

# **Inhibiční účinky polyfosforečnanů na vybrané kmeny mikroorganismů**

Bc. Iveta Krpalová

---

Diplomová práce  
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

akademický rok: 2013/2014

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Iveta Křpalová  
Osobní číslo: T12410  
Studijní program: N2901 Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů a kosmetiky  
Forma studia: prezenční  
Téma práce: Inhibiční účinky polyfosforečnanů na vybrané mikroorganismy

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Charakterizace fosforečnanů a polyfosforečnanů
2. Výskyt a využití fosforečnanů a polyfosforečnanů v potravinách a kosmetických prostředcích
3. Působení fosforečnanových a polyfosforečnanových solí na růst mikroorganismů

### II. Praktická část

1. Stanovení inhibičních účinků komerčně využívaných fosforečnanů lišících se délkou řetězce a koncentrací na vybrané mikroorganismy
2. Grafické zpracování výsledků
3. Zhodnocení inhibičního účinku jednotlivých solí na testované mikroorganismy a diskuse výsledků

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J., *Chemie potravin, I. díl*, OSSIS 2009, , 467 s., ISBN 978-80-86659-15-2.

[2] MAIER, S., SHERER, S., LOESSNER M., *Long-chain polyphosphate cause cell lysis and inhibits Bacillus cereus septum formation, which is depend on divalent cations*, *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, vol. 65(9):3942-3949

[3] KAPRÁLEK, F. *Fyziologie bakterií*, SPN Praha, 1986, 608 s.

[4] MOLINS, R., *Phosphates in Food*, CRC Press, Inc. 1991, ISBN 0-8493-4588-X.

Vedoucí diplomové práce:

**doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

**10. února 2014**

Termín odevzdání diplomové práce:

**26. května 2014**

Ve Zlíně dne 10. února 2014

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
Ing. Martina Černeková, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: .....

Obor: .....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně .....

.....

Podpis studenta

---

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **ABSTRAKT**

Fosforečnany jsou přídatné látky (aditiva) a v potravinářských technologiích se využívají především za účelem úpravy pH a emulgačních vlastností, případně pro své antimikrobní účinky. V této diplomové práci byl sledován inhibiční efekt šesti fosforečnanů na vybrané druhy grampozitivních a gramnegativních bakterií. Pro dané účely byly použity soli (HEXA 62, HEXA 65, HEXA 68, HEXA 70, HEXA PE a  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), které se lišily různou délkou řetězce. Pro sledování senzitivity jednotlivých bakteriálních kmenů bylo využito pěti koncentrací každé soli (0,25 %; 0,50 %; 0,75 %; 1,00 % a 2,00 % w/v). Účinky fosforečnanů na růst mikroorganismů byly vyhodnoceny plotnovou metodou stanovením počtu živých buněk. Pozorováním růstového chování bakterií bylo zjištěno, že s rostoucím stupněm kondenzace rostl i inhibiční efekt testovaných fosforečnanových solí. Zároveň bylo prokázáno, že u gramnegativních bakterií nebyl v převážné většině pozorován výrazný inhibiční účinek.

Klíčová slova: fosforečnany, inhibiční efekt, kondenzační stupeň, grampozitivní bakterie, gramnegativní bakterie.

## **ABSTRACT**

Phosphates are food additives and in food technology are mainly used for adjusting the pH and emulsifying properties, or for their antimicrobial effects. In this work was studied the inhibitory effect of phosphate on the six selected species of Gram-positive and Gram-negative bacteria. For the purposes of salt were used (HEXA 62, HEX 65, HEXA 68, HEXA 70, HEXA PE and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) differing chain lengths. For monitoring the sensitivity of individual bacterial strains were used five concentrations of each salt (0.25%; 0.50%; 0.75%; 1.00% and 2.00% w/v). Effects of phosphates on the growth of microorganisms were evaluated plate method by determining the number of living cells. Observing the behavior of the growth of bacteria, it was found that with increasing trans condensing it grew even tested the inhibitory effect of phosphate salts. It was also shown that the Gram-negative bacteria were observed in most pronounced inhibitory effect.

Keywords: phosphates, chelation, inhibitory effects, condensation degree, Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria.

Děkuji RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za trpělivost, odborné vedení, cenné rady a připomínky při realizaci mé diplomové práce. Dále bych také ráda poděkovala všem, kteří se na tvorbě mé diplomové práce podíleli a rovněž všem, kteří mi umožnili práci zrealizovat. Rovněž děkuji své rodinně za finanční i morální podporu při studiu.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 FOSFOREČNANY</b> .....	<b>12</b>
1.1 CHEMICKÁ STRUKTURA A NÁZVOSLOVÍ FOSFOREČNANŮ .....	12
1.2 VLASTNOSTI FOSFOREČNANŮ A JEJICH PRŮMYSLOVÁ VÝROBA .....	14
1.2.1 Jednoduché fosforečnany .....	14
1.2.2 Kondenzované fosforečnany .....	15
1.3 INTERAKCE FOSFOREČNANŮ SE SLOŽKAMI POTRAVIN.....	16
1.4 FOSFOREČNANY V POTRAVINÁCH .....	17
1.4.1 Tavené sýry .....	19
1.4.2 Pekařské výrobky .....	19
1.4.3 Ryby .....	19
1.4.4 Masné výrobky .....	20
1.5 FOSFOREČNANY A LEGISLATIVA.....	20
1.6 VLIV FOSFOREČNANŮ UŽÍVANÝCH V POTRAVINÁŘSTVÍ NA LIDSKÝ ORGANIZMUS.....	23
1.6.1 Resorpce fosforu .....	24
1.6.2 Kyselina fytová.....	24
1.6.3 Nedostatek a přebytek fosforu .....	24
<b>2 VLIV FOSFOREČNANOVÝCH SOLÍ NA MIKROBIÁLNÍ POPULACI</b> .....	<b>26</b>
2.1 ANTIMIKROBNÍ ÚČINKY FOSFOREČNANŮ .....	26
2.2 PŮSOBNÍ FOSFOREČNANŮ NA STRUKTURU BUŇKY .....	27
2.3 VYBRANÉ SKUPINY TECHNOLOGICKY VÝZNAMNÝCH MIKROORGANIZMŮ .....	28
2.3.1 Rod <i>Clostridium</i> .....	28
2.3.2 Rod <i>Enterococcus</i> .....	29
2.3.3 Rod <i>Lactobacillus</i> .....	30
2.3.4 Rod <i>Lactococcus</i> .....	32
2.3.5 Rod <i>Micrococcus</i> .....	33
2.3.6 Rod <i>Pseudomonas</i> .....	34
2.3.7 Rod <i>Salmonella</i> .....	35
2.3.8 Rod <i>Staphylococcus</i> .....	35
<b>3 METODY STANOVENÍ POČTU MIKROORGANIZMŮ</b> .....	<b>37</b>
3.1 STANOVENÍ CELKOVÉHO POČTU MIKROORGANIZMŮ .....	37
3.1.1 Přímé stanovení počtu buněk mikroorganismů mikroskopickým počítáním.....	37
3.1.2 Nepřímé stanovení počtu buněk.....	38
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>40</b>
<b>4 CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>41</b>
<b>5 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>42</b>



5.1	PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY .....	42
5.2	POUŽITÉ MIKROORGANIZMY .....	42
5.3	KULTIVAČNÍ PŮDY .....	43
5.4	ROZTOKY A OSTATNÍ CHEMIKÁLIE .....	46
5.4.1	Zásobní roztoky fosforečnanů .....	46
5.4.2	Fyziologický roztok .....	46
5.5	PŘÍPRAVA SUSPENZE BAKTERIÍ .....	46
5.6	DEKONTAMINACE POUŽITÉHO MATERIÁLU .....	46
5.7	SLEDOVÁNÍ ÚČINKŮ FOSFOREČNANOVÝCH SOLÍ NA VYBRANÉ KMENY MIKROORGANIZMŮ .....	47
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>50</b>
6.1	VLIV FOSFOREČNANŮ NA RŮST BAKTERIÍ .....	50
6.1.1	Vliv fosforečnanových solí na <i>Clostridium perfringens</i> CAPM 5744.....	50
6.1.2	Vliv fosforečnanových solí na <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224 .....	51
6.1.3	Vliv fosforečnanových solí na <i>Lactobacillus brevis</i> DEPE T89 .....	52
6.1.4	Vliv fosforečnanových solí na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141 .....	54
6.1.5	Vliv fosforečnanových solí na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946 .....	55
6.1.6	Vliv fosforečnanových solí na <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732 .....	57
6.1.7	Vliv fosforečnanových solí na <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> DEPE K38 .....	58
6.1.8	Vliv fosforečnanových solí na <i>Staphylococcus epidermidis</i> DEPE K42.....	59
6.1.9	Vliv fosforečnanových solí na <i>Salmonella</i> Enteritidis CCM 4420.....	60
6.1.10	Vliv fosforečnanových solí na <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955 .....	62
6.2	SOUHRNNÁ DISKUZE .....	63
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>68</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>69</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>76</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>77</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>78</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>79</b>

## ÚVOD

Z mikrobiologického hlediska je nutné si uvědomit, že potraviny využívané pro výživu jsou jen zřídka sterilní, a většinou obsahují nesčetná mikrobiální společenstva, jejichž složení je dáno zpracováním potravin a jejím původem. Většina těchto mikroorganismů pochází z přirozené mikroflóry potravinářských surovin a z mikroflóry do ní vnesené během skladování, zpracování a distribuce. Počty jednotlivých bakteriálních buněk v daných potravinách vypovídají o historii jejich přípravy. Mikroorganismy, které se v potravině mohou vyskytovat, patří mezi plísně, kvasinky, bakterie a protozoa. Způsobují kažení potravin, nebo jsou nositeli alimentárních onemocnění, která mohou být způsobena buď produkcí toxinů (botulotoxin, antrax), nebo přítomností samotného mikroorganismu.

V souvislosti se zajištěním údržnosti a zdravotní nezávadnosti je kažení potravin závažným problémem. Jedná se o soubor několika na sebe navazujících pochodů, při nichž dochází k tvorbě nepříjemně chutnajících, zapáchajících ale i zdraví škodlivých látek, které činí potravinu nepoživatelnou. Pro potlačení těchto nežádoucích jevů jsou do poživatin přidávána potravinářská aditiva, která primárně působí proti nežádoucím mikroorganismům a zajišťují tak výstup kvalitnějšího výrobku.

Antimikrobní účinek fosforečnanů spočívá v chelataci divalentních iontů, které jsou pro mikroorganismy esenciální a k udržení buněčné integrity nepostradatelné. Snaha zajistit minimální aplikovatelné množství komerčně dostupných solí, jež by potlačily růst nebezpečných mikroorganismů, vede stále k dalším výzkumům.

Předmětem studie této diplomové práce je sledovat inhibiční účinky polyfosforečnanů v různém kondenzačním stupni na růst vybraných kmenů potravinářsky významných bakterií a na základě zpracovaných výsledků diskutovat teoretický předpokládaný inhibiční efekt.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 FOSFOREČNANY

Fosforečnany ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), nebo-li fosfáty, jsou soli kyseliny trihydrogenfosforečné ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Fosforečnany nacházejí velmi rozmanité použití nejen v průmyslu, ale jsou také důležitou složkou veškeré živé hmoty. V přírodě se vyskytují v mnoha minerálních soustavách a plní rozhodující úlohu v procesu fotosyntézy. Ve formě fosforečných esterů jsou součástí fosfolipidů, fosfoproteinů, nukleotidů a řady dalších fyziologicky významných sloučenin. Některé z nich, a to zejména jejich amonné sloučeniny, se využívají jako hnojiva a živiny ve fermentačních půdách. Z hlediska lidské výživy jsou nepostradatelné. Klíčový význam mají fosforečnany také v potravinářském průmyslu. Přídavek fosforečnanů k potravinám umožňuje zlepšit jejich emulgační vlastnosti a příznivě ovlivňuje dobu skladování. Polyfosforečnany s dlouhým řetězcem, často též nazývány lineární metafosforečnany, vykazují antimikrobní efekt, a proto je v posledním desetiletí soustředěna pozornost na jejich předpokládané inhibiční účinky vůči některým technologicky významným mikroorganismům [1, s. 132], [2, s. 638-644].

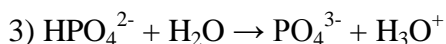
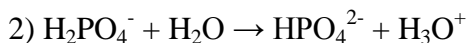
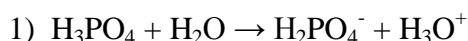
### 1.1 Chemická struktura a názvosloví fosforečnanů

Chemie fosforu je nejen rozsáhlá, ale i pestrá a překračuje tradiční hranice anorganické chemie nejen pro sklon fosforu tvořit nesčetné organické sloučeniny, ale také pro řadu klíčových rolí, které hraje v biochemii živých organismů. Převážná část fosforu (až 80 %) je v lidském těle uložena v kostech a zubech, zbytek je soustředěn v krvi a měkkých tkáních. Fosfor je díky svým vlastnostem důležitý v mnoha procesech, např. působí jako ochrana pro buňky tím, že posiluje buněčný obal, jinde slouží jako doprovodná látka a napomáhá funkci hormonů. Denní spotřeba fosforu u průměrného jedince činí 1,0 – 1,5 g [1, s. 132].

Fosfor poprvé izoloval alchymista Hennig Brant v roce 1699 - varem zahuštěnou moč destiloval při vysokých teplotách za nepřístupu vzduchu. V přírodě se fosfor vyskytuje výlučně v podobě fosforečnanů, tj. apatit, fosforit, apod. Všechny jeho minerály představují ortofosforečnany, redukovaný fosfidový materiál se objevuje v železných meteoritech. Pohyb fosforu prostředím cirkuluje ve dvou biologických cyklech a zahrnuje především masové využívání fosforečnanových hnojiv [2, s. 95], [3, s. 220-221].

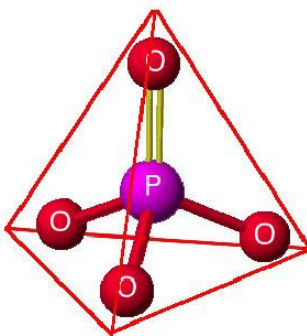
Kyselina fosforečná je trojsytná kyselina, která ve vodném roztoku snadno disociuje a v důsledku přítomnosti ionizovatelného protonu poskytuje tři řady solí. V závislosti na pH roztoku se fosforečnany mohou vyskytovat ve formě dihydrogenfosforečnanů ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), hydrogenfosforečnanů ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) a fosforečnanů ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Podle struktury rozlišujeme fosforečnany jednoduché, obsahující jednotlivé  $\text{PO}_4^{3-}$  skupiny, a fosforečnany kondenzované s vazbami -O-P-O-P-O-. Kondenzované fosforečnany mohou být lineární, cyklické nebo rozvětvené. Soli, které obsahují jednu skupinu  $\text{PO}_4^{3-}$ , označujeme jako ortofosforečnany. Při vysoké teplotě monomery ortofosforečnanu kondenzují a vytvářejí polymerní struktury. Kondenzací dvou molekul fosforečnanu vzniká pyrofosforečnan. Polymerací dvou a více fosforečnanových řetězců získáme polyfosforečnany. Spojováním molekul fosforečnanů mohou vznikat struktury lineární, prostorově větvené, tzv. ultrafosforečnany nebo metafosforečnany s uzavřenými cykly v řetězci [4, s. 1], [5, s. 725-739].

Schéma disociace kyseliny trihydrogenfosforečné [6, s. 1]:



Fosforečnanový iont má strukturu čtyřstěnu (viz Obr. 1). Centrální atom fosforu navazuje čtyři totožné atomy kyslíku. Formální náboj iontu je 3<sup>-</sup>. Konjugovanými bázemi fosfátového iontu jsou  $\text{HPO}_4^{2-}$  (hydrogenfosforečnan) a  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (dihydrogenfosforečnan). Dihydrogenfosforečnan je konjugovanou bází kyseliny trihydrogenfosforečné [7, s. 8].

Názvosloví fosforečnanů nejčastěji rozdělujeme do 4 základních skupin. První skupina je na základě počtu aniontů a kationtů. Druhým rozdělením dochází k pojmenování fosforečnanů podle počtu vodíků a kationtů a tedy upřesnění specifity dané soli. Třetí systém používají mezinárodní organizace FAO/WHO. Základ tohoto systému spočívá v číselném vyjádření počtu kationtů, vodíků a atomů fosforu. Poslední systém zohledňuje charakteristické vlastnosti fosforečnanů [7, s. 7].



Obr. 1. Tetraedrická struktura fosforečnanového iontu [8]

## 1.2 Vlastnosti fosforečnanů a jejich průmyslová výroba

### 1.2.1 Jednoduché fosforečnany

Průmyslově jsou ve významných množstvích vyráběny fosforečnany sodné, draselné, amonné a vápenaté.

Všechny tři sodné fosforečnany ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) se připravují neutralizací kyseliny trihydrogenfosforečné hydroxidem sodným. Ochlazením roztoku vykrytalizuje příslušný fosforečnan jako hydrát, který se následně separuje na odstředivce. Kalcinací v rotační peci získáme jejich bezvodé soli.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  se využívá k úpravě povrchu kovů a rovněž tvoří součást kyselých detergentů. V potravinářském průmyslu se využívá jako stabilizátor pH džusů a polévek.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  se používá jako prostředek zabraňující koagulaci bílkovin v průběhu zahušťování nebo sušení mléka.  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  saponifikuje tuky, a proto je jeho hlavní využití jako průmyslový čisticí prostředek pro stroje a lahve [4, s. 6].

Draselné fosforečnany jsou ve vodě lépe rozpustné než odpovídající soli sodné. Připravují se rovněž neutralizací kyseliny hydroxidem sodným s následnou ochlazovací krystalizací.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  se v potravinářském průmyslu využívají jako minerální přísada do džusů [4, s. 6].

Fosforečnany amonné se připravují neutralizací kyseliny fosforečné amoniakem s následným odpařením roztoku. Bezvodé amonné soli se využívají jako hnojiva, hasící prášky, případně pro nehořlavou úpravu textilu [4, s. 6].

Z vápenatých fosforečnanů se masově vyrábí  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  a to jako bezvodá sůl nebo hydrát. Příprava spočívá v neutralizaci kyseliny fosforečné  $\text{CaO}$ ,  $\text{CaCO}_3$  nebo  $\text{Ca}(\text{OH})_2$

(viz rovnice přípravy vápenatých fosforečnanů). Výsledná hustá suspenze je následně vysušena v rozprašovací sušárně.  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  se využívá jako stabilizátor mléčných výrobků a jako minerální přísada do potravin [4, s. 6].

Rovnice přípravy vápenatých fosforečnanů [4, s. 6]:



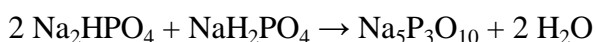
### 1.2.2 Kondenzované fosforečnany

Kondenzované fosforečnanové soli se obecně připravují z jednoduchých fosforečnanů alkalických kovů vydělením vody za vysokých teplot. Všechny kondenzované fosforečnany jsou za laboratorních podmínek rozpustné ve vodě. Vyšší kondenzované fosforečnany reagují jako soli silné jednosytné kyseliny a ve vodném roztoku disociují na fosforečnany jednoduché. Rychlost disociace je silně ovlivněna teplotou a pH roztoku [4, s. 7].

Cyklické fosforečnany, tzv. metafosforečnany, při vyšších teplotách v kyselých roztocích hydrolyzují nejprve na lineární kondenzované fosforečnany, následně až na fosforečnany jednoduché [4, s. 7].

Z kondenzovaných fosforečnanů je významný difosforečnan tetrasodný ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ). Výroba spočívá v několika krocích. V první fázi neutralizací kyseliny fosforečné získáme roztok dihydrogenfosforečnanu sodného, který následně vysušíme v rozprašovací sušárně. Bezvodý  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  je potom kalcinován [4, s. 7].

Trifosforečnan pentasodný ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ) se vyrábí kalcinací hydrogen- a dihydrogenfosforečnanu sodného při teplotě 300 až 550 °C dle rovnice [4, s. 6], [9, s. 3]:



Neutralizací kyseliny fosforečné hydroxidem získáme roztok směsi fosforečnanů. Roztok je následně vstřikován do spalující věže, kde se rychle suší a tuhá fáze kalcinuje na polyfosforečnan. Výroba se uskutečňuje jako jednostupňový či dvoustupňový proces [4, s. 7], [10].

Tavením reakční směsi dihydrogen- a hydrogenfosforečnanu sodného ve stechiometrickém poměru větším než 1:2 získáme směs kondenzovaných fosforečnanů. Délka jejich řetězce je ovlivněna reakčními podmínkami a následným zpracováním taveniny [4, s. 7].

Kondenzované fosforečnany mají rozsáhlé využití. Trifosforečnan pentasodný se využívá v pracích prášcích a detergentech, kde změkčuje vodu a zabraňuje následné redepozici sloučenin alkalických zemin na vlákna. V potravinářském průmyslu se kondenzované fosforečnany využívají při výrobě tavených sýrů, sušeného mléka, ale i v masném průmyslu (viz kapitola 1.4). V průmyslu jsou kondenzované fosforečnany využívány jako stabilizační a dispergační činidla při přípravě pigmentů a emulsních barev [4, s. 7].

### 1.3 Interakce fosforečnanů se složkami potravin

Fosforečnany mohou interagovat se složkami potravin. Jedná se především o interakce mezi bílkovinnými řetězci, v důsledku čehož dochází ke změně pH, iontové síly bílkovinného roztoku a v neposlední řadě k chelataci kovových kationtů. Fosforečnany se mohou absorbovat na proteiny nebo reagovat s nabitými skupinami v polypeptidech. Výsledkem této interakce je tvorba pevných komplexů a změna charakteristických vlastností daného proteinu, jako je hydratace, tvorba gelu nebo bobtnání. Další možností interakce a ovlivnění vlastností složek potravin je reakce mezi proteinovými skupinami [7].

V důsledku mechanického napětí bílkovinného roztoku jsou fosforečnany odpovědné za rozvolnění bílkovinných řetězců a vzniku dvoufázového rozhraní plyn-kapalina. Proteinové skupiny jsou orientovány směrem k vodné fázi, hydrofobní do fáze plynné. Interakce protein-fosforečnan hraje důležitou roli v procesu denaturace proteinů indukovanou vysokými nebo nízkými teplotami. Účinnost fosforečnanů ovlivňuje především doba jejich působení. Mezi nejvýznamnější faktory ovlivňující vysokoteplotní modifikaci proteinu patří pH média, stupeň hydratace proteinu či přítomnost jiných iontů [7].

V potravinářském průmyslu se mohou některé druhy fosforečnanů používat k zesílení účinků antioxidantů, jako je například butylhydroxyanisol (BHA), butylhydroxytoluen (BHT) či propylgalát (PG) [7].



## 1.4 Fosforečnany v potravinách

Fosfor je obsažen ve většině potravin v množství nad  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Výjimku představují rafinované tuky, kde je obsah fosforu jen stopový. Bohatý zdroj fosforu představují ořechy, sýry a ostatní mléčné výrobky.

Obsah fosforu ve vybraných potravinách shrnuje Tab. 1 [11, s. 465].

Tab. 1. Obsah fosforu ve významných potravinách a potravinových surovin [11]

Potravina	Obsah fosforu v $\text{mg.kg}^{-1}$
Maso vepřové	1300-2200
Maso kuřecí	1200-2500
Maso hovězí	1200-2000
Ryby	1900-3900
Sýry	2900-8600
Vejce slepičí	2100-2200
Pšenice	3000-4100
Chléb celozrnný	1800-2000
Rýže loupaná	770-1200
Sója	2900-7900
Vlašské ořechy	4300-5100
Brambory	320-580
Rajčata	210-260

Obsah fosforu může být v některých potravinách zvýšen nad přirozenou hladinu používáním potravinářských aditiv na bázi solí polyfosforečných kyselin nebo solí kyseliny trihydrogenfosforečné. Nejčastěji se používají polyfosforečnany sodné a draselné, zejména dihydrogenfosforečnan disodný. Seznam sloučenin fosforu, které lze v České republice používat, je uveden v Tab. 2 [11, s. 465].

Tab. 2. Seznam sloučenin fosforu používaných v ČR pro některé druhy potravin [12, s. 381].

Číslo E	Název
<b>E 338</b>	Kyselina fosforečná
<b>E 339</b>	Fosforečnany sodné: dihydrogenfosforečnany sodný, dihydrogenfosforečnan disodný, fosforečnan sodný
<b>E 340</b>	Fosforečnany draselné: dihydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan didraselný, fosforečnan draselný
<b>E 341</b>	Fosforečnany vápenaté: dihydrogenfosforečnan vápenatý, hydrogenfosforečnan vápenatý, fosforečnan vápenatý
<b>E450</b>	Difosforečnany: dihydrogendifosforečnan disodný, hydrogendifosforečnan trisodný, difosforečnan sodný, dihydrogendifosforečnan didraselný, difosforečnan draselný, difosforečnan draselný, dihydrogendifosforečnan vápenatý
<b>E451</b>	Trifosforečnany: trifosforečnan sodný, trifosforečnan draselný,
<b>E452</b>	Polyfosfáty: polyfosfát sodný, polyfosfát draselný, polyfosfát sodnovápenatý, polyfosfát vápenatý

Přídavek fosforečnanů k potravinám ovlivňuje hydrataci bílkovin a polysacharidů a jejich koloidní vlastnosti. Využívá se ke zvýšení vaznosti vody v některých mastných výrobcích a zajišťuje vhodnou texturu u tavených sýrů. Kyselina fosforečná se často používá jako okyselující látka pro nealkoholické nápoje (např. Coca-colu) a polyfosforečnany jako čířidla piva a vína. U nápojů balených v plechovkách fosforečnany zpomalují korozi obalu [11, s. 467-469], [13].

Fosforečnanová potravinářská aditiva jsou nejedovatá, v příslušném množství v potravinách pro všechny skupiny lidí, zdraví neškodná. Při nadužívání fosforečnanů může dojít k vylučování vápenatých iontů z těla a následně k jejich nedostatku. V některých případech dráždí oční sliznici a kůži. V případě vdechnutí většího množství mohou

fosforečnanové soli způsobovat podráždění dýchacích cest. Při požití mohou vyvolat zažívací problémy [14].

#### 1.4.1 Tavené sýry

V technologii výroby tavených sýrů našly fosforečnany uplatnění jako emulgační činidla. Hlavní surovinou je přírodní sýr, přísadami tavicí soli, smetana, máslo, tuky, podmásli a další ochucující látky. V běžné praxi se při tavení přidávají k přírodním sýrům tavicí soli, které v krátkém čase rozpouštějí a zamezují jejich vysrážení tím, že ze sýra váží určitý podíl vápníku. Principem výroby tavených sýrů je výměna vápenatých kationtů v potravině sodnými, případně draselnými, za kationty tavicích solí. Tím je omezena vazba vápenatých kationtů na mléčnou kyselinu a záhřevem je možné dosáhnout krémové konzistence bez nežádoucí koagulace. Tavicí soli ovlivňují ve finálním výrobku rozsah výměny vápenatých iontů, mimo jiné i pH, krémování, barvu, chuť, konzistenci i trvanlivost. Obsah solí ve finálním produktu nesmí přesáhnout 3 %. Jako tavicí soli se používají draselné a sodné soli kyseliny fosforečné nebo citronové, od roku 1929 se začaly využívat polyfosforečnany. Pro výrobu roztíratelných sýrů se obvykle využívají fosforečnany o pH 6,0-6,3. Nejvíce uplatňované polyfosforečnany jsou produkty kondenzace ortofosforečnanů v lineární formě. Při výběru druhu tavicí soli záleží na typu suroviny, jeho struktuře a zralosti [15], [16], [17, s. 91], [18].

#### 1.4.2 Pekařské výrobky

Přídavek fosforečnanu vápenatého do mouky nebo těsta podporuje kvasné procesy a tím i biologický kypřicí efekt. Za účasti mikrobiálních enzymů probíhají v důsledku metabolické aktivity buněk kvasinek chemické přeměny látek organických, obvykle sacharidů a vznikají látky energeticky chudší nebo se nové látky syntetizují. Pro kvasinky je fosfor také jedním z biogenních prvků, které jsou pro růst a množení kvasinek nezbytné. V buňce kvasinek stimuluje enzymy, aminokyseliny a tím výrazně přispívá k jejich růstu a množení [19, s. 148-154], [20].

#### 1.4.3 Ryby

Přídavek polyfosforečnanů zajišťuje čerstvost a šťavnatost rybiho masa. U kvalitních ryb, řádně zmrazených a následně udržovaných při mrazírenských teplotách, snižují množství

vypuzené vody svalovinou a tím se výrazně podílejí v zachování retence vody v proteinech. Po rozmrazení udržují optimální vlastnosti svaloviny. Navázání polyfosforečnanů na proteiny zlepšuje vzhled a vlastnosti porcované svaloviny. Zapříčiňují změnu barvy z typicky hnědé na bílou s modrým odstínem. Rybí svalovina prosycena polyfosforečnanem je vhodná pro přípravu tvarovaných rybích produktů. Na povrchu ořezů vytváří mazovatělou vrstvu, která během následného formování zabraňuje deformaci svaloviny, která by mohla negativně ovlivnit výtěžnost masa. Přídavek polyfosforečnanů v nadbytečné míře zapříčiňuje zhoršení textury, chutě, a negativně ovlivňuje trvanlivost [21].

#### 1.4.4 Masné výrobky

Používání fosforečnanů je v současné době povoleno ve všech masných výrobcích. Nejvyšší povolené množství činí  $5 \text{ g.kg}^{-1}$ , které je přepočítáváno jako  $\text{P}_2\text{O}_5$ . V praxi se dávkování fosforečnanových solí u tepelně opracovaných masných výrobků pohybuje v rozmezí od 2-3g na kilogram masa a tuku. Při výrobě se používají prostředky v práškové nebo kapalné formě. Účinek jejich působení v masných výrobcích závisí na délce bílkovinného řetězce, hodnotě pH a vazbě některých kovových aniontů. Hlavní funkce fosforečnanů spočívá v obnovení hydratační kapacity masa po porážce. Proniknutím fosforečnanů do svalové tkáně dojde k ovlivnění elektrostatických interakcí mezi aktinem a myozinem. Pohlcováním solí masem přispívá k zpevnění těchto interakcí, což vede k zeslabení soudržnosti mezi vlákny. Sůl v díle vyvolává odpudivý efekt a výsledkem je rozšíření sítě mezi vlákny. Vlákna aktinu se mění na tenkou vrstvu nabobtnalých struktur. Vlákna myozinu tvoří dlouhé trojrozměrné prostorové sítě s dodatečně nahromaděnou a navázanou vodou.

Fosforečnany se v masných výrobcích mohou rovněž uplatňovat jako dobré chelatační činidla. Dodávají výrobkům přírodní chuť a šťavnatost, rovněž zaručují stabilitu jakosti [22], [23].

### 1.5 Fosforečnany a legislativa

Do průmyslově vyráběných potravin se běžně z technologického důvodu přidávají látky, které prodlužují trvanlivost potravin, zvýrazňují nebo obnovují barvu potravin, zvyšují nebo regulují kyselost. Podle platné legislativy se přídatné látky mohou přidávat do

potravin při jejich výrobě, balení, přepravě nebo skladování, čímž se samy stávají nebo se mohou stát součástí potraviny [24].

Přidatné látky povolené při výrobě potravin, potraviny a skupiny potravin, v nichž se mohou přidatné látky vyskytovat, musí dle vyhlášky 4/2008 Sb. splňovat tyto podmínky a lze je použít [25]:

- jen při výrobě potravin, pro které jsou určeny,
- maximálně do hodnoty nejvyššího povoleného množství (NPM),
- pouze v nezbytně nutném množství potřebném k dosažení zamýšleného technologického účinku,
- pouze pokud je prokázána technologická potřeba jejich použití,
- pokud v použitém množství nepředstavují riziko pro spotřebitele,
- ke zvýšení trvanlivosti potraviny nebo zlepšení jejích organoleptických vlastností.

Každá přidatná látka nesoucí označení „E“ kódu prošla důkladným ověřovacím postupem, na jehož základě je uděleno povolení k používání při výrobě potravin za přesně definovaných podmínek. Povolení je vždy specifické pro určité druhy nebo skupiny potravin. Součástí schvalovacího postupu jsou specifické toxikologické testy, kterých se účastní akreditované laboratoře. Problematikou aditiv v potravinách se zabývá Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC) [24], [26].

Použití fosforečnanů je upraveno, stejně jako u ostatních přídatných látek užívaných v potravinářství, vyhláškou Ministerstva zdravotnictví č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin (viz. Tab. 3) [25].

Tab. 3. Nejvyšší povolené množství kyseliny fosforečné a fosforečnanů přidávaných do potravin nebo skupin potravin [25].

Číslo E	Potravina nebo skupina potravin	NPM v mg.kg <sup>-1</sup>
<b>E 338</b> <b>Kyselina fosforečná</b>	Ochucené nealkoholické nápoje	700
<b>E 339</b> <b>Fosforečnany sodné</b>	UHT mléko	1 000
	Proslazené ovoce	800
	Zahuštěné mléko do 28 % sušiny	1 000
<b>E 340</b> <b>Fosforečnany draselné</b>	Pasterovaná, sterilovaná a UHT smetana	5 000
	Nápoje pro sportovce	500
	Nápoje na bázi kávy	2 000
<b>E 341</b> <b>Fosforečnany vápenaté</b>	Instantní čaje	2 000
	Masné výrobky	5 000
	Tavené sýry	20 000
	Sůl	10 000
<b>E 343</b> <b>Fosforečnany hořečnaté</b>	Zmrzliny	1 000
	Práškové směsi	7 000
	Těstoviny	2 000
	Výrobky z brambor	5 000
<b>E 450 Difosforečnany</b>	Polévky a vývary	3 000
	Surimi	1 000
	Obilné snídaně	5 000
<b>E 451 Trifosforečnany</b>	Pasty z ryb a korýšů	5 000
	Cukrovinky	5 000
	Zmrazení měkkýši a korýši	5 000
<b>E 452 Polyfosforečnany</b>	Moučkový cukr	10 000
	Tekuté vejce	10 000
	Emulgované tuky	2 000
	Aromata	40 000

Fosforečnany sodné se v potravinářství značí číselným kódem E 339. Představují ortofosforečnany nebo monofosforečnany (dihydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan disodný, fosforečnan trisodný). V potravinářském průmyslu se používají jako emulgátory, stabilizátory a tavicí soli. Při výrobě nealkoholických nápojů se využívají v podobě sypkých směsí a jejich hlavní funkcí je úprava kyselosti. Zabraňují nežádoucím reakcím kovů v potravinách. Používají se při výrobě tavených sýrů, masných výrobků a nápojů [27], [28].

Fosforečnany draselné (E 340) mají obdobnou funkci jako jejich sodné soli. Rovněž se uplatňují jako emulgační nebo stabilizační činidla, odstraňují nežádoucí účinky kovů, v sypkých směsích upravují kyselost. Při výrobě mastných výrobků váží vytékající šťávy. Jejich uplatnění nalezneme taktéž v lékařství, kde se využívají k úpravě pH moči [29], [30].

Fosforečnan hořečnatý, neboli E 343, se využívá jako látka upravující pH nebo jako stabilizátor. Vykazuje protispěkové vlastnosti. Do potravin se přidává jako zdroj hořčičku [31], [32].

Fosforečnan vápenatý (E 341), lze užít jako stabilizátor, protispěkovou a kypřící látku. Tuto sůl nalezneme v pekařských a cereálních výrobcích, v kořenících směsích, v želé a sýrech. Při výrobě sterilované zeleniny působí jako rosolotvorná látka a má tedy zpevňující účinky. Odstraňuje nežádoucí účinky kovů a zlepšuje kvalitu těsta [33].

Fosforečnany amonné (E 342) jsou látky vyráběné z amoniaku a kyseliny fosforečné. Vykazují zlepšující účinky na kvalitu mouky, používají se jako regulátory kyselosti. V EU nejsou jako potravinová aditiva povoleny [34].

## **1.6 Vliv fosforečnanů užívaných v potravinářství na lidský organizmus**

Doporučené denní dávky fosforu jsou 300-500 mg pro děti do 1 roku, 800 mg pro děti do 10 let a 1200 mg pro dospělé. Těchto dávek je při běžném složení stravy bez problémů dosaženo. Tělo dospělého člověka obsahuje asi 400-800 g fosforu, přičemž 85 % z tohoto množství se nachází v kostech a zubech. Jak již bylo řečeno, fosfor jako esenciální prvek vystupuje v živé hmotě v řadě funkcí, jedná se zejména o funkce stavební, funkce v energickém metabolismu a dále funkce regulační, aktivační a katalytické [11, s. 467].

### 1.6.1 Resorpce fosforu

Fosfor je resorbován v tenkém střevě převážně ve formě  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Resorpce a využitelnost fosforu je silně závislá na obsahu vápníku v krvi. Je-li jeden z těchto prvků přítomen ve velkém nadbytku, zvýší se exkrece druhého. Stupeň resorpce fosforu ovlivňuje složení stravy, věk a zdravotní stav konzumenta. Novorozenci resorbují z mateřského mléka 85-90 % fosforu, z kravského mléka je stupeň resorpce nižší, asi 65-70 %. Nejlépe se resorbují soli a estery kyseliny trihydrogenfosforečné, případně soli kyseliny hydrogenfosforečné. Polyfosforečnany vykazují resorpci sníženou [11, s. 467-469], [35, s. 7].

### 1.6.2 Kyselina fytová

Fytová kyselina je esterem myoinositolu a kyseliny fosforečné. Vyskytuje se v řadě důležitých plodin, zejména v obilovinách, luštěninách a olejninách. Fytátový fosfor má sníženou biologickou využitelnost, neboť je schopen tvořit komplexy s různými kationty. Vazba iontu je ovlivněna jeho koncentrací, koncentrací kyseliny fytové, hodnotou pH a přítomností dalších iontů. Pevná vazba iontů kovů kyselinou fytovou snižuje jejich vstřebávání. Afinita kyseliny fytové vůči kationtům klesá v tomto pořadí:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ . Nedostatek zinku vede k retardaci růstu, nedostatek železa způsobuje anémii [11, s. 468-469].

V souvislosti s rostoucí oblibou cereálních přesnídávek, sójových bobů a oříšků, je nutno zdůraznit, že význam působení kyseliny fytové na minerální metabolismus člověka roste. Zdravotní komplikace mohou nastat např. u vegetariánů, zejména bylo-li maso nahrazeno sójovými produkty, které jsou na kyselinu fytovou bohaté. Z toho důvodu se vegetariánství nedoporučuje u těhotných a kojících žen a u dětí [11, s. 468-469].

Kyselina fytová plní i četné biologické funkce. Potlačuje tvorbu reaktivních radikálů, uplatňuje se jako antikarcinogen a rovněž má také schopnost snižovat krevní cholesterol. Kyselina fytová je schopna vázat také kationty těžkých kovů [11, s. 468-469], [36].

### 1.6.3 Nedostatek a přebytek fosforu

Deficit fosforu je extrémně vzácný, jelikož fosfor je z potravy poměrně snadno dostupný. Nedostatek fosforu se obvykle projevuje zvracením, nevolností a průjmem. Zvláštní situaci



představuje hypofosforémie u dlouhodobě těžce podvyživených jedinců. Jestliže dojde k intenzivní výživové obnově nemocného a je významně zvýšen přívod energetických zdrojů, zejména cukrů a bílkovin, spotřeba fosforu se v organismu výrazně zvýší a nedostatek fosforu se projeví vznikem akutních příznaků. To má za následek poruchy, které jsou soustředěny do následujících příznaků: dechové poruchy, poruchy periferních nervů (mravenčení, přechodné obrny), poruchy funkce centrálního nervového systému (změny chování, deprese, agresivita a občas dezorientace a zmatenost) [37], [38].

Nadměrný přívod fosforu se neprojevuje zvláště akutními příznaky. Zvýšený přísun fosforu se projevuje většinou u žen, které odmítají mléčné produkty a mléko. Tyto ženy mají chronicky zvýšené hladiny parathormonu, dochází k zmenšování kostní hmoty, vzniká zvýšené riziko zlomenin, zejména v případě, kdy strava obsahuje relativně malý obsah vápníku a nadměrné množství fosforu [37], [38].

## 2 VLIV FOSFOREČNANOVÝCH SOLÍ NA MIKROBIÁLNÍ POPULACI

### 2.1 Antimikrobní účinky fosforečnanů

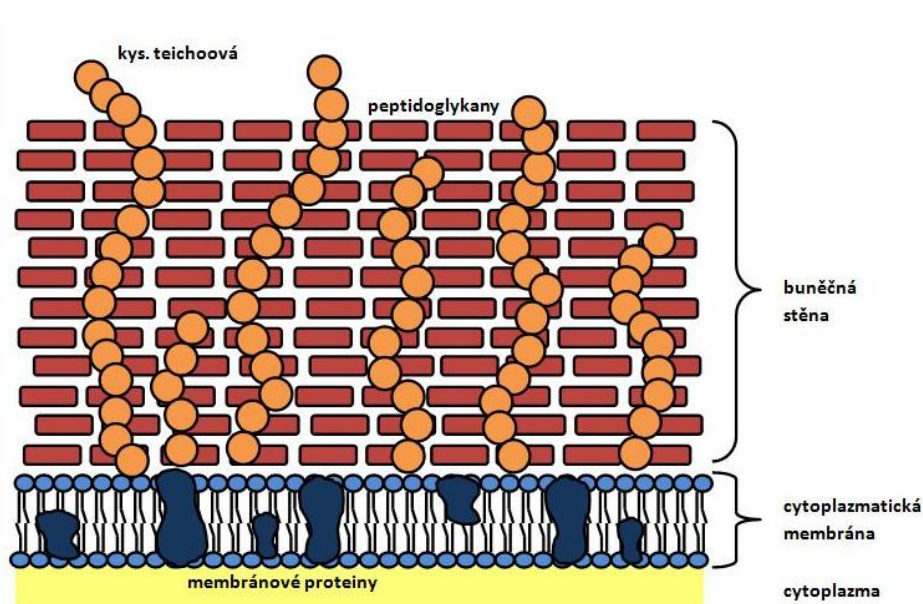
Antimikrobní účinek fosforečnanů je chápán jako jejich vedlejší efekt aplikace v potravinách. Inhibiční účinky fosforečnanových solí jsou popisovány především u grampozitivních bakterií, některých mikromycet a kvasinek. U grampozitivních bakterií je inhibiční efekt závislý na kondenzačním stupni (délce řetězce) fosforečnanů. Fosforečnanové soli s dlouhými řetězci vykazují lepší inhibiční efekt než fosforečnanové soli s krátkými řetězci. Tato vlastnost souvisí s odlišnou strukturou buněčné stěny a schopnosti polyfosforečnanů vychytávat dvojmocné kationty ( $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ ), které jsou esenciální pro udržení integrity buněčné stěny grampozitivních bakterií tím, že vytvářejí příčné vazby mezi molekulami teikoových kyselin buněčné stěny, přičemž dochází ke ztrátě osmoregulace a porušení semipermeability cytoplazmatické membrány. V důsledku tohoto procesu dochází k potlačení metabolických funkcí vyplývajících z úniku substrátu. Fosforečnany mohou rovněž zamezit klíčení spor a tvorbě septa při dělení buněk (např. u *Bacillus cereus*). Antimikrobní účinek je do značné míry ovlivněn hodnotou pH daného média. Vyvolaná změna pH, která je indukována přidávkem fosforečnanu, může ovlivnit sekvestrační schopnosti [39, s. 9], [40], [41].

Se zvyšující se hodnotou pH roste i tvorba komplexů fosforečnanů s dvojmocnými ionty. Fosforečnany, které vykazovaly v živném médiu alkalickou reakci, mají zvýšenou inhibiční kapacitu. Oproti tomu nízké hodnoty pH způsobují protonizaci vazebných míst, v důsledku čehož dochází k pozitivnímu sekvestračnímu účinku. Naproti tomu inhibiční účinek fosforečnanů může být potlačen působením zvýšené teploty, která vyvolává jejich hydrolyzu. Některé bakterie jsou rovněž vybaveny enzymy, které jsou schopny fosforečnany hydrolyzovat. Tepelně neupravené potraviny disponují aktivní fosfatázou schopnou štěpit fosforečnanové soli na nižší podjednotky a zbavovat je tak inhibičních účinků. Záhřevem dochází k jejich inaktivaci, proto je pro maximalizaci inhibičních účinků fosforečnanů doporučováno, aby ihned po jejich podání do potravin byl proveden tepelný záhřev [39, s. 9].

## 2.2 Působení fosforečnanů na strukturu buňky

Základem buněčné stěny grampozitivních i gramnegativních bakterií je peptidoglykan (murein), ten se skládá ze dvou typů monomerných aminosacharidových jednotek, tj. NAM (kyseliny N-acetylmuramové) a NAG (N-acetylglukózáminu). Lineární polysacharidová vlákna jsou spojena  $\beta$ -(1,4)-glykosidickou vazbou a navzájem zesíťována krátkými peptidy. Grampozitivní bakterie disponují silnější vrstvou peptidoglykanu, který je navíc prostoupen teikoovými kyselinami. Gramnegativní bakterie pak, na rozdíl od grampozitivních, obsahují vnější membránu (fosfolipidovou dvojvrstvu). Do této membrány jsou začleněny lipopolysacharidy a lipooligosacharidy, které plní úlohu endotoxinu [42], [43].

Fosforečnany pravděpodobně působí v místě řetězců teikoových kyselin. Molekula teikoové kyseliny je bohatá na fosforečnanové skupiny a tvoří hustou síť negativních nábojů na povrchu buněčné stěny grampozitivních bakterií. V důsledku pozitivních elektrostatických interakcí je teikoová kyselina schopna navazovat jedno- i dvoumocné kationty kovů. Navázáním vápenatých či hořečnatých iontů dochází bezprostředně k zastavení tvorby membránových struktur a potenciálnímu porušení integrity buňky (viz. kapitola 2.1) [44], [45].



Obr. 2. Struktura buněčné stěny grampozitivních bakterií [46]

## 2.3 Vybrané skupiny technologicky významných mikroorganismů

V následující kapitole budou blíže charakterizovány vybrané technologicky významné mikroorganismy. Níže uvedený oddíl je zaměřen na bakterie, které byly využity při práci na praktické části mé diplomové práce.

### 2.3.1 Rod *Clostridium*

Rod *Clostridium* je velmi rozsáhlý a z potravinářského hlediska velmi důležitý. Klostridia zahrnují grampozitivní, sporující bakterie rostoucí za anaerobních podmínek. Díky tvorbě enzymů (peroxidáza, kataláza apod.), které neutralizují kyslíkové a peroxidové radikály, jsou některé druhy schopny tolerovat malá množství kyslíku (*C. perfringens*, *C. histolyticum*, *C. tertium* apod.). Vegetativní formy těchto bakterií mají tvar tyčinek a většinou jsou díky peritrichálně uloženým bičíkům pohyblivé. Charakteristickou vlastností je tvorba oválných či kulatých endospor, které dlouhodobě přežívají v zemědělsky obdělávané půdě. Spory jsou vysoce rezistentní vůči nepříznivým podmínkám zevního prostředí, ale i různým druhům dezinfekčních látek. Jejich umístění ve sporangiu je pro různé druhy typické. Některé druhy rodu *Clostridium* produkují velmi účinné toxiny (*C. botulinum*, *C. tetani*, *C. perfringens*), schopny vyvolat onemocnění člověka i zvířat. Nejčastěji se jedná o neurotoxikózy, sepse a nekrotizující infekce měkkých tkání [47, s. 145-146], [48, s. 271].

Některá klostridia se využívají v průmyslu jako producenti průmyslově důležitých substancí (organické kyseliny, enzymy apod.). V sýrařském průmyslu se za nežádoucí projev považuje sacharolytická činnost některých druhů klostridií, v důsledku které dochází k duření sýrů, případně tvorbě nepříjemně páchnoucích sloučenin (především mastných kyselin) [49, s. 112], [50, s. 50-54].

Bakterie *Clostridium perfringens* byla objevena roku 1891. Vyskytuje se jako součást normální střevní mikroflóry u zvířat (hovězí dobytek) i lidí. Nepřímou i přímou kontaminací půdy fekáliemi hospodářských zvířat se může tento mikroorganismus dostat do potravin a u konzumentů vyvolat alimentární intoxikace. Vegetativní buňky se spolu s potravinou dostávají do zažívacího traktu, kde dochází k jejich pomnožení, sporulaci a tvorbě enterotoxinu [51, s. 510].

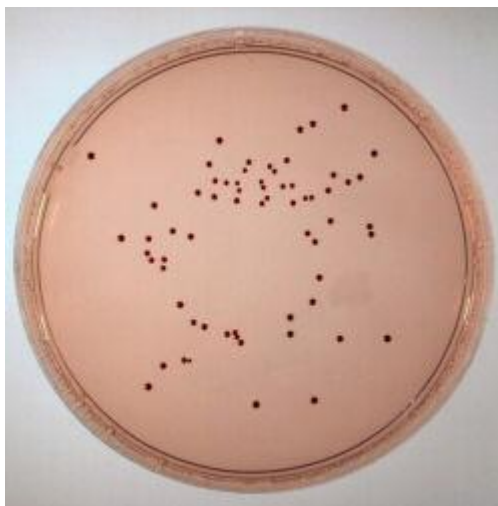


Obr. 3. *Clostridium botulinum* pod elektronovým mikroskopem – zvětšení x8000 [52]

### 2.3.2 Rod *Enterococcus*

Rod *Enterococcus* náleží do čeledi *Enterococcaceae*. Mikroskopicky se jedná o grampozitivní, oválné koky uspořádané ve shlucích nebo krátkých řetězcích. Enterokoky jsou fakultativně anaerobní, kataláza negativní, ale mohou vykazovat pseudokatalázovou aktivitu a dávat tak pozitivní výsledky. Kultivačně jsou enterokoky nenáročné, na krevním agaru rostou v drobných šedobílých koloniích s celistvým okrajem o velikosti asi 1 mm. Některé druhy enterokoků produkují žlutý pigment (*E. mundtii*, *E. flavescens*). Rostou v přítomnosti 6,5 % NaCl, při pH 6,9 a v teplotním rozmezí 10 °C – 45 °C. Enterokoky jsou přirozenou složkou střevní mikroflóry, využívají se jako startérové kultury fermentovaných mastných výrobků, jsou rovněž běžnou součástí rostlinných potravin. Jejich zvýšený výskyt v potravinách může poukazovat na nedostatečnou sanitaci výrobního zařízení [51, s. 140-143].

*Enterococcus faecalis* byl izolován z feces člověka a teplokrevných živočichů. *E. faecalis* tvoří oválné buňky uspořádané v párech a v krátkých řetězcích. Na polotuhých půdách tvoří hladké smetanové kolonie. Nepohyblivé koky *E. faecalis* disponují fermentativním metabolismem. Glukózu rozkládají na L(+) izomer kyseliny mléčné. Optimální růstová teplota pro kultivaci je 37 °C. *E. faecalis* je častým původcem infekcí močových cest, ale také gynekologických zánětů [51, s. 141, 38].



Obr. 4. *Enterococcus faecalis* na médiu Slanetz-Bartley [53]

### 2.3.3 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je nejrozsáhlejší ze skupiny bakterií mléčného kvašení zahrnující okolo 214 druhů a poddruhů. Fylogeneticky patří rod *Lactobacillus* do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Lactobacillaceae*. Mezi probiotické bakterie rodu *Lactobacillus* řadíme zejména tyto druhy: *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. lactis*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. sakei*, *Lb. salivarius* [54].

Bakterie rodu *Lactobacillus* náleží mezi grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující mikroaerofilní, případně fakultativně anaerobní, tyčinky disponující anaerobním metabolismem. Laktobacily mají poměrně vysoké nutriční požadavky na růst a rozmnožování. Upřednostňují mezofilní až mírně termofilní teploty s horní růstovou hranicí 40 °C. Některé kmeny (*Lb. plantarum*, *Lb. sakei* atd.) jsou schopny růstu i při nízkých teplotách blízkých k bodu mrazu. Obecně jsou laktobacily acidotolerantní až acidofilní. Při fermentaci sacharidů tvorbou kyseliny mléčné snižují kyselost prostředí až pod hranici pH 4,0. Kyseliny mléčná a octová jsou v kyselém prostředí téměř nedisociovatelné a spolu s nízkou hodnotou pH potlačují růst nežádoucích mikroorganismů v prostředí [47, s. 136-137,1], [51, s. 150-153].

Na taxonomii rodu *Lactobacillus* lze pohlížet z různých hledisek. Podle konečného produktu fermentace sacharidů je rod *Lactobacillus* rozdělen do tří skupin [55]:

- Obligátně heterofermentativní
- Obligátně homofermentativní

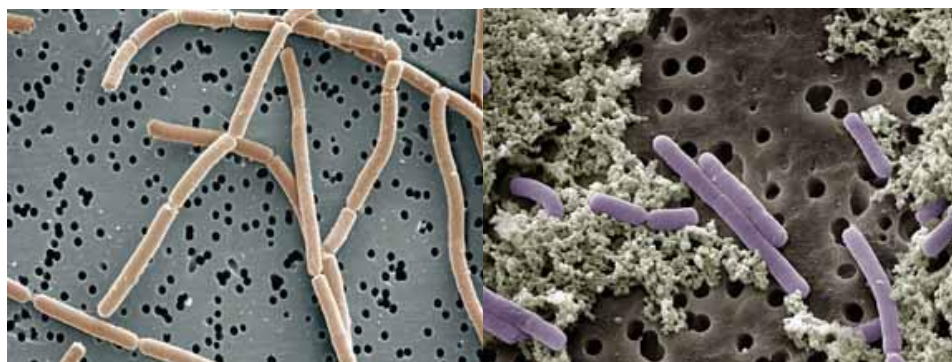
- Fakultativně heterofermentativní

Obligátně heterofermentativní laktobacily fermentují hexózy na kyselinu mléčnou, octovou a CO<sub>2</sub>. Pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou. Zástupci jsou například *Lb. brevis*, *Lb. fermentum* [55].

U obligátně homofermentativních laktobacilů dochází k fermentaci hexóz výhradně na kyselinu mléčnou (>90%) podle Embden-Meyerhof-Parnasovy metabolické dráhy. Mezi zástupce této skupiny patří druhy *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* [55].

Fakultativně heterofermentativní laktobacily fermentují glukózu a ostatní hexózy na kyselinu mléčnou nebo směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a etanolu podle Embden-Meyerhof-Parnasovy metabolické dráhy. Pentózy fermentují pomocí indukovatelné fosfoketolázy. Tato skupina zahrnuje např. druhy *Lb. casei*, *Lb. plantarum* nebo *Lb. rhamnosus* [55].

V přírodě se laktobacily nacházejí na povrchu neporušených rostlin a spolu s ostatními bakteriemi mléčného kvašení mají velký význam při výrobě rostlinných fermentovaných produktů. V této souvislosti byly nejčastěji izolované a identifikované kmeny *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*. Laktobacily jsou rovněž přítomny v mléce, kde vyvolávají přirozené kysání, dále pak v masných a mléčných produktech. Laktobacily jsou součástí normální ústní flóry, gastrointestinálního traktu a vaginy. Mohou být spojovány jako původci novorozeneckých meningitid, abscesů případně endometritid (*Lb. acidophilus*) [47, s. 150-153], [51, s. 136-137].



Obr. 5. *Lb. delbrueckii* a *Lb. casei* - morfologie buněk [56]

### 2.3.4 Rod *Lactococcus*

Rod *Lactococcus*, jinak také mléčná skupina rodu *Streptococcus*, zahrnuje druhy a poddruhy *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae*, *Lactococcus lactis* ssp. *tractae*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus plantarum*, *L. piscium*, *L. chuangangensis*, *L. formosensis*, *L. fujiensis* [57].

Laktokoky patří mezi technologicky nejvýznamnější mikroorganismy, které se v celosvětovém měřítku podílejí na obrovském množství fermentačních procesů a po staletí jsou tyto bakterie využívány k výrobě potravin a krmiv, nově i potravinových doplňků a léčiv (v případě probiotických kmenů). V současné době má využití startérových kultur význam při výrobě sýrů, jako sýrařské a smetanové kultury. Z potravinářského hlediska je důležitým faktorem jejich autolytická činnost. V průběhu zrání sýrů dochází k produkci exopolysacharidů a diacetylu, což má v konečném důsledku vliv na chuť, vůni a jejich texturu. Průmyslově využívané kmeny musí být schopné odolávat extrémním podmínkám jako vysoká teplota, pH, osmotický tlak apod. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* je obecně více odolný vůči vnějším podmínkám než poddruh *cremoris*, a to s ohledem na zvýšenou teplotu a koncentraci NaCl [51, s. 136-140], [58].

Rod *Lactococcus* zahrnuje grampozitivní, nesporulující bakterie s optimální růstovou teplotou kolem 30-38 °C. Laktokoky disponují striktně fermentativním metabolismem, kde hlavním produktem fermentace sacharidů je L(+) kyselina mléčná. Optimální pH pro růst a produkci laktátu je v blízkosti pH 6. Zástupci rodu *Lactococcus* jsou fakultativně anaerobní s diagnosticky negativní katalázou [51, s. 136-140], [55].

Zdrojem mikrobů jsou mléčné výrobky, rostliny a sušené potraviny rostlinného původu. Nepovažují se za patogeny zvířat ani člověka [58].

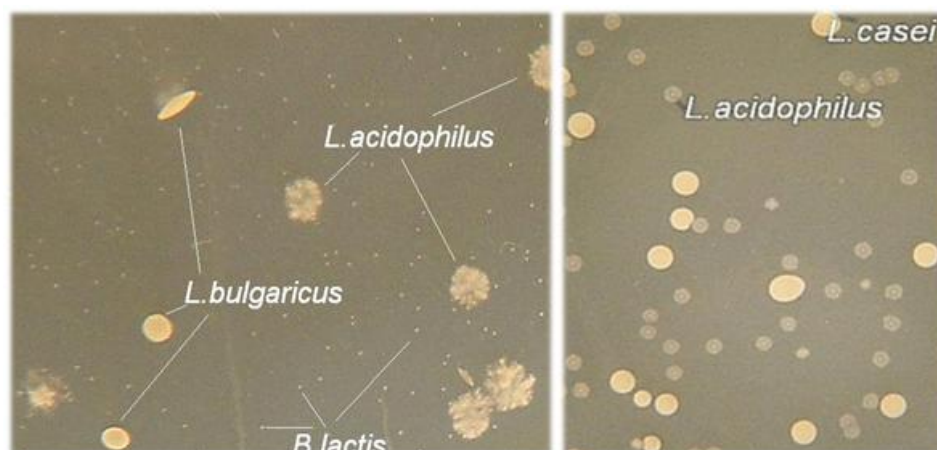
*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* je v mlékárenském průmyslu nejrozšířenějším mikroorganizmem. Jako součást „čistých mlékařských kultur“ se využívá k výrobě některých kyselých mlék, zakysaných smetan a na výrobu všech druhů sýrů [51, s. 136-140].

Tyto bakterie tvoří kokovité nebo oválné buňky a vyskytují se v párech nebo dlouhých řetězcích. Na polotuhých půdách tvoří drobné mléčné kolonie. Pro svůj růst v syntetickém médiu vyžaduje přítomnost vitaminů skupiny B, aminokyselin, octanu, oleátu nebo lipoátu.



Optimální teplota pro kultivaci *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* je 30 °C, při teplotě 45 °C je jejich růst zastaven. Homofermentativním metabolismem štěpí sacharidy (laktózu, glukózu, maltózu) na L(+) kyselinu mléčnou. Sacharózu nefermentují nebo jenom v nepatrné míře. Neštěpí kyselinu citronovou, netvoří diacetyl, acetoin ani CO<sub>2</sub>. Některé kmeny poddruhu *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* produkují bakteriocin nisin, který inhibuje rozvoj řady grampozitivních bakterií, zvláště anaerobních sporotvorných, jako jsou klostridia v tavených sýrech [51, s. 136-140], [55].

Kmeny poddruhu *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* bývají většinou izolovány současně s poddruhem *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Jejich charakteristickým rozpoznávacím znakem je odlišný tvar buňky (často jsou větší jak *Lactococcus lactis* a zůstávají u sebe ve směru jejich dělení, proto vznikají dlouhé řetízky složené z 20 i více buněk) [51, s. 136-140].



Obr. 6. *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. acidophilus* a *L. lactis* – morfologie buněk [59]

### 2.3.5 Rod *Micrococcus*

Rod *Micrococcus* se řadí do skupiny grampozitivních koků a zahrnuje striktně aerobní druhy uspořádané často v tetrádách nebo paketech. Mikrokoky rostou v přítomnosti 5 % NaCl, čehož se využívá také při jejich stanovení. Vyskytuje se hlavně v solených potravinách, na kůži, ve vodě, v prachu, obvykle jsou nepatogenní. Příslušníci rodu *Micrococcus* produkují pigment a na běžných půdách mohou tvořit žluté, oranžové až intenzivně růžové kolonie. Toto zbarvení je způsobeno nerozpustnými karotenoidními barvivy, přítomnými v jejich buňkách. Tato barviva chrání buňku před letálními účinky

ultrafialového záření, a proto se mohou uvedené bakterie často uplatňovat jako zdroj vzdušné kontaminace. Dnes je uznáno devět druhů tohoto rodu, přičemž některé z nich karotenoidní barviva netvoří. Z diagnostického hlediska se rod *Micrococcus* řadí mezi kataláza pozitivní a koaguláza negativní bakterie [47, s. 109], [48, s. 265-266].

*Micrococcus luteus* byl izolován z lidské kůže, masných a fermentovaných produktů. *M. luteus* vykazuje zvýšenou rezistenci vůči snížené vodní aktivitě a je schopen tolerovat zvýšené koncentrace solí. U vnímavých jedinců může být spojován s bakteriemi či abscesy. Růstové optimum je 37 °C [60].

### 2.3.6 Rod *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* je typovým rodem čeledi *Pseudomonadaceae*, jež náleží do kmene *Proteobacteria*, domény *Bacteria*. Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou gramnegativní rovné tyčinky o velikosti 1,5-5,0 μm. Vyskytují se samostatně nebo ve svazcích. Pohyb pseudomonád je uskutečňován bičíky. Umístění bičíků je výhradně terminální a jejich množství a rozmístění se považuje za důležitý taxonomický znak. Pro *Pseudomonas aeruginosa* je charakteristická přítomnost jednoho bičíku, zatímco *P. fluorescens* nebo *P. putida* mají bičíků více. Nutričně se jedná o nenáročný rod. S výjimkou některých druhů rostou za aerobních podmínek na kultivačních půdách jako je krevní agar, Endův agar, MacConkey agar, kde tvoří kovově lesklé kolonie. Mladé kolonie mají charakteristickou ovocnou vůni po jasmínu či lipovém květu. Většina příslušníků tohoto rodu roste v teplotním rozmezí 4-42 °C, optimální teplota je 35 °C. Pseudomonády se vyskytují ve vodě i půdě, na povrchu rostlinných materiálů, kůži člověka a živočichů. Kolonizují dokonce zředěné dezinfekční roztoky a jsou tolerantní k vyšším koncentracím solí. Často bývají označovány za původce kažení ryb, masa nebo vajec. K růstu nevyžadují růstové faktory a jsou schopny snášet hodnoty pH nižších jak 4,5. Pseudomonády netvoří spory ani pouzdra. Mnoho druhů produkuje solubilní pigmenty např. žluté, zelené, modré, fluoreskující, které uvolňují do vnějšího prostředí. Zpravidla se jedná o látky fenazinového původu. Buňky produkují katalázu, produkce oxidáz může být negativní i pozitivní, netvoří acetoin [61], [62].

*P. aeruginosa* představuje jednoznačně nejčastěji izolovaný a klinicky nejvýznamnější druh celého rodu. *P. aeruginosa* tvoří celou řadu pigmentů, z nich nejčastěji žlutozelený fluorescein a modrozelený pyocyanin. Vyskytuje se hojně v různých vodách, na rostlinách

a v půdě. Ve velkém množství může osídlovat nemocniční prostředí, kde kontaminuje katétrů, infuzní roztoky, dýchací přístroje apod. Tato fluorescenční pseudomonáda náleží k obávaným původcům nozokominálních nákaz. *P. aeruginosa* vykazuje rezistenci k různým druhům běžně užívaných antibiotik. Kolonie většiny kmenů mají typicky perleťový až kovový lesk. Na krevním agaru vyvolává výraznou zónu úplné hemolýzy. Je schopna vyvolat zánětlivé infekce popálenin, sepse novorozenců a devastující infekce oka. Kultivační teplota dosahuje optimální rozmezí 30-37 °C, zatímco nepatogenní druhy z fluorescenční skupiny dokáží růst i při teplotách nižších [47, s. 34], [63, s. 104], [64].

### 2.3.7 Rod *Salmonella*

Bakterie rodu *Salmonella* jsou gramnegativní tyčinky čeledi *Enterobacteriaceae*, řádu *Enterobacteriales* s charakteristickými vlastnostmi pro tuto čeleď - přítomnost peritrichálních bičků, kultivace při 37 °C, kataláza pozitivní a oxidáza negativní, metabolismus je fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní. Biochemicky nejvýznamnější vlastností je schopnost salmonel štěpit mannitol, využívání citrátu a produkce sirovodíku – ta se projeví i na selektivně diagnostických půdách XLD (agar s xylózou, lyzinem a deoxycholátem) a MAL (manitol-arabinóza-laktózový agar), kde salmonely rostou v bezbarvých koloniích s černým středem. Na polotuhých médiích vytváří pravidelné kolonie o velikosti 2 až 3 mm. Zvláštností rodu *Salmonella* je především bohaté zastoupení sérotypů. Ty jsou určovány na základě kombinace bičkových, somatických a kapsulárních antigenů [47, s. 60-61], [51, s. 489-495], [65, s. 72], [66, s. 110].

Bakterie rodu *Salmonella* jsou spjaty se širokým spektrem prostředí a hostitelů. Salmonely se vyskytují prakticky u všech druhů hospodářských zvířat, v rostlinných produktech, v ojedinělých případech jsou izolovány z nejrůznějších typů potravin od živočišných produktů přes ovoce a zeleninu. Průnikem bakterií do zažívacího traktu člověka se mohou objevit průjmová onemocnění, zřídka hnisavé infekce vnitřních orgánů. Infekce se projeví obvykle v rozmezí 12–36 hodin po požití kontaminované potravy [67, s. 127-128], [68].

### 2.3.8 Rod *Staphylococcus*

Rod *Staphylococcus* patří do skupiny grampozitivních koků, která se skládá z více jak 30 fakultativně anaerobních nebo anaerobních rodů, z nichž většina patří k normální

mikroflóře kůže a sliznic člověka. Vegetativní buňky stafylokoka jsou uspořádány jednotlivě, v krátkých řetězích nebo shlucích tvaru hroznu. Kolonie mohou být různé velikosti, matné, okraje hladké nebo vroubkované. Barva kolonií je nejčastěji žlutá až oranžová, některé kmeny však tvoří i kolonie bílé. Koky jsou nepohyblivé, nesporující. Stafylokoky jsou vysoce odolné vůči podmínkám zevního prostředí, rostou v širokém rozmezí teplot a v přítomnosti 10 % NaCl. Stafylokoky jsou rezistentní k bacitracinu a lysozymu. Na základě produkce enzymu plazmakoagulázy jsou stafylokoky děleny do dvou hlavních skupin: koaguláza pozitivní (*S. aureus*, *S. lugdunensis*) a koaguláza negativní (*S. epidermidis*, *S. warneri* apod.). U některých zástupců rodu *Staphylococcus* se setkáváme s tvorbou slizu, tyto kmeny potom přisedají k povrchu a jsou schopny tvorby biofilmu. Schopnost adheze a růstu ve formě biofilmu napomáhá stafylokokům kolonizovat povrchy různých materiálů a výrobních zařízení. Stafylokoky jsou velmi rozšířeny v přírodě, nejčastěji kolonizují kožní pokrýv a sliznice zvířat a člověka. Odtud se mohou šířit do dutiny ústní, dýchacích cest, krevního oběhu a působit jako infekční agens [47, s. 98-99], [68, s. 66], [69].

*Staphylococcus aureus* patří mezi „nejúspěšnější“ lidské patogeny, přibližně u třetiny lidí přirozeně osidluje kůži a oblast nosohltanu a žije ve vztahu blízkém komenzalizmu. Vlivem oslabení imunitního systému hostitele proniká do tkání a přispívá ke vzniku různých onemocnění – abscesů, hnisání ran, sepsí apod. Z potravinářského hlediska jsou nejvýznamnější hnisavé infekce na ruce. V důsledku manipulace infikované osoby s potravinami může docházet k následné sekundární kontaminaci zpracovávané potraviny a produkci enterotoxinu. Mezi rizikové skupiny potravin řadíme především majonézy, zmrzliny, saláty apod. [48, s. 267], [51, s. 502].

### 3 METODY STANOVENÍ POČTU MIKROORGANISMŮ

#### 3.1 Stanovení celkového počtu mikroorganismů

V mikrobiologii je nedílnou součástí stanovení počtu mikrobiálních buněk v určitém prostředí (např. při kontrole biotechnologických procesů, při hledání optimálních růstových podmínek pro určitý kmen mikroorganismů, při analytickém stanovení vitaminů, při sledování účinku dezinfekčních prostředků nebo při zjišťování mikroorganismů v potravinářských surovinách a hotových výrobcích, ve vodě a vzduchu) určení celkového počtu mikroorganismů. V potravinářském průmyslu je stanovení počtu mikroorganismů velmi důležité, neboť informuje o kvalitě surovin i hotových výrobků a o jejich údržnosti. Sledováním počtu mikrobů, případně i jejich druhů, se můžeme také přesvědčit o vhodnosti technologických postupů, o bezpečnosti sterilačních zákroků a také o sanitačních a hygienických podmínkách na daném úseku výroby nebo distribuce [70].

Zjišťováním počtu mikroorganismů je rovněž nutné při některých biochemických a genetických experimentech. Pro stanovení počtu buněk mikroorganismů v různých prostředích byla vypracována řada metod, takže pro daný účel je možno zvolit metodu nejlépe vyhovující. Stanovení počtu mikroorganismů se provádí v daném objemu a přepočítává obvykle na 1 ml nebo 1 g původního vzorku. Pro zjišťování počtu mikrobiálních buněk v určitém prostředí se používá jednak přímé nebo nepřímé počítání buněk, jednak stanovení buněčné hmoty přítomných mikroorganismů nebo metody sledující intenzitu biochemické činnosti přítomných mikrobů. Nejpřesnější a nejcitlivější jsou metody zjišťující počet buněk. Používají se především při rozboru potravin, při kontrole kvasných technologických procesů a při kontrole hygienických a sanitačních podmínek potravinářských provozů. Metody stanovující hmotu biomasy se používají v kulturách mikroorganismů, zejména při bilancování kvasných procesů. Sledování činnosti přítomných mikroorganismů se používá pro rychlé posouzení mikrobiologické čistoty potravin [70].

##### 3.1.1 Přímé stanovení počtu buněk mikroorganismů mikroskopickým počítáním

„Celkový počet mikroorganismů” stanovený mikroskopickou metodou informuje o počtu a morfologických vlastnostech zbarvených mikrobiálních buněk a jejich shluků. Za

jednotku se počítají izolované buňky a jejich náhodné morfologicky podmíněné shluky (koky, paličky, streptokoky, sarciny apod.), ze kterých by při stanovení kultivační metodou mohla vyrůst kolonie. Touto metodou se obvykle stanoví větší počet jednotek, jelikož schopnost obarvení buňky určitým barvivem (nejčastěji methylenová modř) je považováno za její obecnou vlastnost, než její růst v příslušném médiu. Velmi často se započítává určité množství mrtvých buněk, které ještě nepodlehly lýze [51, s. 114].

K počítání pod mikroskopem se používají suspenze o vhodné hustotě, preparáty bez úpravy nebo upravené fixací či barvením. K pozorování nezbarvených buněk se používají upravené mikroskopické techniky, např. fázový kontrast [70].

Pro počítání buněk se používají různé typy počítacích komůrek (Thomova, Vošáhlíková atd.). Komůrky se skládají ze silného podložního skla s vyrytou sítí čtverců a krycího skla, které se pokládá na boční lišty, čímž vzniká mezi sklíčky prostor o přesně definované hloubce. Jinou možností je počítání mikroorganismů v zorném poli a následným přepočítáním na plochu krycího skla. V tomto případě pracujeme se známým objemem bakteriální suspenze [69].

### 3.1.2 Nepřímé stanovení počtu buněk

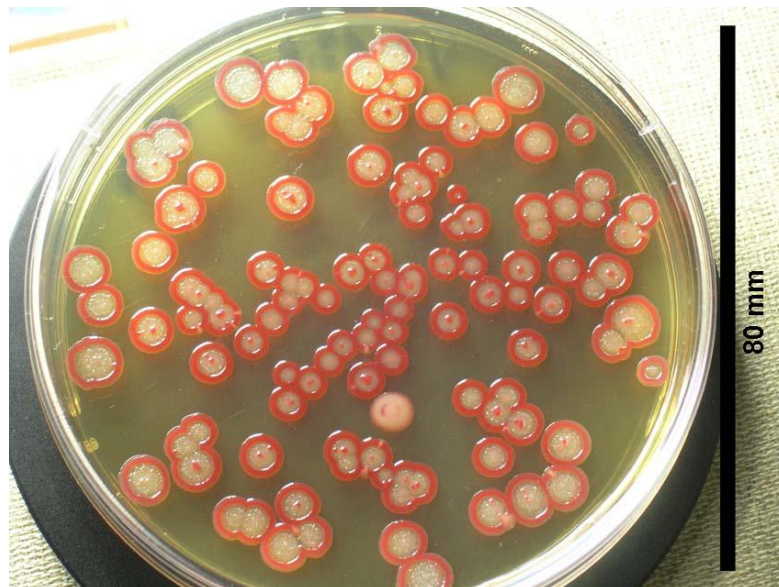
Nejčastějším způsobem stanovení počtu živých buněk pomocí kultivace je počítání kolonií vyrostlých na agarových plotnách. Tato metoda je nejrozšířenější, neboť umožňuje zjištění počtu mikroorganismů jak v kapalných nebo tuhých látkách, tak i na povrchu předmětů, ve vzduchu apod. Používáme ji při zjištění přežívajících buněk při dezinfekčních nebo sterilizačních zákrocích, v genetických studiích při sledování letálních účinků použitých mutagenů, apod., ale především při mikrobiologických rozborech potravin a potravinářských surovin včetně vody. Při těchto potravinářských rozborech můžeme pomocí plotnových metod zjistit celkový počet přítomných mikroorganismů nebo počet buněk určité skupiny mikroorganismů, což je umožněno použitím selektivních a selektivně diagnostických půd [69].

Metoda vychází ze základního empirického ověřeného předpokladu, že z jedné životaschopné buňky vyrůstá jedna kolonie. Pojem „životaschopnost“ se v tomto případě rozumí schopnost buňky vytvářet na agarovém živném médiu viditelné makroskopické kolonie. Zaočkování bakteriální suspenze do agarového média je možno provádět dvěma

způsoby: 1. očkovaním inokula na předsušené agarové plotny a jeho rozetřením sterilní hokejkou nebo 2. zalitím daného objemu inokula vytemperovaným agarem a důkladným rozmícháním. Výsledek se udává jako počet kolonie tvořících jednotek (KTJ, anglická zkratka CFU – colony forming unit, německy – Kolonien bildende Einheiten) [70].

Suspenzi je nutné před očkovaním vhodně naředit, aby na tuhém médiu vyrostly jednotlivé izolované kolonie, které se nepřekrývají svými okraji. Obvykle se používá při ředění koeficient 10, buňky se vyřeďují postupně, aby se zabránilo rozbití buněk osmotickým šokem. Pro určení optimálního ředění je nutno odhadnout hustotu připravené bakteriální suspenze ( $0-10^3$  buněk/ml bez opalescence,  $10^5$ /ml lehce opaleskuje,  $10^7-10^9$ /ml tvoří mléčný zákal, závisí na tvaru a velikosti buněk) [70].

Takto stanovený počet je obvykle jen určité procento ze skutečného počtu bakterií. Je to následek skutečnosti, že dané kultivační parametry nevyhovují fyziologickým požadavkům všech rodům a druhům bakterií [51, s. 114].



*Obr. 7. Odečet bakteriálních kolonií (KTJ) [71]*

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## 4 CÍLE PRÁCE

Cíle diplomové práce byly určeny následovně:

- v teoretické části zpracovat literární rešerši týkající se charakteristiky fosforečnanových solí. Popsat antimikrobní účinnost fosforečnanů a stručně definovat testované kmeny bakterií,
- stanovit inhibiční účinky fosforečnanů v různém kondenzačním stupni na růst vybraných kmenů gramozitivních a gramnegativních bakterií za pomoci indexu růstu (IR),
- na základě zpracovaných výsledků formulovat závěry a diskutovat teoretický předpokládaný inhibiční efekt.

## 5 MATERIÁL A METODY

### 5.1 Přístroje, zařízení a pomůcky

- Analytické váhy KERN 440-47 N
- Autokláv Varioklav H+P
- Automatické mikropipety Hirschmann
- Biohazard box EUROFLOW (Clean Air)
- Biologický termostat BT 120
- Chladnička Electrolux
- Laboratorní sklo
- Sterilní očkovací kličky
- Špičky pro automatické pipety
- Vortex Heidolph, Reax top

### 5.2 Použité mikroorganismy

Pro dosažení cílů této práce byly využity následující kmeny grampozitivních a gramnegativních bakterií. Kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM), ze Sbírek zoopatogenních mikroorganismů při Výzkumném ústavu veterinárního lékařství (CAPM), ze Sbírek mlékárenských mikroorganismů Laktoflora® (Cultures Collection of Dairy Microorganisms; CCDM) a ze sbírky Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí (DEPE). Kmeny byly uchovávány na plotnách masopeptonového agaru (MPA), klostridia na plotnách reinforced clostridial agaru (RCA) a mléčné bakterie na MRS a M17 agaru. Pro přípravu bakteriální suspenze a pro inokulaci k vlastnímu stanovení inhibičních účinků daných fosforečnanů bylo použito masopeptonového bujónu (MPB), reinforced clostridial broth (RCB) a média M17 obohaceného o laktózu. Kultivace probíhala při  $30 \pm 1$  °C po dobu 24 hodin, v případě klostridií za anaerobních podmínek. Všechny kultivační média byly získány z HiMedia (Bombai, Indie).

Účinek fosforečnanů byl v diplomové práci sledován u následujících kmenů bakterií:

- *Clostridium perfringens* CAPM 5744
- *Enterococcus faecalis* CCM 4224
- *Lactobacillus brevis* DEPE T89
- *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 141
- *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 946
- *Micrococcus luteus* CCM 732
- *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955
- *Salmonella enterica subsp. enterica* ser. Enteritidis CCM 4420
- *Staphylococcus aureus* DEPE K38
- *Staphylococcus epidermidis* DEPE K42

### 5.3 Kultivační půdy

#### Příprava médií

Po odvážení odpovídajícího množství daných složek byl obsah infuzní láhve protřepán a následně byly kultivační půdy sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Poté bylo sterilní živné médium rozlito do předem připravených sterilních Petriho misek. Půda byla skladována v chladničce.

#### *Masopeptonový agar (MPA)*

Pro uchování bakteriálních kultur byl použit masopeptonový agar (MPA) o následujícím složení:

Složka	množství g.l <sup>-1</sup>
Agar	15,0 g
Beef extrakt (HiMedia)	3,0 g
Chlorid sodný (Lach-Ner)	5,0 g
Pepton (HiMedia)	5,0 g

Destilovaná voda 1000 ml

Konečné pH (při 25 °C)  $6,8 \pm 0,2$

### ***Masopeptonový bujón (MPB)***

Pro stanovení inhibičních účinků fosforečnanových solí bylo připraveno bakteriální inokulum v masopeptonovém bujónu (MPB), jehož složení bylo následující:

<b>Složka</b>	<b>množství g.l<sup>-1</sup></b>
Beef extract (HiMedia)	3,0 g
Chlorid sodný (Lach-Ner)	5,0 g
Pepton (HiMedia)	5,0 g
Destilovaná voda	1000 ml
Konečné pH (při 25 °C) $7 \pm 0,2$	

### ***Plate Count Agar (PCA)***

Pro zjištění celkového počtu aerobních bakterií po inhibičním účinku fosfátových solí byl použit Plate Count Agar (PCA), jehož příprava byla následující:

<b>Složka</b>	<b>množství g.l<sup>-1</sup></b>
Hydrolyzát kaseinu	5,0 g
Kvasničný extrakt	2,5 g
Glukóza bezvodá	1,0 g
Agar	15 g
Voda	1000 ml
Konečné pH (při 25 °C) $7 \pm 0,2$	

**Agar M17**

Celkový počet buněk u testovaných kmenů rodu *Lactococcus* byl stanoven na agaru M17 o složení:

<b>Složka</b>	<b>množství g.l<sup>-1</sup></b>
Trypton	5,0 g
Sojový pepton	5,0 g
Masový pepton	5,0 g
Síran hořečnatý	0,25 g
Di-sodium-glycerofosfát	19 g
Laktóza	5,0 g
Agar	15,0 g

**Reinforced clostridial agar (RCA)**

Anaerobní sporulující bakterie rodu *Clostridium* byly kultivovány na půdě RCA (Reinforced clostridial agar) o složení:

<b>Složka</b>	<b>množství g.l<sup>-1</sup></b>
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	10 g
Hovězí extrakt	10 g
Kvasničný extrakt	3 g
Dextróza	5 g
Chlorid sodný	5 g
Octan sodný	3 g
Škrob	1 g
L – cystein hydrochlorid	0,5 g
Agar	15 g
Voda	1000 ml

## 5.4 Roztoky a ostatní chemikálie

### 5.4.1 Zásobní roztoky fosforečnanů

Za účelem zjištění inhibičních účinků pěti sodných solí polyfosforečnanů, které byly v různém kondenzačním stupni ( $n \approx 5, 9, 13, 20$  a  $28$ ; označeno jako HEXA 62, HEXA 65, HEXA 68, HEXA 70, HEXA PE), a hydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) byly připraveny jejich 10% roztoky rozpuštěním příslušné navážky v destilované vodě. Následně byly vysterilizovány filtrací (filtr o porozitě  $0,45 \mu\text{m}$ ) a uchovávány v uzavřených nádobách v chladničce při teplotě  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pro sledování senzitivity jednotlivých bakteriálních kmenů bylo využito pěti koncentrací každé soli ( $0,25 \%$ ;  $0,50 \%$ ;  $0,75 \%$ ;  $1,00 \%$  a  $2,00 \%$  w/v).

Všechny sodné soli fosforečnanů byly poskytnuty firmou Fosfa a.s., Břeclav-Pošterná.

### 5.4.2 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl použit za účelem naředění bakteriálních suspenzí.

#### Příprava

8,5 g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a následně byl fyziologický roztok sterilován v autoklávu při teplotě  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 20 minut.

## 5.5 Příprava suspenze bakterií

Bakteriální suspenze příslušných mikroorganismů byly připraveny zaočkováním 5 ml kultivačního média (MPB, RCA nebo M17) jednodenním inokulem o objemu  $25 \mu\text{l}$ . Kultury byly inkubovány v termostatu při teplotě při  $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 24 hodin (*Micrococcus luteus* po dobu 48 hodin).

## 5.6 Dekontaminace použitého materiálu

Veškerý použitý materiál (živné půdy, špičky, bakteriální suspenze aj.) byl dekontaminován v autoklávu při teplotě  $135 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 30 minut.

## 5.7 Sledování účinků fosforečnanových solí na vybrané kmeny mikroorganismů

Roztoky fosforečnanových solí byly v daném množství přímo dávkovány do zkumavek příslušného živného média o objemu 5 ml. Takto připravená kultivační média s různou koncentrací fosforečnanů byla zaočkována 20  $\mu$ l příslušné bakteriální suspenze (24hodinová kultura). Zkumavky byly přichystány tak, aby bylo možné zachovat objektivitu a reprodukovatelnost měření, tj. každá z testovaných bakterií byla paralelně očkovaná do 3 zkumavek (při dané koncentraci příslušné soli). Jako pozitivní kontrola bylo použito čisté kultivační médium, do kterého bylo pipetováno 1000 ml sterilní destilované vody bez příslušného fosforečnanu a 20  $\mu$ l suspenze bakterií. V důsledku absence fosforečnanů nebylo předpokládáno dosažení inhibičních účinků na růst testovaných bakterií. V případě negativní kontroly obsahovaly zkumavky bujón s fosforečnany v příslušné koncentraci bez buněčné suspenze (tzn. že nebyly mikroorganismy zaočkovány).

Buňky byly v bujónech s fosforečnany inkubovány při teplotě  $30 \pm 1$  °C po dobu 24 hodin (*Micrococcus luteus* po dobu 48 hodin). Poté bylo 100  $\mu$ l z každé zkumavky očkováno na Petriho misku s pevnou půdou (Plate count agar, Reinforced clostridial agar nebo agar M17) tak, aby bylo možné spočítat počet bakterií rezistentních k působení dané soli v příslušné koncentraci. Plotny byly kultivovány do následujícího dne při teplotě 30 °C, v případě klostridií za anaerobních podmínek po dobu 48 hodin. Následně byl na jednotlivých agarových plotnách odečten počet kolonií a přepočten jako CFU/ml.

Použijí-li se pro výpočet dvě (případně více) Petriho misky stejného ředění, výsledný počet mikroorganismů se vypočítá podle vztahu (1):

$$N = \frac{\sum c/n}{d} \cdot V \quad [CFU / ml] \quad (1)$$

kde: N je počet mikroorganismů [KTJ.ml<sup>-1</sup>]

$\Sigma c$  je součet všech kolonií na všech plotnách použitých pro výpočet

n je počet ploten použitých pro výpočet

d je příslušné použité ředění

V je objem očkovaného inokula [ml]

V případě vyhodnocení výsledků dvou Petriho misek po sobě jdoucího ředění byl počet bakterií počítán podle vztahu (2):

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1n_2) \cdot d} \quad [CFU / ml] \quad (2)$$

kde: N je počet mikroorganismů [KTJ.ml<sup>-1</sup>]

c je součet všech kolonií na všech plotnách použitých pro výpočet

n<sub>1</sub>, n<sub>2</sub> je počet misek příslušného ředění

d je příslušné použité ředění

V je objem očkovaného inokula [ml]



Růst bakterií při dané koncentraci soli byl hodnocen jako index růstu (IR) podle následujícího vztahu (3):

$$IR = \frac{(RBF - NK)}{PK} \cdot 100 \% \quad (3)$$

kde: IR je index růstu

RBF je počet bakterií (vyjádřený jako CFU/ml) testované kultury vyrostlých na miskách po kultivaci v médiu s příslušnou koncentrací sodných solí fosforečnanů

NK je počet bakterií (vyjádřený jako CFU/ml) vyrostlých v případě negativní kontroly pro příslušnou koncentraci fosforečnanu

PK je počet bakterií (vyjádřený jako CFU/ml) vyrostlých v případě pozitivní kontroly

Index růstu vyjadřuje relativní srovnání růstu buněk v prostředí s příslušným fosforečnanem při dané koncentraci ve srovnání s podmínkami bez inhibiční látky. Nižší hodnota indexu růstu tedy znamená větší inhibici růstu.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

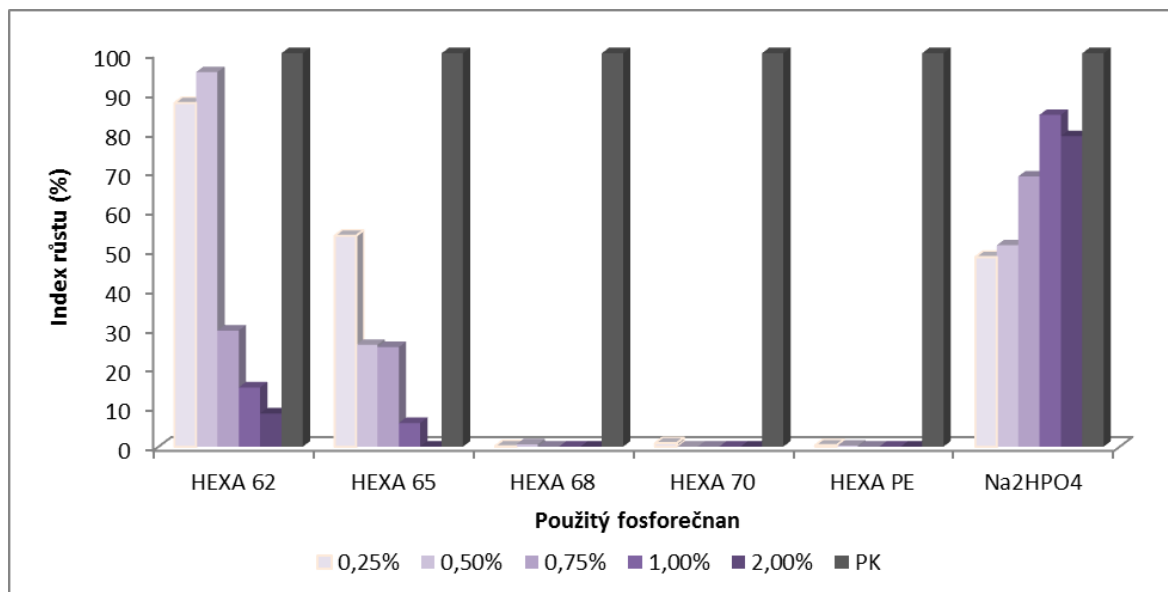
### 6.1 Vliv fosforečnanů na růst bakterií

Inhibiční efekt účinku šesti fosforečnanových solí na růst vybraných bakterií byl testován u 10 bakteriálních kmenů pomocí odečtu mikrobiálních buněk a prezentován na základě hodnoty indexu růstu. Vliv fosforečnanů byl sledován u osmi grampozitivních bakterií (*Clostridium perfringens* CAMP 5744, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Lactobacillus brevis* DEPE T89, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, *Micrococcus luteus* CCM 732, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* DEPE K38 a *Staphylococcus epidermidis* DEPE K42) a dvou gramnegativních bakterií (*Salmonella enteritidis* CCM 4420 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955).

Z naměřených hodnot počtu bakteriálních kolonií a vypočtených hodnot indexu růstu byly sestrojeny grafy znázorňující vliv daného fosforečnanu na testovaný bakteriální kmen, tj. závislost růstu bakterie na koncentraci dané soli (0,25 %; 0,50 %; 0,75 %; 1,00 % a 2,00 % w/v ). Tabulky s vypočtenými indexy růstu pro jednotlivé fosforečnanové soli jsou u všech testovaných mikroorganismů uvedeny v přílohách této diplomové práce.

#### 6.1.1 Vliv fosforečnanových solí na *Clostridium perfringens* CAPM 5744

Růst *Clostridium perfringens* CAPM 5744 byl výrazně inhibován fosforečnany HEXA 68, HEXA 70 a HEXA PE a to ve všech testovaných koncentracích (0,25 %; 0,50 %; 0,75 %; 1,00 % a 2,00 % w/v). Nejnižší hodnoty indexů růstu (IR), a tedy největší inhibice, byly u výše testovaných solí stanoveny na hodnotu 0,1 %.



Obr. 8. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk *Clostridium perfringens* CAPM 5744

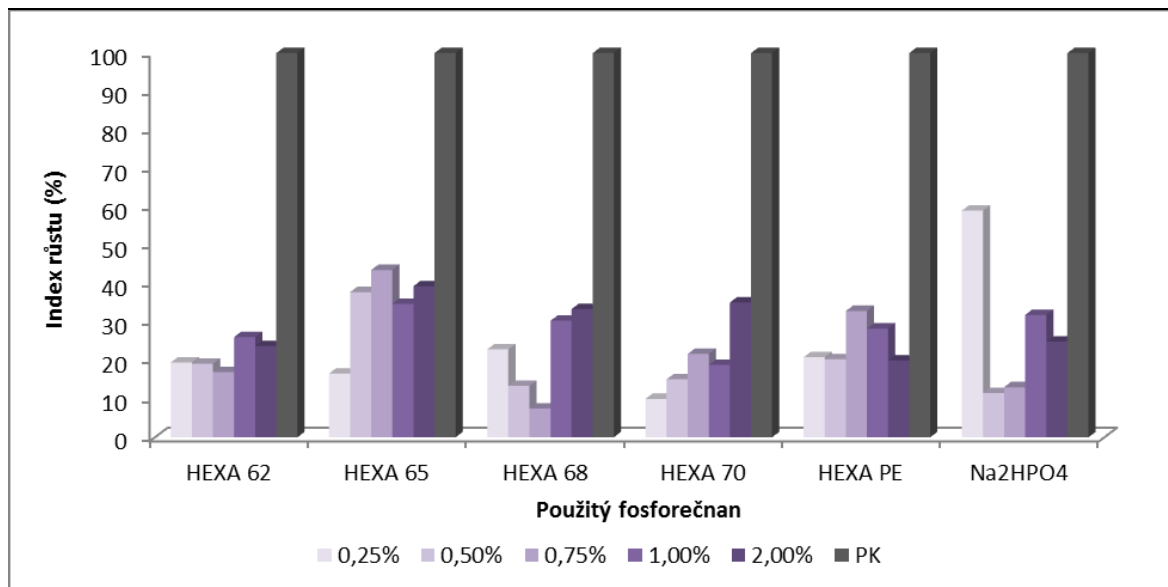
U soli HEXA 65 byl pozorován 55% nárůst buněk při koncentraci 0,25 % w/v, k další redukci hustoty bakteriálních buněk došlo se zvyšujícími se koncentracemi této soli, přičemž v nejvyšší dané koncentraci 2,00 % w/v bylo inhibiční působení soli HEXA 65 vyhodnoceno jako nejúčinnější (Obr. 8). V 2,00 % w/v koncentraci vykazovala inhibiční účinek na růst a množení buněk *Clostridium perfringens* CAPM 5744 i sůl HEXA 62. V nejnižších koncentracích (0,25% a 0,50% w/v) byl redukční efekt této soli nevýznamný.

Jako nejméně účinná sůl vůči buňkám *C. perfringens* CAPM se jevil hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) u kterého bylo pozorováno průměrné snížení hustoty bakteriálních buněk pouze o 35 % oproti pozitivní kontrole.

### 6.1.2 Vliv fosforečnanových solí na *Enterococcus faecalis* CCM 4224

Inhibiční účinky testovaných fosforečnanů na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224 jsou prezentovány na Obr. 9. Dle grafu lze usuzovat, že u všech fosforečnanových solí docházelo ve všech koncentracích k obdobnému inhibičnímu účinku na testovaný kmen bakterií. Tento trend lze vypočítat i z hodnot indexů růstu, které jsou uvedeny v příloze PI B. Z obrázku 9 je patrné, že po aplikaci soli HEXA 68 v koncentraci 0,75 % w/v došlo po 24 hodinové kultivaci k nejvyšší inhibici růstu buněk *E. faecalis* CCM 4224. Redukce

růstu buněk byla stanovena na hodnotu 7 %. Podobný efekt na růst buněk *E. faecalis* CCM 4224 vykazovala i sůl HEXA 70, která v nejnižší koncentraci (0,25 % w/v) snižovala index růstu na 10 %.



Obr. 9. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk *Enterococcus faecalis* CCM 4224

Inhibiční účinky vůči růstu buněk *E. faecalis* CCM 4224 byly zjištěny také u solí HEXA 62 a HEXA PE. Z uvedených dvou fosforečnanů byl jako účinnější vyhodnocen HEXA 62, který ve všech testovaných koncentracích redukoval průměrný index růstu o 80 %. U fosforečnanu HEXA PE došlo při stejných koncentracích k redukcí růstu buněk pouze o 76 %.

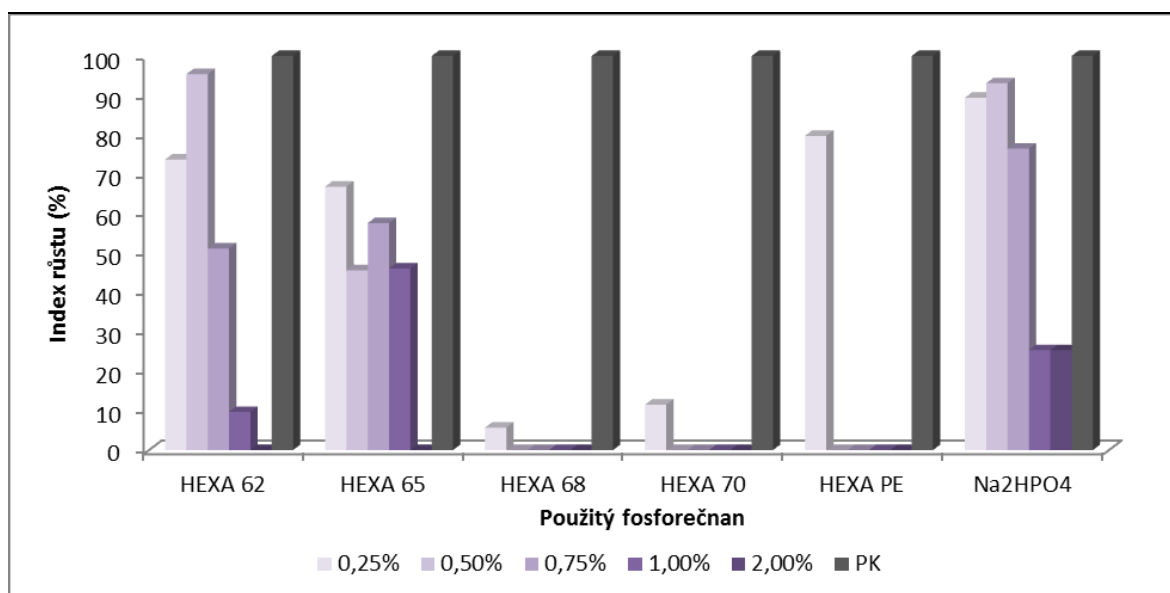
Nejméně účinným fosforečnanem vůči buňkám *E. faecalis* CCM 4224 byl HEXA 65, u něhož byl zjištěn pokles růstu buněk při nejvyšší sledované koncentraci (2 % w/v) o 40 %. V nejnižších koncentracích daných solí byl vyhodnocen jako nejméně redukčním fosforečnanem Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Index růstu byl odečten na hodnotě 60 %.

### 6.1.3 Vliv fosforečnanových solí na *Lactobacillus brevis* DEPE T89

Působení fosforečnanů na růst buněk *Lactobacillus brevis* DEPE T89 je vyjádřeno na Obr. 10 jako index růstu buněk po 24 hodinové kultivaci při teplotě 30 °C. Z grafu je patrné, že se stoupající koncentrací všech testovaných fosforečnanů byl zaznamenán výraznější inhibiční efekt na růst buněk *L. brevis* DEPE T89. Zároveň je možné si

povšimnout, že inhibiční efekt na růst *Lactobacillus* je větší než u testovaných grampozitivních mléčných koků (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946).

U fosforečnanu HEXA 68 byl sledovaný inhibiční efekt tak výrazný, že i v nejnižší testované koncentraci (0,25 % w/v) byl index růstu stanoven na pouhých 5 %. Koncentrace této soli v intervalu od 0,50 % w/v a výše zapříčinila téměř úplnou inhibici růstu buněk *L. brevis* DEPE T89. Vůbec nejnižší zaznamenaná hodnota indexu růstu ( $1 \cdot 10^{-5}$  %) u všech testovaných mikroorganismů byla pozorována právě u buněk *L. brevis* DEPE T89 a to v koncentraci 2,00 % w/v.



Obr. 10. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk *Lactobacillus brevis* DEPE T89

U fosforečnanů HEXA 68, HEXA PE a HEXA 70 nebyl pozorován růst buněk *L. brevis* DEPE T89 v koncentracích 0,50; 0,75; 1,00 a 2,00 % w/v. Zároveň bylo u soli HEXA PE zjištěno, že v koncentraci 0,25 % w/v vykazuje pouze nepatrný inhibiční efekt na růst buněk *Lactobacillus*, protože došlo k redukcí růstu buněk o 20 %.

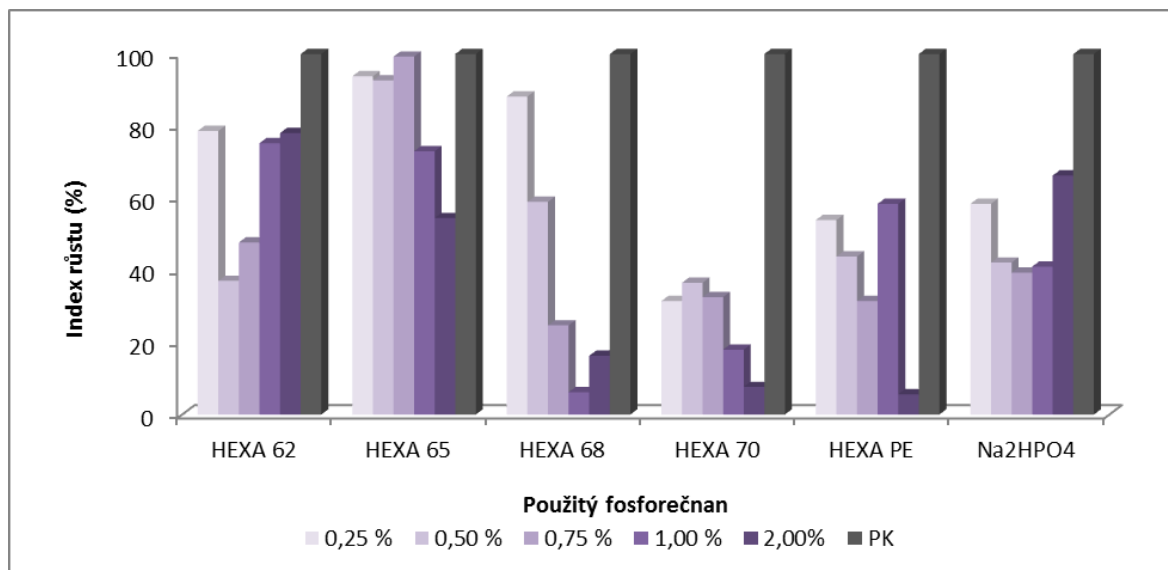
Jako nejméně účinný fosforečnan vůči růstu *L. brevis* DEPE T89 se jevil Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. I při nejvyšších aplikovaných koncentracích této soli byl zaznamenán nárůst tohoto kmene. Při koncentraci 1,00 % w/v a 2,00 % w/v došlo ke shodné redukcí růstu, a to na 25 %. V nižších koncentracích Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> byly zaznamenány zanedbatelné inhibiční účinky.

Dalším fosforečnanem, který vykazoval slabší inhibiční účinky než ostatní testované soli, byl HEXA 65. U tohoto fosforečnanu sice při koncentraci 2,00 % w/v nebyl zaznamenán růst buněk *L. brevis* DEPE T89, takže došlo k úplné inhibici růstu, avšak pokud byl HEXA 65 aplikován v koncentracích nižších, došlo pouze k minimálním inhibičním účinkům na růst *L. brevis* DEPE T89. Obdobně se v prostředí bakterie *L. brevis* DEPE T89 choval i fosforečnan HEXA 62, při 2,00 % w/v koncentraci této soli byl jeho růst zcela potlačen, v koncentraci 0,50 % w/v atakoval index růstu kontrolního vzorku.

#### **6.1.4 Vliv fosforečnanových solí na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141**

Další bakterie, na které byly testovány inhibiční účinky vybraných fosforečnanů v koncentracích 0,25 – 2 % w/v, byla *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141. Stejně jako u předcházejících bakterií byl i u *L. lactis* CCDM 141 tento efekt sledován po 24 hodinové kultivaci při teplotě 30 °C a vyhodnocen jako index růstu.

U všech testovaných fosforečnanů nebyly v koncentracích 0,25 – 0,75 % w/v zjištěny významné inhibiční účinky na růst bakterií *L. lactis* CCDM 141. U fosforečnanu HEXA 65 pak bakterie vykazovaly v těchto testovaných koncentracích oproti kontrole shodný index růstu (Obr. 11). V nejvyšší sledované koncentraci (2,00 % w/v) byly zaznamenány nejvyšší inhibiční účinky u fosforečnanu HEXA PE, který redukoval růst bakterií na 5 %. V nižších koncentracích nebyl u tohoto fosforečnanu zaznamenán výraznější inhibiční efekt na růst testovaných laktokoků.



Obr. 11. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

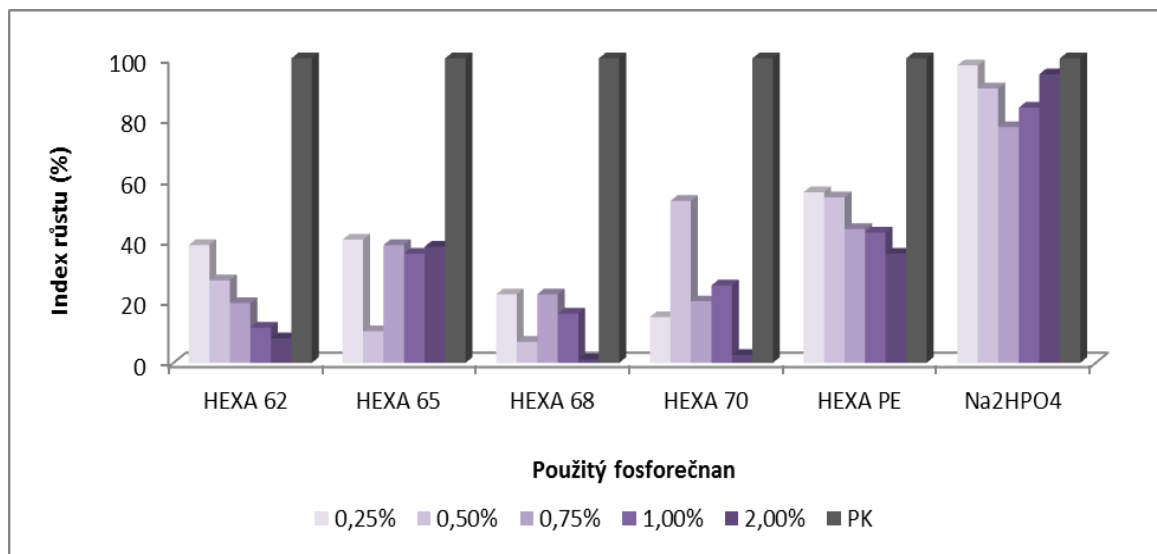
U dalších dvou fosforečnanů, HEXA 68 a HEXA 70, byl v koncentracích 1,00 – 2,00 % w/v pozorován téměř stejný inhibiční účinek na růst buněk *L. lactis* CCDM 141. Oba zmiňované fosforečnany v daných koncentracích redukovaly hustotu buněk bakterií o cca 88 %. U fosforečnanu HEXA 70 si lze povšimnout toho, že mezi koncentracemi 0,25 až 0,75 % w/v nebyl shledán významný rozdíl v inhibičním působení této soli na buňky *L. lactis* CCDM 141, v obou sledovaných koncentracích byla pozorována redukce buněk na cca 33 %. Podobný účinek na testovaný kmen *Lactococcus* měl v koncentracích 0,50; 0,75 a 1,00 % w/v i fosforečnan Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (redukce růstu na 40 %), v nejvyšší testované koncentraci (2,00 % w/v) bylo zjištěno snížení hustoty bakteriálních buněk na 66 % oproti kontrole. Z uvedených fosforečnanů byl jako nejúčinnější vyhodnocen HEXA 70, který téměř ve všech koncentracích vykazoval nejnižší index růstu oproti kontrole, průměrná hodnota IR byla stanovena na 25 %.

#### 6.1.5 Vliv fosforečnanových solí na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

Z výsledků uvedených na Obr. 12 je patrné, že z testovaných fosforečnanových solí vykazovaly výraznější inhibiční efekt na růst bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 soli HEXA 68 a HEXA 70. Sůl HEXA 68 byla schopna při koncentraci 2,00 % w/v inhibovat růst bakterií o 99 %, fosforečnan HEXA 70 o 98 %. Pokud byl fosforečnan

HEXA 70 testován v koncentraci 0,50 % byla pozorována redukce hustoty bakteriálních buněk o cca 50 %.

Fosforečnan HEXA 62 vykazoval nejlepší antimikrobní efekt při aplikované koncentraci 2,00 % w/v, kde byl schopen redukovat růst buněk *L. cremoris* CCDM 946 o 92 %. Z grafu je rovněž patrné, že byl zpozorován trend zvyšující se účinnosti daného fosforečnanu s jeho rostoucí koncentrací.



Obr. 12. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 946

U dalších dvou fosforečnanů, HEXA 65 a HEXA PE, byly v koncentraci 2,00 % pozorovány téměř stejné inhibiční účinky na růst *L. cremoris* CCDM 946. Obě testované soli v těchto koncentracích snižovaly hustotu buněk bakteriální suspenze o 45 %. Pokud byl fosforečnan HEXA PE aplikován v koncentraci 0,75 a 1,00 % w/v, byla hustota suspenze testovaných bakterií redukována na cca 43 %, po aplikaci fosforečnanu HEXA 65 v téže koncentraci došlo k redukci růstu průměrně na 40 %. Poněkud odlišné bylo chování buněk *L. cremoris* CCDM 946 v prostředí koncentrace 0,50% w/v, protože v tomto případě bylo pozorováno, že fosforečnan HEXA 65 redukoval hustotu buněk na 10 %, zatímco fosforečnan HEXA PE na 55 %.

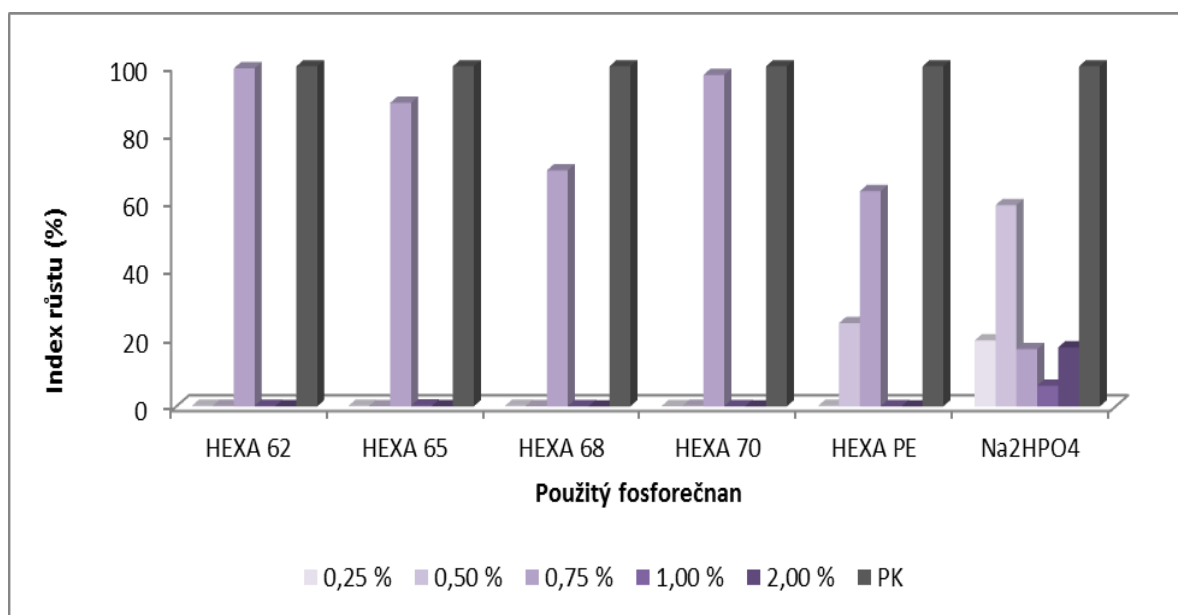
Fosforečnan HEXA 65 vykazoval ve všech testovaných koncentracích (0,25 – 2,00 % w/v) podobnou účinnost a byl tedy schopen snižovat růst buněk *L. cremoris* CCDM 946 pod hranici 30 %.



Nejméně účinným fosforečnanem vůči buňkám *L. cremoris* CCDM 946 byl fosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Ve všech aplikovaných koncentracích tohoto fosforečnanu byl zaznamenán růst testovaného kmene. Při koncentraci 0,25 % a 2,00 % w/v došlo k redukci růstu buněčné populace o cca 5 %.

#### 6.1.6 Vliv fosforečnanových solí na *Micrococcus luteus* CCM 732

Inhibiční účinky sledovaných fosforečnanových solí na růst *Micrococcus luteus* CCM 732 jsou znázorněny na Obr. 13. U testovaných fosforečnanů HEXA 62, HEXA 65, HEXA 68 a HEXA 70 lze pozorovat, že v rozmezí koncentrací 0,25 – 2,00 % w/v, s výjimkou koncentrace 0,75 % w/v, došlo po 48 hodinové kultivaci k úplnému potlačení růstu buněk *M. luteus* CCM 732. Poněkud odlišné účinky vykazoval fosforečnan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Z hodnot indexů růstu lze usuzovat, že nejmenší inhibiční účinky vykazoval v koncentraci 1,00 % w/v, v koncentraci 2,00 % w/v pak došlo k pozvolnému nárůstu hustoty buněk a při této koncentraci byla hodnota indexu růstu 17 %.



Obr. 13. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk *Micrococcus luteus* CCM 732

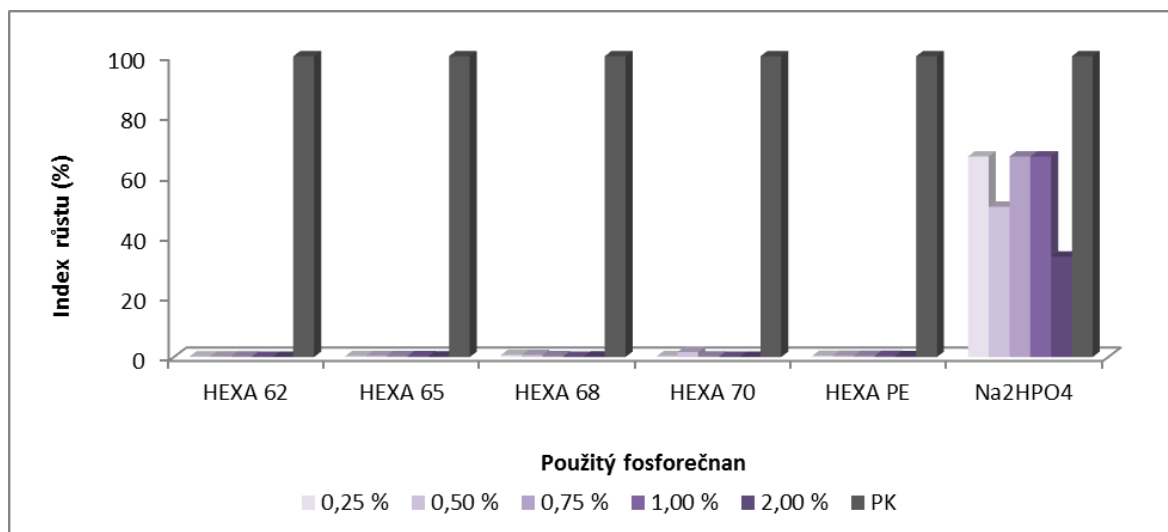
U všech testovaných fosforečnanů byly minimální antimikrobní účinky sledovány v koncentraci 0,75 % w/v. Fosforečnany HEXA 62 a HEXA 70 zde dokonce atakovaly hranici indexu růstu kontrolního vzorku a byly proto vyhodnoceny jako nejméně účinné.

Fosforečnan HEXA 62 snižoval hustotu buněk bakterií o necelé jedno procento. Při aplikaci fosforečnanu HEXA 68 a HEXA PE došlo k redukci buněk *M. luteus* CCM 732 pod 30 %.

### 6.1.7 Vliv fosforečnanových solí na *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* DEPE K38

Ovlivnění růstu buněk po působení fosforečnanů v koncentracích 0,25 – 2,00 % w/v bylo testováno také u bakterií rodu *Staphylococcus*. Účinky zvolených fosforečnanů na růst buněk *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* DEPE K38 po 24 hodinách inkubace při 30 °C jsou prezentovány na Obr. 14.

Vůči růstu *S. aureus* DEPE K38 byly nejúčinnější soli HEXA 62, HEXA 65, HEXA 68, HEXA 70 a HEXA PE. Jak je patrné z grafu i z hodnot indexů růstu zaznamenaných v příloze PI H, u těchto fosforečnanů byla prokázána téměř úplná inhibice růstu buněk již po aplikaci v koncentracích 0,25 % w/v a vyšších. Růst *S. aureus* DEPE K38 v živném médiu s přidavkem fosforečnanu HEXA 68 o koncentraci 0,25 a 0,50 % w/v byl prakticky srovnatelný a byla pozorována redukce bakteriálních buněk na 0,6 %. Podobně se choval i fosforečnan HEXA 70, s výjimkou koncentrace 0,50 % w/v bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací dané soli, se inhibiční efekt na růst buněk *S. aureus* DEPE K38 zvyšuje.



Obr. 14. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* DEPE K38

Při aplikaci fosforečnanu  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve všech sledovaných koncentracích (0,25 – 2,00 % w/v) byl zaznamenán růst buněk testovaného kmene, v nejvyšší dané koncentraci (2,00 % w/v) se index růstu redukoval na 33 %. V koncentracích 1,00 % w/v a níže byl prokázán téměř shodný růst buněk (66 %) *S. aureus* DEPE K38.

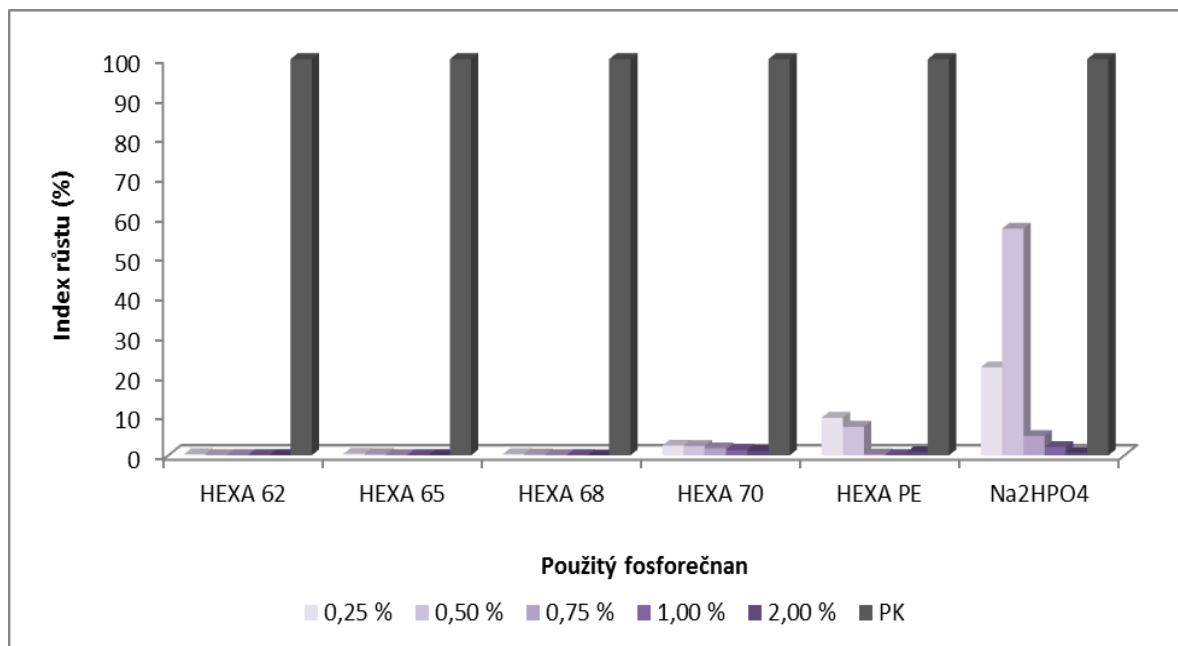
Nejlepší antibakteriální účinky vůči buňkám *S. aureus* CCM, v jehož přítomnosti byl zjištěn pouze minimální nárůst buněk *S. aureus* DEPE K38 ve všech sledovaných koncentracích, vykazoval fosforečnan HEXA 62, protože průměrná hodnota IR byla stanovena na 0,1 %.

### 6.1.8 Vliv fosforečnanových solí na *Staphylococcus epidermidis* DEPE K42

Na Obr. 15 je prezentováno působení testovaných fosforečnanů na růst buněk *Staphylococcus epidermidis* DEPE K42 po 24 hodinové kultivaci při 30 °C. Přítomnost určitých fosforečnanů v živném médiu výrazněji ovlivňovala růst buněk *S. epidermidis* DEPE K42.

Z výsledků uvedených na Obr. 15 je patrné, že z testovaných fosforečnanů vykazovaly výrazný inhibiční efekt na růst buněk *S. epidermidis* DEPE K42 soli HEXA 62, HEXA 65, HEXA 68. U těchto fosforečnanů byla pozorována téměř úplná inhibice růstu buněk již po aplikaci testovaných solí v koncentracích 0,25 % w/v a vyšších. Nejnižší naměřená hodnota indexu růstu ( $1 \cdot 10^{-3}$  %) byla pozorována u soli HEXA 68 a to v koncentraci 2,00 % w/v, fosforečnan HEXA 62 a HEXA 65 redukoval růst buněk při stejné koncentraci na cca  $6 \cdot 10^{-2}$  %.

V porovnání s výše diskutovanými fosforečnany byl při aplikaci soli HEXA PE v koncentracích 0,25 a 0,50 % w/v zjištěn intenzivnější nárůst buněk *S. epidermidis* DEPE K42, nicméně s rostoucí koncentrací příslušné soli se inhibiční efekt zvyšoval. V případě tohoto fosforečnanu došlo při koncentraci 0,25 % w/v k redukci růstu o 90 %, při koncentraci 0,50 % w/v o 93 %.



Obr. 15. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk *Staphylococcus epidermidis* DEPE K42

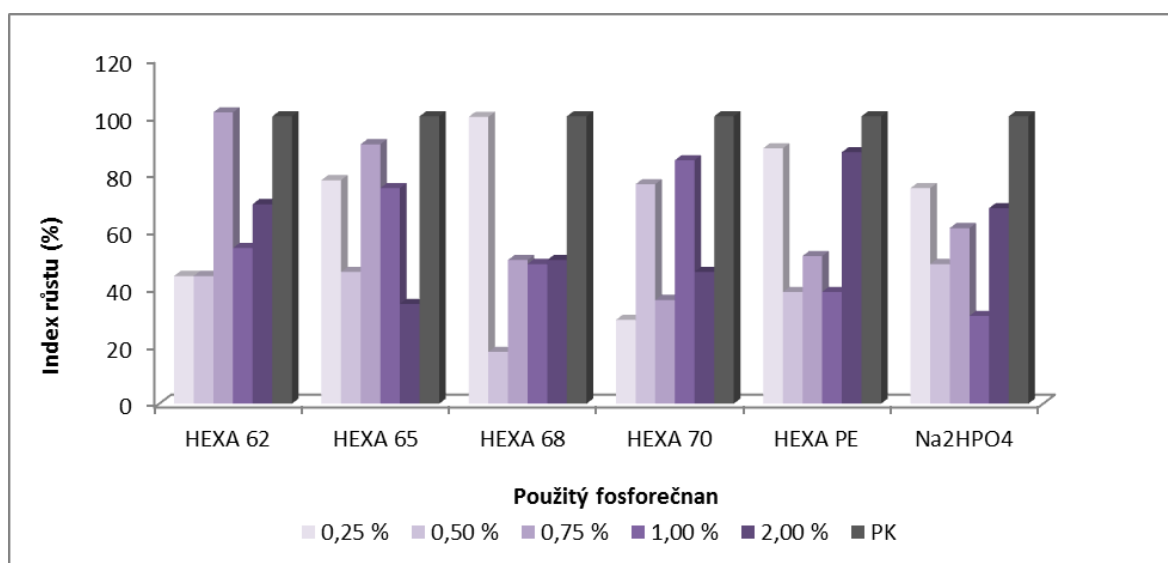
Nejméně účinným fosforečnanem vůči buňkám *S. epidermidis* DEPE K42 byl fosforečnan HEXA 70. U tohoto fosforečnanu nebyla ani při nejvyšší aplikované koncentraci zjištěna úplná inhibice růstu, se zvyšující se koncentrací nastal pouze pokles růstu buněk a index růstu v nejnižší testované koncentraci atakoval hranici 3 %. Podobně se jevila i sůl Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, nicméně v koncentracích 0,75 – 2,00 % w/v byl zaznamenán trend zvyšujícího se inhibičního účinku fosforečnanu s jeho rostoucí koncentrací, výjimkou byla aplikace toho fosforečnanu v koncentraci 0,50 % w/v, kde byla pozorována vůbec nejnižší citlivost vůči testovanému kmenu stafylokoka.

### 6.1.9 Vliv fosforečnanových solí na *Salmonella* Enteritidis CCM 4420

Na Obr. 16 je graficky znázorněn index růstu gramnegativních buněk *Salmonella* Enteritidis CCM 4420 po 24 hodinové kultivaci v přítomnosti sledovaných fosforečnanů o koncentracích v rozmezí 0,25 – 2,00 % w/v. U testovaných fosforečnanových solí lze pozorovat, že dle předpokládaných poznatků z teoretické části diplomové práce (viz. kapitola 2), byly inhibiční účinky, v porovnání s gram pozitivní buňkou bakterií, výrazně sníženy a tato skutečnost se i rovněž projevila v hodnotách indexů růstu zobrazených v příloze PI K.

Jako nejúčinnější fosforečnany působící inhibičně na růst buněk *S. Enteritidis* CCM 4420 byly vyhodnoceny soli HEXA 65 a HEXA 70. Tyto fosforečnany sice v koncentracích 1,00 % w/v a nižších nevykazují výrazný inhibiční efekt, nebo dokonce v jejich přítomnosti atakují hodnoty indexů růstu v kontrolních vzorcích, avšak v koncentracích vyšších než 1,00 % w/v došlo k redukci růstu buněk *S. Enteritidis* CCM 4420 alespoň pod hranic 50 %.

Nejnižšího inhibičního efektu na růst bakterií *S. Enteritidis* CCM 4420 bylo dosaženo při působení fosforečnanu HEXA 68 v koncentraci 0,25 % w/v, kdy bylo pozorováno snížení nárůstu buněk o 1 %, v koncentracích 0,75 – 2,00 % w/v byl zaznamenán trend zvyšujícího se inhibičního účinku daného fosforečnanu s jeho rostoucí koncentrací, v koncentraci 0,50 % w/v pak byla pozorována redukce indexu růstu vůči buňkám *S. Enteritidis* CCM 4420 o 64 %, v důsledku čehož bylo z daných solí dosaženo nejvýraznějšího inhibičního efektu.



Obr. 16. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk *Salmonella Enteritidis* CCM 4420

U fosforečnanů HEXA PE a Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> byl pozorován částečný inhibiční efekt při koncentracích 0,50 – 0,75 % w/v. Zároveň bylo u zmíněných solí zjištěno, že tyto fosforečnany mají zanedbaný efekt na růst buněk *S. Enteritidis* CCM 4420 v koncentraci 0,25 a 2,00 % w/v. Pokud byl aplikován fosforečnan HEXA PE v koncentraci 2,00 % w/v, byla hustota bakteriálních buněk redukována na 87 %, po aplikaci fosforečnanu Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> v téže koncentraci došlo k redukci růstu na 68 %. Poněkud podobné bylo chování buněk

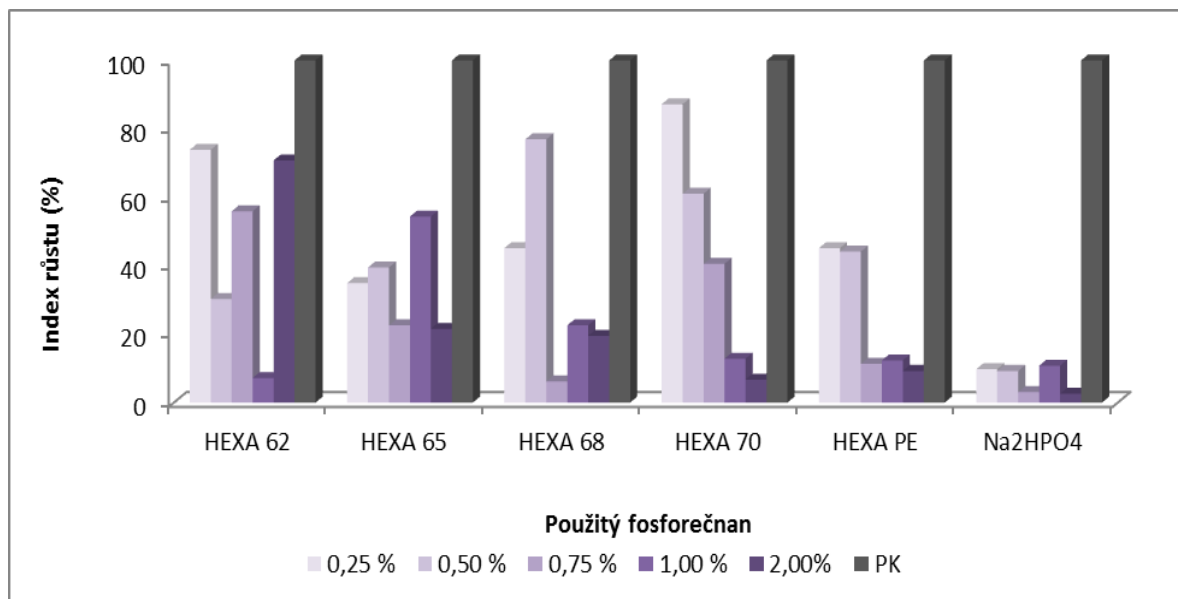
S. Enteritidis CCM 4420 v prostředí fosforečnanu HEXA 62 o koncentraci 2,00 % w/v, protože v tomto případě bylo zaznamenáno snížení počtu buněk o cca 70 %, v koncentraci 0,75 % w/v pak došlo k nárůstu testovaného kmene v hustotě buněk převyšujících o 1 % kontrolní vzorek, IR byl stanoveno na hodnotu 101 %.

#### **6.1.10 Vliv fosforečnanových solí na *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955**

Posledním mikroorganizmem, u kterého byly testovány inhibiční účinky zvolených fosforečnanů v koncentracích 0,25 – 2,00 % w/v, byla gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. Změny indexu růstu bakterií v přítomnosti fosforečnanů jsou prezentovány na Obr. 17.

Nejméně účinným fosforečnanem vůči buňkám *P. aeruginosa* CCM 3955 byl fosforečnan HEXA 62. U tohoto fosforečnanu nebyla ani při nejvyšší testované koncentraci 2,00 % w/v zjištěna inhibice růstu, nastala pouze redukce růstu buněk o 30 %. Při aplikaci dané soli v koncentraci 1,00 % w/v se index růstu výrazně snižoval, atakoval hranici 7 %. V koncentracích 0,75 % w/v a nižších byl výše aplikovaný fosforečnan neúčinný.

U fosforečnanů HEXA 70 a HEXA PE si lze povšimnout toho, že při koncentraci 0,25 – 0,50 % w/v nebyly u těchto solí zaznamenány prakticky žádné inhibiční účinky. Avšak při použití v koncentracích 0,75 % w/v a vyšších již došlo k inhibici růstu testovaných buněk *P. aeruginosa* CCM 3955. U fosforečnanu HEXA PE byl zaznamenán trend zvyšujícího se inhibičního účinku s jeho rostoucí koncentrací, při aplikaci v koncentracích 0,75 % w/v a 1 % w/v byla pozorována redukce růstu buněk o 60, respektive 88 %. Pokud byl fosforečnan HEXA PE přidán do kultivačního média v koncentraci 2,00 % w/v, došlo již k inhibici růstu buněk *P. aeruginosa* CCM 3955 o 91 %.



Obr. 17. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

Fosforečnany HEXA 65 a HEXA 68 byly vyhodnoceny jako nejučinnější vůči bakterii *P. aeruginosa* CCM 3955 v koncentraci 2,00 % w/v, protože při této aplikaci bylo dosaženo významného inhibičního růstu a index růstu byl odečten na 21 %, respektive 19 %. Pokud byl fosforečnan HEXA 65 aplikován do živného média v koncentraci 1,00 % w/v a nižší došlo k redukci růstu buněk nejméně o 45 %.

Nejlepší antibakteriální účinky vůči buňkám *P. aeruginosa* CCM vykazoval hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Již při aplikaci tohoto fosforečnanu v nejnižší testované koncentraci (0,25 % w/v) došlo k poklesu indexu růstu na pouhých 9 %, s rostoucí koncentrací se tento efekt zvyšoval. V koncentraci 2,00 % došlo ke snížení počtu buněk o 98 %.

## 6.2 Souhrnná diskuze

Jedním z cílů této práce bylo sledovat inhibiční účinky vybraných fosforečnanů na růst bakterií. Za tímto účelem bylo vybráno 10 kmenů bakterií, z nichž 2 kmeny patří mezi gramnegativní bakterie (rod *Pseudomonas* a rod *Salmonella*) a 8 kmenů mezi bakterie grampozitivní (grampozitivní koky a sporulující bakterie rodu *Clostridium*). Bakterie byly vybrány tak, aby soubor testovaných kmenů zahrnoval bakterie, které mohou být zdrojem

kontaminace kosmetických a potravinářských surovin, nebo bakterie odolnější k nepříznivým vlivům prostředí, které mohou být izolovány z potravin (rod *Clostridium*).

Pro testování inhibičních účinků fosforečnanů byly použity jejich sodné soli, které byly poskytnuty firmou Fosfa a.s., Břeclav-Poštorná. Pro dané účely byly použity soli (HEXA 62, HEXA 65, HEXA 68, HEXA 70, HEXA PE a  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), které se lišily délkou řetězce. Pro srovnání možných inhibičních účinků byly všechny fosforečnany testovány u celého souboru bakterií v rozmezí koncentrací 0,25 – 2,00 % w/v.

Z výsledků experimentů vyplývá, že gramnegativní bakterie nejsou k účinkům zvolených fosforečnanů citlivé. Z testovaných gramnegativních bakterií je vůči působení fosforečnanových solí nejvíce odolná *Salmonella* Enteritidis CCM 4420, u které byla po 24 hodinové kultivaci zjištěna v přítomnosti fosforečnanů inhibice růstu převyšující kontrolní vzorek o více než 1 % (sůl HEXA 62 v koncentraci 0,75 % w/v). Výraznější inhibiční efekt na růst buněk salmonel vykazovaly fosforečnany HEXA 68 a HEXA 70, které byly schopny při koncentraci 0,50 % w/v, respektive 0,25 % w/v, redukovat hustotu bakteriální suspenze alespoň o 80 %. Inhibiční efekt byl rovněž zjištěn při působení fosforečnanu  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , u něhož po jeho aplikaci v koncentraci 0,50 % w/v došlo k potlačení růstu buněk *Salmonella* Enteritidis CCM 4420 o 70 % oproti kontrole.

Toto zjištění bylo v souladu s výsledky experimentu Jurčové (2011), která rovněž nezaznamenala výraznější inhibiční účinky fosforečnanových směsí na růst bakterie *Salmonella* Enteritidis. Nejvyšší inhibice bylo dosaženo při aplikaci fosforečnanové směsi s obsahem soli HEXA 68 a HEXA 70 [72].

Z našich experimentů provedených na sérii fosforečnanů vyplývá, že jako citlivější ze skupiny gramnegativních bakterií vůči působení fosforečnanů se jeví *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. Pokud byla tato bakterie kultivována v přítomnosti fosforečnanu  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve všech aplikovaných koncentracích (0,25 – 2,00 % w/v), byl zaznamenán pouze její nepatrný nárůst. Fosforečnany HEXA 68, HEXA 70 a HEXA PE v nejvyšší aplikované koncentraci (2,00 % w/v) rovněž snižovaly index růstu, a to pod hranici 20 %. Toto skutečnost je poměrně zajímavá, jelikož bakterie rodu *Pseudomonas* jsou považovány za bakterie vcelku odolné vůči nepříznivým vlivům prostředí, a tedy i zvýšenému obsahu solí.



Jiní autoři uvádí, že bakterie *P. aeruginosa* významněji reagovala na přítomnost polyfosforečnanů (HEXA 68 a HEXA 70) až při nejvyšších zkoumaných koncentracích (2,00 % w/v), a to většinou zpomalením růstu, úplné inhibice rovněž dosaženo nebylo [39].

Grampozitivní bakterie byly k testovaným fosforečnanům více citlivé než bakterie gramnegativní. Nejvíce odolné vůči působení fosforečnanů byly kmeny *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* DEPE K38 a *Staphylococcus epidermidis* DEPE K42. Z testovaných fosforečnanů nevykazuje výraznější inhibiční efekt vůči růstu grampozitivních bakterií sůl  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Pokud byly aplikovány fosforečnany HEXA 62, HEXA 65, HEXA 68 a HEXA 70, byly bakterie rodu *Staphylococcus* výrazně inhibovány ve všech testovaných koncentracích (0,25 – 2,00 % w/v). U kmene *Staphylococcus epidermidis* DEPE K42 byl zjištěn růst buněk po přidání fosforečnanu HEXA PE do média v nejnižší zvolené koncentraci.

Podle Lorencové (2010), v podmínkách *in vitro*, působila na *S. aureus* CCM 3953 inhibičně 0,40% w/v koncentrace polyfosforečnanu HEXA 68. Polyfosforečnan HEXA 70 tak silné inhibiční účinky nevykazoval, výrazné snížení maximální hodnoty růstu bylo dosaženo v koncentraci 2,00 % w/v. V prostředí koncentrací nižších došlo pouze k prodloužení lag fáze této bakterie [73].

Další testované bakterie byly kmeny náležící do rodu *Lactococcus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946. Pokud porovnáme účinky jednotlivých fosforečnanů na buňky *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, je zřejmé, že nejvyšší inhibiční efekt měly soli HEXA 68 a HEXA 70. Důvodem je, s nejvyšší pravděpodobností, jejich vyšší stupeň kondenzace. Jak již bylo prezentováno v teoretické části diplomové práce, delší řetězce fosforečnanů disponují zesílenou schopností vyvazovat dvojmocné kationty kovů a mohou tak porušit integritu buněčných stěn či membrán [39, s. 9].

Druhý z výše zmíněného rodu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, byl účinně potlačován přidavkem nejvyšší aplikované koncentrace polyfosforečnanů HEXA 68, HEXA 70 a HEXA PE. Můžeme tedy konstatovat, že bakterie z rodu *Lactococcus* byly spolehlivě inhibovány přidavkem fosforečnanů s vyšším kondenzačním stupněm.

Účinky fosforečnanů na růst bakterií rodu *Lactococcus* nejsou zatím v literatuře příliš popsány. Buňka a kol. (2010) poukazují na schopnost některých bakterií kmene

*Lactococcus lactis* produkovat nisin. Nisin narušuje permeabilitu cytoplazmatické membrány tím, že interaguje s fosfolipidy a snižuje tak odolnost vegetativních buněk. Z definice této teorie tedy vyplývá, že spolehlivé inhibice růstu buněk laktokoků by mělo být dosaženo i přidavkem fosforečnanů v nižším kondenzačním stupni. Z výsledků našeho experimentu nebylo této skutečnosti dosaženo [74].

*Micrococcus luteus* CCM 723 patřil mezi „problémové“ grampozitivní bakterie, jejichž růst nebylo možné v prostředí fosforečnanů předvídat. *Micrococcus luteus* CCM 723 se projevil jako velmi citlivý na přítomnost polyfosforečnanů HEXA 62, HEXA 65, HEXA 68, HEXA 70 a HEXA PE, kdy již od 1,00% koncentrace byl spolehlivě znemožněn jakýkoliv nárůst. Překvapivě pak působily aplikace těchto solí v koncentraci 0,75 % w/v, kdy byl opět zaznamenán nárůst. Zdá se tedy, že při aplikaci mezních koncentracích uvedených fosforečnanů, dochází k přizpůsobení bakterie daným podmínkám. Snižovaný inhibiční efekt vůči růstu buněk *Micrococcus luteus* CCM 723 projevil zásaditý fosforečnan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

V literatuře byl publikován Vliv účinku sodných fosforečnanů na růst potravinářsky významných bakterií. Z výsledků experimentu Buňkové a kol. (2011) lze konstatovat, že *Micrococcus luteus* CCM 723 se jevil jako velmi citlivý na přítomnost polyfosforečnanů HEXA 68 a HEXA 70, kdy již od 0,30% w/v koncentrace byl spolehlivě znemožněn jakýkoliv nárůst [39]. K obdobným výsledkům dospěla i Lorencová (2010). Překvapivě účinkoval zásaditý fosforečnan TRIKRYSTAL, kdy jeho přidavek v 0,50% w/v koncentraci způsobil celkovou inhibici buněk *M. luteus* CCM 732 [73].

Další bakterií, na které byly testovány inhibiční účinky fosforečnanů, byla *Enterococcus faecalis* CCM 4224. Testovaná bakterie byla kultivována po dobu 24 hodin v prostředí fosforečnanových solí o koncentracích 0,25 – 2,00 % w/v. Buňky *E. faecalis* CCM 4224 nebyly v prostředí aplikovaných fosforečnanů výrazně inhibovány a to ani při aplikaci nejvyšší sledované koncentrace (2,00 % w/v). Všechny aplikované fosforečnany snižovaly hustotu bakteriální suspenze pod hranici 40 %. Nejnižší účinnost vykazoval zásaditý polyfosforečnan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  v koncentraci 0,25 % w/v.

Lorencová (2010) při studiu účinku fosforečnanových solí na růst buněk *Enterococcus faecalis* CCM 4224 zjistila antimikrobiální efekt polyfosforečnanu HEXA 68 (v koncentraci 1,00 % w/v). V závislosti na zvyšujícím se množstvím tohoto

polyfosforečnanu do kultivačního média došlo od hodnoty 0,10 % w/v k pozvolnému snižování růstové rychlosti a prodlužování generační doby. Sůl HEXA 70 takový trend chování nevykazovala. I při aplikaci nejvyšších koncentrací (2,00 % w/v) docházelo k množení daného mikroorganismu [73].

Přesné složení fosforečnanů HEXA 68 a HEXA 70 není známo (který z nich disponuje delším řetězcem, nebo zda obsahují příměsi jiných solí), proto není možné zdůvodnit odlišnost trendů inhibičních účinků prezentovaných Lorencovou. Na základě dosažených výsledků lze pouze usuzovat, že polyfosforečnan HEXA 68 má vyšší stupeň kondenzace než HEXA 70.

Na potlačení růstu sporulující bakterie *Clostridium perfringens* CAMP 5744 byly neúčinnější soli HEXA 68, HEXA 70 a HEXA PE, kdy již nejnižší testované koncentrace těchto solí zapříčinily úplnou inhibici. Stejný efekt vyvolaly i 2,00% w/v přídavky soli HEXA 62 a HEXA 65. Polyfosforečnan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ani v nejvyšší aplikované koncentraci (2,00 % w/v) nezpůsobil významnější inhibici.

Pro porovnání výsledků růstu testovaných bakterií rodu *Clostridium* v tavených sýrech s obsahem směsi fosforečnanů, je patrné, že výraznějšího pokles počtu buněk klostridií bylo dosaženo při aplikaci směsi s obsahem polyfosforečnanu HEXA 68. Počet buněk se po šestém dnu od aplikace snížil o 70 %. Za předpokladu delšího časového působení inhibičních směsí (tj. 117 dnů od aplikace) bylo dosaženo obdobného výsledku i v prostředí polyfosforečnanu HEXA 70 [73].

Posledním mikroorganizmem, u kterého byly testovány inhibiční účinky zvolených fosforečnanů v koncentracích 0,25 – 2,00 % w/v, byla bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus brevis* DEPE T89. Efektivního účinku bylo dosaženo při aplikaci polyfosforečnanů HEXA 68, HEXA 70 a HEXA PE, kdy na přítomnost těchto solí reagovaly buňky *L. brevis* DEPE T89 již v prostředí 0,50% w/v koncentrace. Překvapivě účinkovala sůl HEXA 62 a HEXA 65, kdy 2,00% w/v přídavky těchto solí v médiu, znemožňovaly nárůst buněk *L. brevis* DEPE T89, ale nižší ho povolovaly. Na základě nižšího kondenzačního stupně, nebyla inhibice očekávaná ani při aplikaci nejvyšší testované koncentrace. Nejméně účinným fosforečnanem vůči buňkám *L. brevis* DEPE T89 byl fosforečnan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . V testované koncentraci 1,00 a 2,00 % w/v nastal pouze pokles růstu buněk.

## ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na sledování inhibičních účinků šesti sodných fosforečnanových solí v různém kondenzačním stupni na vybrané kmeny grampozitivních a gramnegativních bakterií. Fosforečnany, které byly v praktické části diplomové práce vybrány (HEXA 62, HEXA 65, HEXA 68, HEXA 70, HEXA PE), se v potravinářských technologiích především využívají za účelem úpravy pH a emulgačních vlastností, případně pro své antimikrobní účinky. Na základě dosažených výsledků lze konstatovat:

- v podmínkách *in vitro* nebyly prokázány významné inhibiční účinky fosforečnanů na růst gramnegativních bakterií, nejnižší hodnoty IR byly pozorovány při aplikaci fosforečnanu  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,
- nejvíce citlivým kmenem byl vůči sledovaným fosforečnanovým solím rod *Staphylococcus*, respektive *Staphylococcus aureus* DEPE K38. Výjimku tvořil přídavek sodného fosforečnanu  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,
- nejnižší redukce růstu grampozitivních buněk byla zaznamenána u bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, kdy u všech testovaných fosforečnanů nebylo ani při nejvyšších koncentracích dosaženo významnější inhibice,
- na rod *Lactococcus* nejlépe působila sůl HEXA 70,
- celkově nejúčinnější byly soli HEXA 68, HEXA 70 a HEXA PE. Obecně lze tedy konstatovat, že čím vyšší byl kondenzační stupeň daného fosforečnanu, tím se zvyšoval i jeho následný antimikrobní efekt,
- zásaditý fosforečnan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  neprojevil účinnost ani v prostředí nejvyšší testované koncentrace, a proto byl vyhodnocen jako nejméně účinný.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*. Vydání 1. Praha: vydalo SNTL. ISBN 04-815-83
- [2] TOUŽÍN, J. *Stručný přehled chemie prvků*. Vydání 1. Brno: Masarykova univerzita, 2003, 225 s. ISBN 80-210-2635-9
- [3] MUCK, A., EARNSHAW, A. *Základy strukturní anorganické chemie*. Vydání 1. vyd. Praha: Academia, 2006, 508 s. ISBN 80-200-1326-1.
- [4] Chemie a technologie sloučenin fosforu: *Fosforečnany* [online].[cit. 2014-03-11]. Dostupný z WWW:  
[http://fzp.ujep.cz/ktv/uc\\_texty/pt1/Chemie\\_a\\_technologie\\_sloucenin\\_fosforu.pdf](http://fzp.ujep.cz/ktv/uc_texty/pt1/Chemie_a_technologie_sloucenin_fosforu.pdf)
- [5] RATON, B. *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC Press, 2000, 818 s. ISBN 08-493-2047-X.
- [6] Chemical of the week: *Phosphoric acid* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW:  
[http://scifun.chem.wisc.edu/chemweek/pdf/phosphoric\\_acid.pdf](http://scifun.chem.wisc.edu/chemweek/pdf/phosphoric_acid.pdf)
- [7] MOLINS, R., *Phosphates in Food*, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, CRC Press, Inc. 1991, ISBN 0-8493-4588-X
- [8] Chembook: *Molecular geometry types* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW:  
<http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/204tetrahedral.html>
- [9] TROJAN, M. *Antikoroziční stabilní pigment* [patent]. 54, 259341. Uděleno 1989. Dostupný z WWW: <http://spisy.upv.cz/Patents/FullDocuments/259/259341.pdf>
- [10] Fosfor - Chemický vzdělávací portál [online].[cit. 2014-03-16]. Dostupný z WWW: [http://chemie.gfxs.cz/index.php?pg=prvek&prvek\\_id=15](http://chemie.gfxs.cz/index.php?pg=prvek&prvek_id=15)
- [11] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin I*. Vydání 3. Tábor: OSSIS, 2009, 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6
- [12] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin II*. Vydání 3. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6

- [13] Informační centrum Ministerstva zemědělství: *Fosfáty* [online].[cit. 2014-05-10]. Dostupný z WWW: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92369.aspx>
- [14] Fosfa: *Difosforečnan disodný* [online].[cit. 2014-05-10]. Dostupný z WWW: [http://web.fosfa.cz/files/products/attachments/kl/difosforecnan\\_disodny\\_ror\\_28\\_cz\\_0.pdf](http://web.fosfa.cz/files/products/attachments/kl/difosforecnan_disodny_ror_28_cz_0.pdf)
- [15] WINKLEROVÁ, D. *Přídavné látky v potravinách* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW: <http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/pridatne-latky-v-potravinach-1>
- [16] BUŇKA, F. *Technologie mléka*. Přednáška. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, rok 2010
- [17] KADIS, V., BABEL, F. *Effect of Addition of Phosphates to Milk on Development of Bacteriophage and Growth of Lactic Cultures*, *Journal of Dairy Science*, Volume 45, Issue 3, March 1962, Pages 432-435
- [18] JANŠTOVÁ, B., et al. *Technologie mléka a mléčných výrobků* [online]. Brno, 2012 [cit. 2014-05-13]. ISBN 978-80-7305-637-7. Dostupný z WWW: <http://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/Janstova-skripta-web.pdf>
- [19] BUREŠOVÁ, I., LORENCOVÁ E. *Výroba potravin rostlinného původu*. Zlín, 2013. ISBN 9788074542787.
- [20] Biopro: *Hydrogenfosforečnan amonný* [online].[cit. 2014-05-10]. Dostupný z WWW: <http://www.biopro.cz/xmedia/pdf/vyziva/3-HYDROGENFOSFORECNAN-AMONNY-APLIKACNI-LIST-S06-132-01-0406.pdf>
- [21] AITKEN, A., *Polyphosphates in Fish Processing*, Ministry of agriculture, fisheries and food, TORRY RESEARCH STATION FAO, SIFAR 2001. Dostupný z WWW: <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5909e/x5909e00.htm#Contents>
- [22] HVÍZDALOVÁ, I. *Možnosti technologických použití aditiv pro zlepšení chuti a dalších vlastností masných výrobků*. [online]. 2006, č. 4, s. 23-28 [cit. 2014-05-13]
- [23] Phosphates in meat processing: *Ingredients, Additives, Flavours & Extractives* [online].[cit. 2014-05-10]. Dostupný z WWW: [http://www.malabarsuperspice.com/ref\\_phosphates.htm](http://www.malabarsuperspice.com/ref_phosphates.htm)
- [24] SZPI: *Přídavné látky* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW:

<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1005724&docType=ART>

[25] *Vyhláška č. 4/2008 Sb.* 2008., o použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. In: *Sbírka zákonů*. 22. 4. 1998.

[26] Publikace české technologické platformy pro potraviny: *Přídatné látky v potravinách* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW:

<http://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/publikace/P%C5%99%C3%ADdatn%C3%A9%20%C3%A1tky%20v%20potravin%C3%A1ch%20PK.pdf>

[27] Fosforečnany sodné: *E339* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW:  
<http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek/E339>

[28] Fosforečnany sodné: *E339* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW:  
<http://www.zakaznikum.cz/clanek/fosforecnany-sodne-e-339/233>

[29] Fosforečnany draselné: *E340* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW:  
<http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek/E340>

[30] Fosforečnany draselné: *E340* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW:  
<http://www.ceff.info/detail-ecka.html?eid=117>

[31] Fosforečnany hořečnaté: *E343* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW:  
<http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek/E343>

[32] Fosforečnany hořečnaté: *E343* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW:  
<http://www.bezkonzervantu.cz/ecka/e343-fosforecnany-horecnate/>

[33] Fosforečnany vápenaté: *E341* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW:  
<http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek/E341>

[34] Fosforečnany amonné: *E342* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW  
<http://www.dtest.cz/ecka/166/fosforecnany-amonne>

[35] FIALOVÁ L., VEJRAŽKA M. *Metabolismus vápníku a fosforu* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW:

[http://che1.lf1.cuni.cz/html/Kost-teorievseobecni0910%20\\_3\\_.pdf](http://che1.lf1.cuni.cz/html/Kost-teorievseobecni0910%20_3_.pdf)

[36] MAROUNEK M. *Význam kyseliny fytové ve výživě zvířat a lidí a důsledky její*

*přítomnosti v krmivech a potravinách* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW: <http://www.vuzv.cz/sites/File/vybor/studie%20marounek%202004.pdf>

[37] Fosfor: *Charakteristika a funkce fosforu* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW: <http://www.nexars.com/cs/fosfor.php>

[38] Fosfor a potraviny: *Biologický význam fosforu* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW: <http://www.prvky.com/fosfor-potraviny.html>

[39] BUŇKOVÁ, L., et al. *Effect of sodium phosphates on selected food grade bacteria. Potravinářstvo* [online]. 2011-04-01, vol. 5, issue 2, s. - [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.5219/141. Dostupné z WWW:

<http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/view/141>

[40] KNABEL, S., et al. *Inhibition of Aspergillus flavus and selected Gram-positive bacteria by chelation of essentials metal cationts by polyphosphates*. In *Journal of Food Protection*, vol. 54, 1991, p. 360-365.

[41] MAIER S., et al. *Longchain polyphosphate cause cell lysis and inhibits Bacillus cereus septum formation, which is depent on divalent cationts*. In *Applied and Enviromental Microbiology*, vol. 65, 1999, no. 9, p. 3942-3949.

[42] HUANG, K., et al. *Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bakteria*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, 105(49): 19282–19287

[43] Antibiotika ovlivňující syntézu buněčné stěny: *Buněčná stěna grampozitivního typu* [online].[cit.2014-05-13]. Dostupný z WWW: <http://mikrobiologie.xf.cz/files/atb-bunecna-stena.doc.html>

[44] POOL, R., *Advances in microbial physiology*, svazek 37, *Academic press limited*, London,1995, vol. 54

[45] SWOBODA, J., et al, *Wall Teichoic Acid Function, Biosynthesis and Inhibition*, *ChemBioChem* 2010, vol. 11, 35-45 s.

[46] *Struktura buněčné stěny grampozitivních bakterií* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW: [http://www.wikiskripta.eu/images/3/35/Gram\\_pozitivn%C3%AD.JPG](http://www.wikiskripta.eu/images/3/35/Gram_pozitivn%C3%AD.JPG)



- [47] VOTAVA, M., et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902-8966-5.
- [48] ŠILHÁNKOVÁ, L., *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Academia, 2008, 495 s. ISBN 978-802-0017-031
- [49] RYŠKOVÁ, O. *Základy lékařské mikrobiologie a imunologie: učební texty pro bakalářské studium*. Vydání 1. Karolinum, 2007, 130 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-802-4601-359
- [50] ZÁVADOVÁ, Milada. *Anaerobní bakterie a anaerobní infekce*. Vydání 1. Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1986, 212 s.
- [51] GÖRNER, F., et al. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. Vydání 1. Bratislava: Malé centrum, 2004, 234 s. ISBN 80-967-0649-7
- [52] *Clostridium botulinum: Morfológie buněk* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW:  
<http://coraxit.com/neogeek/image-clostridium-botulinumbacteria/#cite=74:1:Fkk,74:19:qrk>
- [53] *Enterococcus faecalis* na médiu Slanetz-Bartley [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW: <http://www.rapidmicrobiology.com/news/featured/testing-the-water-with-lab-m/>
- [54] JOHN, W., PATRICK, J. *Encyclopedia of dairy sciences*. Asterdam: Elsevier/Academic Press, 2011, 212 s. ISBN 978-012-3744- 074 (78-90)
- [55] BUŇKOVÁ, L. *Mikrobiologie potravin*. Přednáška. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, rok 2013
- [56] *Lactobacillus delbrueckii* a *Lb. casei* [online].[cit.2014-05-13].  
Dostupný z WWW: <http://bacterianamehere.pbworks.com/w/page/8382810/Classification>
- [57] Platné názvy bakterií [online].[cit.2014-05-13]. Dostupný z WWW: <http://www.bacterio.net/-allnamesdl.html>
- [58] PLOCKOVÁ, M. *Funkční vlastnosti bakterií mléčného kvašení*. *Chemické listy* 102, s. 658–666

- [59] TABASCO, R., et al. *Selective enumeration and identification of mixed cultures of S. thermophilus, Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus paracasei and Bifidobacterium lactis in fermented milk. International Dairy Journal 17: 1107-1114. 2007.*
- [60] Biolib: *Micrococcus luteus* [online].[cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id829389/>
- [61] OLEJNÍČKOVÁ, K. *Detekce faktorů virulence u bakterií rodu Pseudomonas* [online]. Brno, 2010 [cit. 2014-03-12]. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Ing. Veronika Holá, Ph.D.
- [62] VÁLKOVÁ, T. *Využití zástupců rodu Pseudomonas v biotechnologiích* [online]. Brno, 2005 [cit. 2014-03-12]. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Mgr. Monika Szostková, Ph.D.
- [63] VOTAVA, M., et al. *Lékařská mikrobiologie obecná: učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium. Vydání 2. Brno: Neptun, 2005, 192 s. ISBN 80-868-5000-5*
- [64] MESAROS, N., et al. *Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clinical Microbiology and Infection. 2007, vol. 13, issue 6, s. 560-578. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01681.x.*  
Dostupné z WWW: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-0691.2007.01681.x>
- [65] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot. Vydání 1. Brno: Masarykova univerzita, 270 s. ISBN 80-210-4207-9. (72)*
- [66] BUCHTA, V., et al. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty: učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium. Vydání 1. Olomouc: Karolinum, 1998, 192 s. ISBN 80-718-4565-5*
- [67] PODSTATOVÁ, H., et al. *Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena: učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium. Vydání 1. Olomouc: Epava, 2004, 283 s. ISBN 80-862-9707-1*
- [68] RYŠKOVÁ, O., et al. *Mikrobiologie: pro studující zubního lékařství. Vydání 1. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0834-0*

- [69] CHRISTENSEN, M., et al. *Identification of an antigenic marker of slime production for Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology*. 2009, vol. 58, no. 7, s. 855–862. DOI 10.1099
- [70] BUŇKOVÁ, L. *Obecná mikrobiologie. Praktika*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, rok 2009
- [71] Morfologie bakteriálních kolonií: *KTJ* [online]. [cit. 2014-05-13]. Dostupný z WWW: <http://web.natur.cuni.cz/filosof/serratia1.htm>
- [72] JURČOVÁ, D. *Vliv složení binárních směsí fosforečnanových solí na růst mikroorganismů v tavených sýrech* [online]. Zlín, 2011 [cit. 2014-03-12]. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D.
- [73] LORENCOVÁ, D. *Vliv fosforečnanů na růst vybraných potravinářsky významných bakterií* [online]. Zlín, 2010 [cit. 2014-03-12]. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D.
- [74] BUŇKA, L., et al. *Mlékárenské listy: Faktory ovlivňující mikroflóru tavených sýrů* [online]. [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.5219/141. Dostupné z WWW: [http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2010/121\\_s.\\_viii-xii.pdf](http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2010/121_s._viii-xii.pdf)

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BHT	Butylhydroxyanisol
BHA	Butylhydroxytoulén
CCFAC	Kodexový výbor pro potravinářská aditiva a kontaminanty
CFU	Kolonie tvořící jednotku (Colony forming unit)
E 338	Kyselina fosforečná
E 339	Fosforečnany sodné
E 340	Fosforečnany draselné
E 341	Fosforečnany vápenaté
E 342	Fosforečnany amonné
E 343	Fosforečnany hořečnaté
E 450	Difosforečnany
E 451	Trifosforečnany
E 452	Polyfosforečnany
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
IR	Index růstu
KTJ	Kolonie tvořící jednotku
MAL	Manitol-arabinóza-laktózový agar
MPA	Masopeptonový agar
MPB	Masopeptonový bujón
NAG	N-acetylglukósamín
NAM	Kyselina N-acetylmuramová
PG	Propylgalát
RCA	Kultivační půda pro identifikaci klostridií (Reiforced Clostridial agar)
XLD	Agar s xylózou, lysinem a deoxycholátem

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Tetraedrická struktura fosforečnanového iontu</i> .....	14
<i>Obr. 2. Struktura buněčné stěny grampozitivních bakterií</i> .....	27
<i>Obr. 3. Clostridium botulinum pod elektronovým mikroskopem – zvětšení x8000</i> .....	29
<i>Obr. 4. Enterococcus faecalis na médiu Slanetz-Bartley</i> .....	30
<i>Obr. 5. Lb. delbruecki a Lb.casei - morfologie buněk</i> .....	31
<i>Obr. 6. L. acidophilus, L. bulgaricus, L. casei, L. acidophilus a L. lactis – morfologie buněk</i> .....	33
<i>Obr. 7. Odečet bakteriálních kolonií (KTJ)</i> .....	39
<i>Obr. 8. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk Clostridium perfringens CAPM 5744</i> .....	51
<i>Obr. 9. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk Enterococcus faecalis CCM 4224</i> .....	52
<i>Obr. 10. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk Lactobacillus brevis DEPE T89</i> .....	53
<i>Obr. 11. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 141</i> .....	55
<i>Obr. 12. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk Lactococcus lactis subsp. cremoris CCDM 946</i> .....	56
<i>Obr. 13. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk Micrococcus luteus CCM 723</i> .....	57
<i>Obr. 14. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk Staphylococcus aureus subsp. aureus DEPE K38</i> .....	58
<i>Obr. 15. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk Staphylococcus epidermidis DEPE K42</i> .....	60
<i>Obr. 16. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk Salmonella Enteritidis CCM 4420</i> .....	61
<i>Obr. 17. Účinky vybraných fosforečnanů na růst buněk Pseudomonas aeruginosa CCM 3955</i> .....	63

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1. Obsah fosforu ve významných potravinách a potravinových surovin .....</i>	<i>17</i>
<i>Tab. 2. Seznam sloučenin fosforu používaných v ČR pro některé druhy potravin .....</i>	<i>18</i>
<i>Tab. 3. Nejvyšší povolené množství kyseliny fosforečné a fosforečnanů přidávaných do potraviny nebo skupin potravin .....</i>	<i>22</i>

## SEZNAM PŘÍLOH

PI Inhibiční účinky fosforečnanů na vybrané kmeny mikroorganismů

## PŘÍLOHA P I: INHIBIČNÍ ÚČINKY FOSFOREČNANŮ NA VYBRANÉ KMENY MIKROORGANIZMŮ

Příloha PI A: Vliv fosforečnanových solí na růst buněk *C. perfringens* CAMP 5744

Sledovaná sůl	Index růstu v %				
	0,25%	0,50%	0,75%	1%	2%
HEXA 62	87,3	95,1	29,5	15,1	8,40
HEXA 65	53,6	25,9	25,3	6,00	$4,80 \cdot 10^{-2}$
HEXA 68	$8,60 \cdot 10^{-2}$	$6,10 \cdot 10^{-1}$	$2,20 \cdot 10^{-2}$	$5,10 \cdot 10^{-3}$	$1,60 \cdot 10^{-3}$
HEXA 70	$8,80 \cdot 10^{-1}$	$3,10 \cdot 10^{-2}$	$1,20 \cdot 10^{-2}$	$7,10 \cdot 10^{-3}$	$1,30 \cdot 10^{-3}$
HEXA PE	$3,70 \cdot 10^{-1}$	$2,70 \cdot 10^{-1}$	$9,30 \cdot 10^{-3}$	$5,60 \cdot 10^{-3}$	$6,20 \cdot 10^{-3}$
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	48,2	51,2	68,6	84,3	78,9
PK	100				

\*PK – pozitivní kontrola

Příloha PI B: Vliv fosforečnanových solí na růst buněk *E. faecalis* CCM 4224

Sledovaná sůl	Index růstu v %				
	0,25%	0,50%	0,75%	1%	2%
HEXA 62	19,5	19,2	16,9	26,1	23,7
HEXA 65	16,6	37,8	43,6	34,7	39,3
HEXA 68	22,9	13,4	7,40	30,3	33,3
HEXA 70	9,90	15,1	21,7	18,8	35,1
HEXA PE	20,8	20,3	32,9	28,3	20,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	58,9	11,5	13,1	31,9	24,9
PK	100				

\*PK – pozitivní kontrola

Příloha PI C: Vliv fosforečnanových solí na růst buněk *L. brevis* DEPE T89

Sledovaná sůl	Index růstu v %				
	0,25%	0,50%	0,75%	1%	2%
HEXA 62	73,7	95,4	51,2	9,7	$1,00 \cdot 10^{-3}$
HEXA 65	66,8	45,6	57,6	46,1	$4,10 \cdot 10^{-3}$
HEXA 68	5,70	$1,90 \cdot 10^{-3}$	$2,90 \cdot 10^{-4}$	$1,30 \cdot 10^{-5}$	$1,30 \cdot 10^{-5}$
HEXA 70	11,5	$3,80 \cdot 10^{-3}$	$1,10 \cdot 10^{-3}$	$5,10 \cdot 10^{-4}$	$1,90 \cdot 10^{-4}$
HEXA PE	79,7	$5,20 \cdot 10^{-4}$	$5,90 \cdot 10^{-4}$	$4,10 \cdot 10^{-3}$	$9,60 \cdot 10^{-5}$
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	89,4	93,1	76,5	25,3	25,3
PK	100				

\*PK – pozitivní kontrola



Příloha PI D: Vliv fosforečnanových solí na růst buněk *L. lactis* CCDM141

Sledovaná sůl	Index růstu v %				
	0,25%	0,50%	0,75%	1%	2%
HEXA 62	78,7	37,1	47,8	75,3	78,1
HEXA 65	93,8	92,7	99,3	73,0	54,5
HEXA 68	88,2	58,9	24,7	6,20	16,3
HEXA 70	31,4	36,5	32,6	17,9	7,60
HEXA PE	53,9	43,8	31,5	58,4	5,60
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	58,4	42,1	39,3	41,0	66,3
PK	100				

\*PK – pozitivní kontrola

Příloha PI E: Vliv fosforečnanových solí na růst buněk *L. cremoris* CCDM 946

Sledovaná sůl	Index růstu v %				
	0,25%	0,50%	0,75%	1%	2%
HEXA 62	38,7	27,2	19,7	11,6	8,10
HEXA 65	40,5	10,4	38,7	35,8	38,1
HEXA 68	22,5	6,90	22,5	16,2	1,10
HEXA 70	15,0	53,2	20,2	25,4	2,60
HEXA PE	56,1	54,3	43,9	42,8	35,8
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	97,7	90,2	77,5	83,8	94,8
PK	100				

\*PK – pozitivní kontrola

Příloha PI G: Vliv fosforečnanových solí na růst buněk *M. luteus* CCM 732

Sledovaná sůl	Index růstu v %				
	0,25%	0,50%	0,75%	1%	2%
HEXA 62	$2,00 \cdot 10^{-1}$	$2,10 \cdot 10^{-1}$	99,3	$1,90 \cdot 10^{-1}$	$6,50 \cdot 10^{-2}$
HEXA 65	$1,70 \cdot 10^{-1}$	$7,20 \cdot 10^{-2}$	89,3	$2,50 \cdot 10^{-1}$	$8,30 \cdot 10^{-2}$
HEXA 68	$1,90 \cdot 10^{-1}$	$7,60 \cdot 10^{-2}$	69,3	$6,60 \cdot 10^{-2}$	$5,60 \cdot 10^{-3}$
HEXA 70	$7,90 \cdot 10^{-2}$	$1,70 \cdot 10^{-1}$	97,4	$6,20 \cdot 10^{-2}$	$6,70 \cdot 10^{-3}$
HEXA PE	$1,50 \cdot 10^{-1}$	24,5	63,3	$6,30 \cdot 10^{-2}$	$1,30 \cdot 10^{-2}$
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	19,3	59,1	16,83	6,10	17,3
PK	100				

\*PK – pozitivní kontrola

Příloha PI H: Vliv fosforečnanových solí na růst buněk *S. aureus* DEPE K38

Sledovaná sůl	Index růstu v %				
	0,25%	0,50%	0,75%	1%	2%
HEXA 62	$1,70 \cdot 10^{-1}$	$1,30 \cdot 10^{-1}$	$1,50 \cdot 10^{-1}$	$8,50 \cdot 10^{-2}$	$7,50 \cdot 10^{-2}$
HEXA 65	$3,10 \cdot 10^{-1}$	$3,10 \cdot 10^{-1}$	$3,10 \cdot 10^{-1}$	$2,60 \cdot 10^{-1}$	$1,60 \cdot 10^{-1}$
HEXA 68	$6,60 \cdot 10^{-1}$	$6,10 \cdot 10^{-1}$	$3,10 \cdot 10^{-1}$	$1,10 \cdot 10^{-1}$	$1,20 \cdot 10^{-1}$
HEXA 70	$2,50 \cdot 10^{-1}$	1,60	$1,50 \cdot 10^{-1}$	$9,10 \cdot 10^{-2}$	$8,60 \cdot 10^{-2}$
HEXA PE	$4,10 \cdot 10^{-1}$	$3,00 \cdot 10^{-1}$	$3,20 \cdot 10^{-1}$	$3,50 \cdot 10^{-1}$	$2,70 \cdot 10^{-1}$
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	66,6	50,0	66,7	66,7	33,3
PK	100				

\*PK – pozitivní kontrola

Příloha PI I: Vliv fosforečnanových solí na růst buněk *S. epidermidis* DEPE K42

Sledovaná sůl	Index růstu v %				
	0,25%	0,50%	0,75%	1%	2%
HEXA 62	$3,60 \cdot 10^{-1}$	$7,50 \cdot 10^{-2}$	$5,60 \cdot 10^{-2}$	$9,50 \cdot 10^{-2}$	$7,10 \cdot 10^{-2}$
HEXA 65	$4,30 \cdot 10^{-1}$	$2,90 \cdot 10^{-1}$	$1,10 \cdot 10^{-1}$	$6,30 \cdot 10^{-2}$	$6,30 \cdot 10^{-2}$
HEXA 68	$3,50 \cdot 10^{-1}$	$2,10 \cdot 10^{-1}$	$9,70 \cdot 10^{-2}$	$9,20 \cdot 10^{-2}$	$9,70 \cdot 10^{-3}$
HEXA 70	2,50	2,40	1,80	1,30	1,20
HEXA PE	9,50	7,20	$2,40 \cdot 10^{-1}$	$1,10 \cdot 10^{-1}$	$8,20 \cdot 10^{-1}$
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	22,2	57,2	4,80	2,10	$6,80 \cdot 10^{-1}$
PK	100				

\*PK – pozitivní kontrola

Příloha PI J: Vliv fosforečnanových solí na růst buněk *P. aeruginosa* CCM 3955

Sledovaná sůl	Index růstu v %				
	0,25%	0,50%	0,75%	1%	2%
HEXA 62	73,8	30,3	55,9	7,20	70,8
HEXA 65	34,9	39,5	22,6	54,4	21,5
HEXA 68	45,1	76,9	6,20	22,6	19,5
HEXA 70	87,2	61,0	40,5	12,8	6,70
HEXA PE	45,1	44,1	11,3	12,3	9,20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,70	9,20	3,10	10,8	2,60
PK	100				

\*PK – pozitivní kontrola

Příloha PI K: Vliv fosforečnanových solí na růst buněk *S. Enteritidis* CCM 4420

Sledovaná sůl	Index růstu v %				
	0,25%	0,50%	0,75%	1%	2%
HEXA 62	44,4	44,4	101,3	54,2	69,4
HEXA 65	77,8	45,8	90,2	75,0	34,7
HEXA 68	99,8	18,1	50,0	48,6	50,0
HEXA 70	29,2	76,4	36,1	84,7	45,8
HEXA PE	88,9	38,9	51,4	38,9	87,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	75,0	48,6	61,1	30,6	68,1
PK	100				

*\*PK – pozitivní kontrola*