10hm.% vzorku 10^0)



Obr. 36 Srovnání tří ploten na živné půdě YGA po 72 hodinách skladování (ředění u kontroly je 10^{-4} u zbývajících dvou vzorků 10^{-3})