

Porovnání účinku fosforečnanů v různém kondenzačním stupni na růst vybraných mikroorganismů

Bc. Zuzana Pospíšilová

Diplomová práce
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

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

Téma práce: **Porovnání účinku fosforečnanů v různém kondenzačním stupni na růst vybraných mikroorganismů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- Zaměřte se na obecnou charakteristiku fosforečnanů a jejich využití v potravinářství.
- Popište potravinářsky významné skupiny mikroorganismů a inhibiční účinky fosfátových solí na jejich růst.

II. Praktická část

- Stanovte inhibiční účinky tří druhů komerčně využívaných polyfosfátů lišících se délkou řetězce (HBS, S9 a 690) a koncentrací na vybrané skupiny gram pozitivních a gram negativních bakterií.
- Výsledky statisticky vyhodnoťte.
- Formulujte závěry o inhibičním působení fosforečnanů na testované bakterie a zhodnoťte jejich využitelnost v potravinářství.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] Molins, R.A. Phosphates in Foods. CRC Press, 1991. 272 p.

[2] Deman J.M. Principles of Food Chemistry. Springer, 1995. 530 p.

[3] Šilhánková, L. Mikrobiologické zkoumání potravin, Praha 1987.

[4] Šilhánková, L. Mikrobiologie pro potravináře, Praha 1983.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

9. února 2009

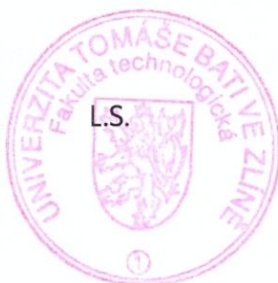
Termín odevzdání diplomové práce:

31. května 2009

Ve Zlíně dne 31. května 2009



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Fosforečnany jsou látky běžně využívané v potravinářském průmyslu. V této práci byl sledován účinek tří komerčně využívaných fosforečnanů lišících se délkou řetězce (HBS, S9 a 690) na 8 vybraných grampozitivních a 7 gramnegativních bakterií. Každá z fosforečnanových solí byla testována v sedmi koncentracích (0,1 – 1% w/v). Účinky fosforečnanů na růst mikroorganismů byly sledovány měřením optické hustoty buněk při 600 nm. Bylo zjištěno, že inhibiční účinky fosforečnanů se zvyšují s délkou řetězce. Na růst grampozitivních bakterií měla největší inhibiční vliv HBS, menší S9 a zanedbatelný účinek měla 690. U gramnegativních bakterií byl zjištěn antimikrobiální účinek až u dvou nevyšších testovaných koncentrací a to převážně pouze u HBS.

Klíčová slova: polyfosforečnany, antimikrobiální účinky, mikroorganismus

ABSTRACT

Abstrakt ve světovém jazyce

Phosphates are substances commonly used in food processing industry. This work monitored effect of three commercially used phosphates which differ in chain length (HBS, S9 and 690) on 8 selected gram-positive and 7 gram-negative bacteria. Each of the phosphoric salts was tested in seven concentrations (0.1 – 1% w/v). Effects of phosphates on growth of micro-organisms were monitored by admeasure of cell optical density at 600 nm. It was discovered that inhibitory effects of phosphates increase with chain length. HBS had the highest inhibitory effect on gram-positive bacteria, S9 had smaller and 690 had minor effect. In case of gram-negative bacteria, antimicrobial effect was detected only at two highest concentrations tested and that was predominately only at HBS.

Keywords: polyphosphates, antimicrobial effects, microorganisms

Děkuji RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při realizaci mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Františkovi Buňkovi, Ph.D. za pomoc a odborné rady při statistickém vyhodnocování výsledků praktické části.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské/diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem citoval(a). V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uveden(a) jako spoluautor(ka).

Ve Zlíně

.....

Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD.....	8
I TEORETICKÁ ČÁST.....	9
1 FOSFOREČNANY.....	10
1.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA FOSFOREČNANŮ.....	10
1.2 VÝZNAM FOSFOREČNANŮ V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	11
1.2.1 Využití fosforečnanů v masném průmyslu.....	12
1.2.2 Využití fosforečnanů při výrobě tavených sýrů.....	12
1.3 ANTIMIKROBIÁLNÍ VLASTNOSTI FOSFOREČNANŮ.....	13
2 CHARAKTERISTIKA MIKROORGANIZMŮ A VLIV FOSFOREČNANŮ NA JEJICH RŮST.....	16
2.1 PLÍSNĚ.....	16
2.1.1 Inhibiční účinek fosforečnanů na plísně izolované z potravin.....	17
2.2 ROD <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	18
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.2.2 Antimikrobiální působení fosforečnanů na <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.3 ROD <i>LISTERIA</i>	20
2.3.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	20
2.3.2 Inhibice růstu <i>Listeria monocytogenes</i> fosforečnany.....	21
2.4 ROD <i>CLOSTRIDIUM</i>	22
2.4.1 <i>Clostridium perfringens</i>	23
2.4.2 Inhibiční účinky fosforečnanů na růst <i>Clostridium perfringens</i>	23
2.4.3 <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	25
2.4.4 Inhibice růstu <i>Clostridium tyrobutyricum</i> fosforečnany.....	25
2.5 ROD <i>BACILLUS</i>	26
2.5.1 <i>Bacillus cereus</i>	26
2.5.2 Inhibiční účinky fosforečnanů na růst <i>Bacillus cereus</i>	27
2.6 ROD <i>PSEUDOMONAS</i>	28
2.6.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
2.6.2 Inhibice bakterií rodu <i>Pseudomonas</i> fosforečnany.....	30
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	31
3 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	32
4 PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY.....	33
5 KULTIVAČNÍ PŮDY.....	34
5.1 MASOPEPTONOVÝ AGAR – (MPA).....	34
5.2 MASOPEPTONOVÝ BUJÓN – (MPB).....	34
6 ROZTOKY A OSTATNÍ CHEMIKÁLIE.....	35
6.1 FYZIOLOGICKÝ ROZTOK.....	35
6.2 FOSFOREČNANY.....	35
7 MIKROORGANIZMY.....	36
8 POUŽITÉ METODY.....	37

8.1	PŘÍPRAVA SUSPENZE BAKTERIÍ.....	37
8.2	SLEDOVÁNÍ ÚČINKU FOSFOREČNANOVÝCH SOLÍ NA VYBRANÉ BAKTERIE.....	37
9	VÝSLEDKY A DISKUZE	39
9.1	ÚČINKY FOSFOREČNANŮ NA RŮST VYBRANÝCH BAKTERIÍ	39
9.1.1	Vliv fosforečnanů na růst <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732 a <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953	39
9.1.2	Vliv fosforečnanů na růst bakterií rodu <i>Enterococcus</i>	45
9.1.3	Vliv fosforečnanů na růst bakterií rodu <i>Bacillus</i>	51
9.1.4	Vliv fosforečnanů na růst gramnegativních bakterií	58
	ZÁVĚR	69
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	70
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	74
	SEZNAM OBRÁZKŮ	75
	SEZNAM PŘÍLOH.....	77

ÚVOD

Mikrobiální kažení potravin je soubor několika souběžných pochodů, při nichž dochází téměř vždy (s výjimkou žádoucích změn) k tvorbě zapáchajících, nepříjemně chutnajících a i zdraví škodlivých látek, které činí potravinu nepoživatelnou. Onemocnění způsobená potravinami jsou v současné době jedním z nejrozšířenějších zdravotních problémů. Jako ochrana před účinkem mikroorganismů, které způsobují kažení a otravy z potravin, se přidávají různá potravinářská aditiva [1].

Anorganické polyfosforečnany jsou všeobecně považovány za bezpečné a jsou široce využívané jako přídatné látky v potravinářském průmyslu, zejména v masné a mléčné výrobě. Využívá se zejména jejich emulgačních vlastností, schopnosti chránit vůni a zvyšovat výnosy díky tomu, že dokáží vázat vodu [2, 3].

Kromě těchto vlastností vykazují fosforečnany ještě jisté bakteristatické účinky. Princip antimikrobiálního účinku fosforečnanů spočívá v chelataci dvojmocných iontů, které jsou obsaženy v buněčných stěnách a jsou pro mikroorganismy esenciální k udržení integrity buněčné stěny.

Polyfosforečnany nejsou využívány čistě jako inhibitory mikroorganismů, kdyby se však zjistilo více informací o jejich inhibičních vlastnostech, mohlo by to vést k nárůstu jejich využití v potravinářském průmyslu.

Předmětem této studie je sledovat inhibiční účinky fosforečnanů s různou délkou řetězce na růst vybraných mikroorganismů a tyto výsledky statisticky vyhodnotit.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 FOSFOREČNANY

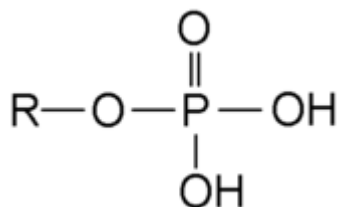
1.1 Obecná charakteristika fosforečnanů

Fosforečnany jsou soli kyseliny fosforečné (H_3PO_4), které vzniknou odtržením všech tří kyselých vodíků a jejich nahrazením některým kovem, např. sodíkem. Tvoří tedy skupinu sloučenin, pro něž je společné to, že obsahují anion $(\text{PO}_4)^{3-}$ [4, 5, 6, 7].

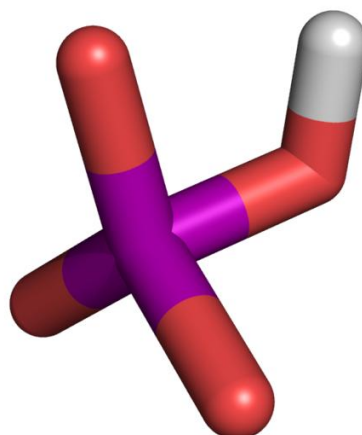
Fosfátový iont má tetraedrickou strukturu (grupa symetrie T_d), okolo atomu fosforu jsou čtyři identické atomy kyslíku. Náboj iontu je $3-$, jeho konjugovanými bázemi jsou HPO_4^{2-} (hydrogenfosforečnan) a H_2PO_4^- (dihydrogenfosforečnan). Dihydrogenfosforečnan je konjugovanou bází kyseliny fosforečné [8].

Soli kyseliny fosforečné obsahující jednu skupinu $(\text{PO}_4)^{3-}$, se označují jako orthofosforečnany. Za podmínek vysoké teploty může dojít ke ztrátě vody dvěma sousedními hydroxylovými skupinami dvou různých orthofosforečnanů a k jejich kondenzaci. Ze dvou monomerů vzniká dimer nazývaný pyrofosforečnan. Kromě samotných orthofosforečnanů se mohou polymerací účastnit i delší řetězce fosforečnanů, čímž vznikají polymery s více jak 2 fosfory v molekule (tzv. polyfosforečnany). Protože každá $(\text{PO}_4)^{3-}$ skupina může sdílet až tři své atomy kyslíku se třemi jinými $(\text{PO}_4)^{3-}$ skupinami, může docházet nejen ke vzniku lineárních řetězců polyfosforečnanů, ale i k tvorbě třídimenziálních struktur (tzv. ultrafosforečnanů) anebo uzavřených cyklů (tzv. metafosforečnanů). Fosforečnany běžně existují ve vyšším polymeračním stupni ($n = 20$ až 500). [6, 9].

Fosforečnany alkalických kovů jsou většinou ve vodě rozpustné a připravují se neutralizací kyseliny fosforečné, málo rozpustné fosforečnany srážením [6].



Obr. 1. Struktura fosfátové skupiny [8]



Obr. 2. Anorganický hydrogenfosfát HPO_4^{2-} ; barevné značení: P (fialová); O (červená); H (bílá) [8]

Fosforečnany mají charakter skel, jsou však ve vodě rozpustné a vysokomolekulární polymerní anionty jsou schopné poutat chelátovou vazbou kationty některých kovů. Vznikající sloučeniny mají koloidní povahu. Proto se polymerní fosforečnany používají při úpravě vody (k jejímu změkčování), k rozpuštění kotelního kamene, korozních úsad apod. [9].

Fosforečnany jsou velmi důležitá průmyslová hnojiva, zejména rozpustné fosforečnany. Příprava některých fosforečnanových hnojiv spočívá v převedení nerozpustných fosforečnanů (jaké se těží z přírodních zdrojů) na fosforečnany rozpustnější [9].

1.2 Význam fosforečnanů v potravinářství

Fosforečnany v potravinách ovlivňují vlastnosti bílkovin a polysacharidů. Uplatňují svůj vliv prostřednictvím reakcí, při nichž se naváží na bílkoviny, a tak změní jejich vlastnosti (například schopnost vazby vody, tvorby gelu, apod.) [6, 10].

Fosforečnany jsou jako přídatné látky hojně využívány v potravinářském průmyslu (hlavně v masné a mléčné výrobě), díky svým emulgačním vlastnostem, schopnostem chránit vůni a zvyšovat výnosy pro svou schopnost vázat vodu. Všeobecně jsou uznávány za bezpečné a v masném průmyslu jsou využívány pro zlepšení čtyř hlavních funkčních vlastností: zvýšení schopnosti vázat vodu v mase, zvýšení emulgace, zpomalení oxidačního žluknutí a zhoršení barvy a zlepšení vývoje konzervace barvivy [2].

1.2.1 Využití fosforečnanů v masném průmyslu

Fosforečnany (E 338 až E341 a E 450 až 452) jsou v současné době povolené pro všechny masné výrobky (ve formě solí kyseliny fosforečné v maximálním množství 5 g/kg, vyjádřené jako P_2O_5) [11, 12].

Účinek působení fosforečnanů v masných výrobcích závisí na délce bílkovinného řetězce, hodnotě pH a vazbě kladných iontů. Po porážce se hydratační kapacita masa snižuje, což je výsledkem štěpení adenosintrifosfátu (ATP). Fosforečnany jsou používány společně s chloridem sodným k obnovení přirozené hydratační kapacity [12].

Fosforečnany mohou vést k pozitivnímu účinku nejen ve výrobě opracovaných masných výrobků, ale také ve výrobě zvláštních konzervovaných výrobků vyrobených z vařeného masa. Dávkování fosforečnanů je pro různé masné výrobky rozdílné. Maximum povoleného množství však není možné v praxi překročit. Pozitivní výsledky přineslo i malé dávkování fosforečnanů, které je vhodné i při použití pro PSE (bledé, měkké, vodnaté) maso, kde hodnota pH nemá významný vliv na kvalitu připravovaných masných výrobků [11].

Přidávání fosforečnanů v masném průmyslu umožňuje zlepšit vaznost a emulgační schopnosti masa. Polyfosforečnany se během zpracování a skladování masných výrobků hydrolyzují na neškodný orthofosforečnan [13].

Fosforečnan může být také použit k úpravě přirozených povrchů masných výrobků a jako náhražka za citrát k ochraně před krevními sraženinami. Fosforečnan může být dávkován v nižším množství než citrát. Kromě toho ještě může fosforečnan zvyšovat stabilitu tepelně neopracovaných masných výrobků, které mají sklon k oxidaci. Navíc fosforečnany mají určitý bakteristatický účinek. Běžné dávkování pro masné výrobky je ale bohužel nedostatečné k získání bakteristatického efektu [11, 12].

1.2.2 Využití fosforečnanů při výrobě tavených sýrů

Základní surovinou pro výrobu tavených sýrů jsou sýry přírodní. Dále lze do jejich surovinné skladby použít řadu potravin mléčného (např. máslo, smetanu, tvaroh, sušené odstředěné mléko, sušenou syrovátku aj.) i nemléčného (např. vodu, přísady ovlivňující chuť a barvu – masové složky, zeleninu, houby aj.) původu [6].

Při výrobě tavených sýrů se používá záhřev surovinové směsi na 90-100 °C. Pokud by se surovinová skladba tímto způsobem zahřála, došlo by pravděpodobně k destrukci membrán

pokrývajících tukové kuličky, které by se spojovaly do větších formací a docházelo by k agregaci („smršťování“) přítomných bílkovin. Následkem těchto procesů dochází k oddělování tuku, vody a bílkovin a celé dílo by mělo značně nehomogenní povahu [6].

Pro výrobu homogenního výrobku je třeba, aby v systému byly přítomny látky s emulgující schopností. Emulgační schopnost mají například kaseinové frakce (bílkoviny). Tyto frakce se nacházejí především v přírodních sýrech, kde je však jejich emulgující schopnost potlačena díky navázanému vápníku. Odštěpení vápníku lze dosáhnout přidáním tzv. tavicích solí, které jsou schopny „vytrhnout“ vápenaté ionty (Ca^{2+}) z bílkovinné matrice a „vyměnit“ je za ionty sodné (Na^+) [6].

Jako tavicí soli se používají soli s vícesytnými anionty (především fosforečnany, jejich polymery a citrany) a monovalentními alkalickými kovy (zejména sodíkem). Z hlediska funkčních vlastností by bylo možné používat i draselné soli fosforečnanů. Ve výrobě tavených sýrů se však draselné soli obvykle nepoužívají, neboť mohou ve finálním výrobku způsobit hořkou příchuť. Existují rovněž zmínky o možnosti použití sodno-hliníkových fosforečnanů [6].

1.3 Antimikrobiální vlastnosti fosforečnanů

Fosforečnany mají schopnost vázat vápenaté ionty, což má význam i z hlediska antimikrobiálních vlastností. Předpokládá se, že vápenaté ionty stabilizují buněčnou stěnu mikroorganismů a jejich chelatace může destabilizovat tuto strukturu a tím ovlivnit vitalitu mikroorganismů. Nicméně nejsou využívány výslovně jako inhibitory mikroorganismů. Více informací o bakteristické aktivitě fosforečnanů by mohlo vést k nárůstu jejich využití v potravinářském průmyslu. Inhibice bakteriálního růstu vyvolaná fosforečnany byla předmětem mnoha výzkumů a obecně se dá tvrdit, že grampozitivní bakterie jsou k účinku fosforečnanů více citlivé než gramnegativní bakterie [2, 3].

Buněčná stěna grampozitivních bakterií

Buněčná stěna grampozitivních bakterií je poměrně silná (asi 20 nm) a je tvořena silnou vrstvou peptidoglykanu, kterou pronikají lineární řetězce teikoových kyselin spojené s cytoplazmatickou membránou. Jejich funkce není dosud jasná, nepodílejí se na pevnosti buněčné stěny. Jejich úlohou je zřejmě vazba kationtů, zejména dvojmocných (Ca^{2+} , Mg^{2+}), které jsou nepostradatelné pro integritu stěny i membrány. Jsou také hlavním

povrchovým antigenem grampozitivních bakterií. Kromě teikoové kyseliny jsou na peptidoglykan grampozitivních bakterií vázány také polysacharidy složené z glukózy, galaktózy, manózy, popř. i dalších polysacharidů. Jsou také hlavním povrchovým antigenem grampozitivních bakterií. Buněčná stěna grampozitivních bakterií neobsahuje lipidy s výjimkou mykobakterií, korynebakterií a nokardií [14].

Buněčná stěna gramnegativních bakterií

Buněčná stěna gramnegativních bakterií je tenčí (asi 10 nm), ale podstatně složitější než stěna grampozitivních bakterií. Je tvořena tenkou vrstvou peptidoglykanu, nad níž je vnější membrána. Skládá se z dvojvrstvy fosfolipidů a bílkovin. Vnější membrána je spojena s peptidoglykanem molekulami lipoproteinů, na povrchu vnější membrány jsou lokalizovány lipopolysacharidy udávající buňce antigenní vlastnosti. Mezi vnější membránou a peptidoglykanem je tzv. periplazmatický prostor. Proteiny vnější membrány jsou odlišné od proteinů cytoplazmatické membrány. Je tu několik druhů hlavních proteinů a několik druhů proteinů minoritních, významné jsou tzv. poriny. Na vnější straně membrány je vázán lipopolysacharid, jehož polysacharidová část ční nad povrch buňky a je zodpovědná za antigenní vlastnosti gramnegativních bakterií. Obsah lipidů ve stěně gramnegativních bakterií je příčinou jejich zvýšené odolnosti k aniontovým povrchově aktivním látkám. (např. mýdla, žlučové kyseliny) [14].

Mechanismus působení polyfosforečnanů, které způsobují inhibici růstu a rozklad buněk, spočívá v izolaci kationtů polyfosforečnanem. Polyfosforečnanové molekuly jsou polyanionové makromolekuly a mají vlastnosti chelatačních činidel. Byl tedy učiněn návrh, že by fosforečnany mohly působit společně s dvojmocnými kationty (zejména vápenatými a hořečnatými) lokalizovanými na buněčném povrchu a bránit jejich přístupu k buňce. Tyto ionty se mimo jiné podílejí na udržení integrity buněčné stěny grampozitivních bakterií, při jejich nedostatku může dojít k porušení soudržnosti buněčné stěny grampozitivních bakterií. Přidáním určitých vícemocných kovových iontů jako Mg^{2+} , Ca^{2+} a Fe^{2+} se mohou odvrátit inhibiční účinky polyfosforečnanů na mikroorganismy. To dokazuje, že funkce fosforečnanů souvisí s kovovými ionty, které jsou nezbytné pro život buněk a mohou být zodpovědné za bakteristatickou aktivitu. Fosforečnany s dlouhými řetězci vykazují vyšší inhibiční účinky na růst bakterií než fosforečnany s kratšími řetězci, možná protože se schopnost chelatovat kationty zvyšuje s délkou řetězce. Na inhibiční

působení fosforečnanů má vliv také např. teplota a pH prostředí (vyšší citlivost mikroorganismů vůči fosforečnanům byla zaznamenána při vyšším pH) a počáteční počty mikroorganismů [2, 6].

2 CHARAKTERISTIKA MIKROORGANISMŮ A VLIV FOSFOREČNANŮ NA JEJICH RŮST

V této kapitole jsou popsány vlastnosti potravinářsky významných mikroorganismů, které se mohou množit v potravinách a způsobovat jejich kažení nebo otravy z potravin. Dále je zde charakterizován inhibiční účinek fosforečnanů na růst těchto mikroorganismů.

2.1 Plísně

Plísněmi běžně rozumíme mikroskopické mikroorganismy, které vytvářejí jemné vláknité povlaky na různých substrátech. Plísně náleží botanicky mezi houby [15].

Plísně jsou velmi rozšířeny v přírodě (na měkkém ovoci, v květních nektarech, na povrchu hmyzu, v exudátech stromů, v půdě i v potravinářských provozech), a proto se vyskytují jako častá vzdušná kontaminace. K jejich nežádoucímu pomnožení dochází nejčastěji v kyselých substrátech, kde je pro nízké pH omezen rozvoj většiny bakterií [16].

Plísně jsou aerobní povahy a jsou velmi nenáročné, pokud jde o živiny. Mohou proto napadat nejrůznější materiál uchovaný ve vlhku (sušené ovoce a zelenina, obilí, mouka, těstoviny, sušené mléčné výrobky, papír, dřevo, kůže, stěny provozoven). Většinou jsou schopny se rozmnožovat již při nižším obsahu vody, kdy rozvoj bakterií a kvasinek ještě není možný. Mohou prorůstat i neporušenými buňkami rostlinných pletiv (ovoce, zelenina) [16].

Mezi plísně zahrnujeme fykomycety (pravé plísně) s rody *Absidia*, *Mucor* a *Rhizopus*, vřeckaté houby (mj. s rody *Byssochlamys* a *Neurospora*) a *Fungi imperfecti* (houby nedokonalé) s rody *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Sporotrichum*, *Stachobotrys*, *Trichothecium* a další. Plísně jsou většinou saprofytické, mohou být užitečné (produkují-li antibiotika, organické kyseliny, příp. enzymy v průmyslovém měřítku) nebo škodlivé (působící mykózy lidí i zvířat, tvořící mykotoxiny, rozkládající potraviny a krmivo, kazící dřevo, kůži, papír, textilie aj.) [17].

Obr. 3. *Penicillium* [18]

2.1.1 Inhibiční účinek fosforečnanů na plísně izolované z potravin

Je známo jen velmi málo o inhibičním účinku fosforečnanů na růst plísní, přestože existují důkazy o tom, že fosforečnany mohou zasahovat do určitých kroků metabolismu plísní, jako jsou diferenciace buněk, sporulace a produkce toxinů a antibiotik. Plísně jsou nežádoucí kontaminací v potravinářském průmyslu, ovlivňují suroviny a zpracování potravin. Potravinářské suroviny a produkty mohou být kontaminovány sporama nebo konidiiemi a myceliárními fragmenty z prostředí. Kontaminace se může vyskytovat v různých stupních výroby, ale k růstu plísní dojde jen za příznivých podmínek, které se mění v závislosti na druhu plísně [2].

Rezistence plísní k účinku fosforečnanů závisí na druhu plísně. V neutrálním nebo alkalickém pH jsou *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus* a *Fusarium proliferatum* odolné vůči všem fosforečnanům a vůči všem jejich koncentracím, zatímco nejvíce citlivé jsou *Byssoschlamys nivea*, *Aureobasidium pullulans*, a *Penicillium glabrum* [2, 19].

Výsledky ukazují, že inhibiční aktivita fosforečnanů na plísně při pH 7 může přímo souviset s délkou řetězce fosforečnanů [2, 19]. Největší inhibiční účinky vykazovaly fosforečnany, které měly řetězec tvořený více než 15 fosforečnanovými jednotkami. Tyto látky byly schopné bránit růstu 76,4% až 88,2% plísní při koncentraci 1%. Jiné fosforečnany o této koncentraci potlačují růst jen 29,4% až 52,9% plísní. Všechny plísně

byly inhibovány fosforečnanů s více než 15 fosforečnanovými jednotkami v řetězci o koncentraci 1,5%, ale žádné inhibiční účinky nebyly zjištěny při koncentracích nižších než 0,5% u fosforečnanů TAS (trifosforečnan sodný), PAS (kyselý pyrofosforečnan sodný), TRI (tripolyfosforečnan sodný) a N (neutrální pyrofosfosforečnan sodný) [2].

V neutrálním pH došlo k radikální změně inhibiční aktivity fosforečnanů s výjimkou fosforečnanů s 15 jednotkami v řetězci, jejichž roztoky měly hodnoty pH blízké neutrálním. Nejvyšší sílu chelátovat ionty (gCa/100g) měly dle zkoušek fosforečnanů s 15 jednotkami v řetězci a měly stejnou hodnotu v neutrálním i přirozeném pH [2].

Výsledky studií naznačují, že některé fosforečnanů mohou být použity v potravinářském průmyslu k inhibici plísní, které jsou spojovány s vadami potravin, v koncentracích stejných nebo nižších, než je tomu u těch fosforečnanů, které jsou používány jako přísady [2].

2.2 Rod *Staphylococcus*

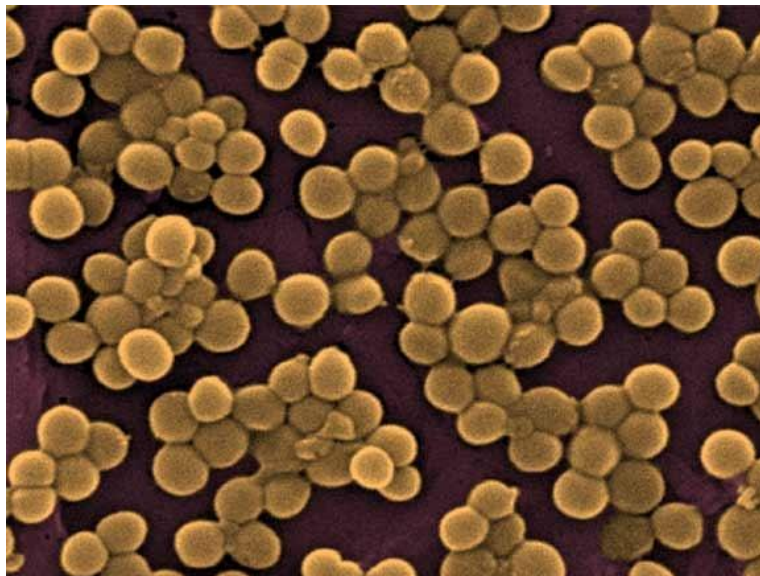
Rod *Staphylococcus* tvoří žluté až oranžové kolonie, některé kmeny však tvoří i kolonie bílé. Jedná se o grampozitivní, nepohyblivé, nesporeující, fakultativně anaerobní mikroorganismy. Vyskytují se jednotlivě, po dvou a v nepravidelných shlucích, občas v tetrádách. Optimální růstová teplota je 30 až 37 °C. Stafylokoky patří mezi všudypřítomné bakterie. Nejčastěji se vyskytují na kůži a mukózních membránách teplokrevných zvířat a člověka (např. v nosní dutině). Dále jsou často izolovány z různých potravin živočišného původu (maso, mléko, sýr) a z nejrůznějších zdrojů v prostředí, jako je půda, voda, písek a prach. Rozmnožují se i za 10% koncentrace chloridu sodného a jsou hostitelem řady bakteriofágů. [20, 21, 22].

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus tvoří grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporeující koky, jež vytvářejí typické polokulovité, zlatě žluté kolonie. Rozmnožuje se v rozmezí teplot 7 – 45,5 °C a toxiny produkuje během rozmnožování nebo krátce po něm. Zkvašuje řadu cukrů (včetně mannitolu) za tvorby kyselin. Je schopen se rozmnožovat v přítomnosti 10% NaCl, čehož se tak často využívá při jeho zjišťování [16].

Pomnožení druhu *Staphylococcus aureus* v potravinách představuje nebezpečí otrav, jež ve vážných případech bývají i smrtelné. Příčinou otrav jsou tzv. enterotoxiny polypeptidové povahy, produkované některými kmeny tohoto druhu. Dosud bylo

izolováno pět typů (A až E) těchto toxinů, jež jsou antigenně odlišné, takže je možno je identifikovat sérologicky [16].



Obr. 4. *Staphylococcus aureus* [23]

2.2.2 Antimikrobiální působení fosforečnanů na *Staphylococcus aureus*

Výsledky studií ukázaly, že antimikrobiální účinky polyfosforečnanů s dlouhými řetězci (polyfosforečnan sodný glassy [SPG] a ultrafosforečnan sodný [UP]) na *Staphylococcus aureus* ISP40 8325 mohou být připsány poškození obalu (buněčné stěny nebo buněčné membrány). Baktericidní a bakteristatické účinky polyfosforečnanů na *Staphylococcus aureus* dokáží odvrátit Ca^{2+} nebo Mg^{2+} [3, 24].

Poškození bakterií polyfosforečnany bylo významně větší při pH 8 než při pH 6. Tyto hodnoty pH ovlivnily to, že kovový iont byl chelatací zapojen do antibakteriálního mechanismu. Dlouhé řetězce polyfosforečnanů zreagovaly s buněčnými stěnami *S. aureus* mechanismem chelatace kovových iontů. Kovové ionty jsou potřebné pro integritu bakteriálních buněčných stěn a pro upevnění jejich povrchových vrstev. Polyfosforečnany chelatují strukturálně esenciální kovy (Ca^{2+} a Mg^{2+}) obsažené v buněčné stěně, což má za následek baktericidní a bakteriolytický efekt [3, 24].

Minimální inhibiční koncentrace vybraného potravinářského fosforečnanu přidaného v časně exponenciální fázi buněk *Staphylococcus aureus* ISP40 8325 v syntetickém médiu byla určena 0,1% pro ultrafosforečnan sodný a polyfosforečnan sodný a kyselý

pyrofosforečnan sodný, tripolyfosforečnan a pyrofosforečnan tetrasodný. Hodnoty minimální inhibiční koncentrace pro fosforečnany s dlouhým řetězcem byly nižší než hodnoty minimální inhibiční koncentrace fosforečnanů s kratší délkou řetězce [3, 24].

Růst bakterií byl mírně stimulován 0,05% SPG, ale vyššími koncentracemi byl růst inhibován. Baktericidní účinky byly pozorovány v přítomnosti 0,1% SPG po dvou hodinách inkubace a v přítomnosti 0,5% SPG po jedné hodině inkubace. Počty bakterií po ošetření 0,1 a 0,5% SPG byly významně nižší ($P < 0,05$) než ty u kontroly po dvou hodinách inkubace [3, 24].

Při zvýšení koncentrace UP došlo ke snížení bakteriálního růstu. Baktericidní účinek byl pozorován v přítomnosti 0,1% UP po dvou hodinách inkubace a v přítomnosti 0,2% UP po jedné hodině inkubace. Počty bakterií při ošetření jak 0,1% tak 0,2% UP byly významně ($P < 0,05$) nižší než ty u kontroly po jedné hodině inkubace [3, 24].

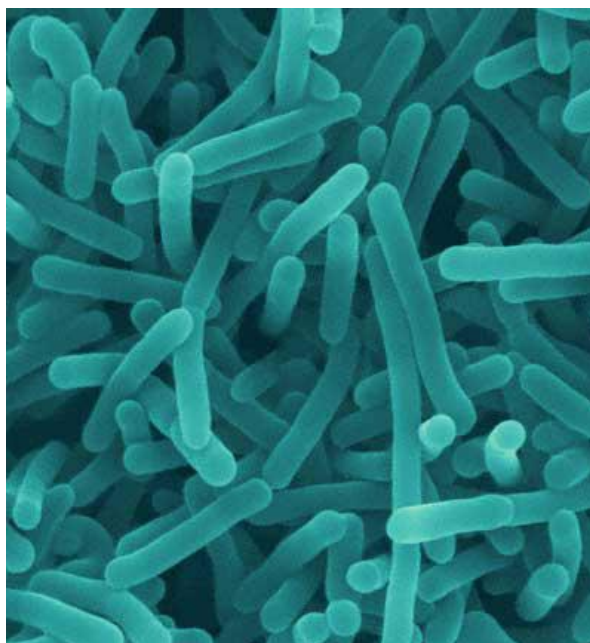
2.3 Rod *Listeria*

Rod *Listeria* tvoří pravidelné, krátké, pohyblivé, grampozitivní tyčinky se zakulacenými konci. Bakterie tohoto rodu jsou fakultativně anaerobní až aerobní. Netvoří pouzdro ani spory. Vyskytují se jednotlivě nebo v krátkých řetězcích, někdy tvoří „V“ formy, méně často se vyskytují v dlouhých vláknech. Listerie jsou mezofilní bakterie, jejich teplotní optimum leží mezi 25 až 37 °C, jsou ale odolné i vůči působení nižších teplot, přežívají mráz a jsou schopné se pomalu množit i při teplotě 4 °C. Listerie se vyskytují v půdě, fekáliích, ve vodě, na rostlinách nebo i v silážích z nich vyrobených. Jsou to saprofyty a epifyty sliznic trávicího traktu živočichů. Možným zdrojem listerií mohou být potraviny. Jedná se zejména o mléčné výrobky vyrobené ze syrového mléka, různé saláty, maso, apod. Obecně se jedná o nekyselé potraviny. Listerie jsou schopny tvořit biofilmy, které mohou být zdrojem kontaminace v potravinářském průmyslu (zejména v mlékárnách) [21, 22, 25].

2.3.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je kataláza pozitivní, pohyblivá, grampozitivní, nesportující, tyčinkovitá bakterie z čeledi *Listeriaceae*. Jako saprofyt a epifyt kolonizuje trávicí trakt člověka i zvířat, žije také ve vodě, bahně nebo půdě. Je schopna kontaminovat potraviny a krmiva a jako potenciální patogen je původce onemocnění lidí i zvířat, listeriózy [26].

Listeria monocytogenes je aerobní nebo fakultativně anaerobní, nenáročná a schopná růst i při vysokých koncentracích soli. Netvoří spory ani pouzdra, není acidorezistentní, zato je pozoruhodně odolná vůči nízkým teplotám a dokáže se množit i při 4 °C. Při teplotě 20-25 °C tvoří bičíky a je pohyblivá [26].



Obr. 5. *Listeria monocytogenes* [27]

2.3.2 Inhibice růstu *Listeria monocytogenes* fosforečnany

Listeria monocytogenes je široce rozšířena v přírodě a byla izolována z mnoha potravin. Rozšíření listerií mělo za následek zkažení potravinářského výrobku [28].

Byly zkoumány účinky polyfosforečnanu sodného (SPP) na růst *Listeria monocytogenes* v BHI médiích při teplotě 19 °C a pH 6,0. SPP s krátkým řetězcem měl malý účinek na růst této bakterie, ale vyšší polymery (průměrná délka řetězce $n = 6, 13$ a 21) vykazovaly významné bakteristické účinky, které se zvyšovaly se stoupajícími koncentracemi SPP. Pozdější studie určily účinky a vzájemné ovlivnění teploty (4, 12, 19 °C), koncentrace NaCl (0,5; 2,5; 4,5%) a počátečního pH (5,0; 5,5; 6,0; 7,0) na inhibici růstu *Listeria monocytogenes* hexafosforečnanem (0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0%). Inhibice růstu účinkem SPP se zvýšila s klesající teplotou, klesajícím pH a zvyšující koncentrací NaCl [28].

Inhibice růstu způsobená SPP byla doprovázena změnami v buněčné morfologii. To zahrnovalo prodlužování buněk, tloušťnutí buněčných obalů podél válcových oblastí buněčného těla a hromadění materiálu buněčné stěny v přepážkách při tvorbě septa. Avšak

normální růst byl pozorován tehdy, když bylo médium obsahující SPP doplněno o MgSO_4 . Několik studií ukázalo, že jisté polyvalentní kovové ionty jako Mg^{2+} , Ca^{2+} a Fe^{3+} mohou zabránit inhibičním účinkům polyfosforečnanů na mikroorganismy [28].

V nepřítomnosti kovových iontů SPP vykazoval značný bakteristatický účinek. Když bylo médium obsahující SPP doplněno o kovové ionty, došlo k rychlejšímu růstu bakterií se sníženými generačními dobami a lag časy. Všechny kovy odvrátily inhibici růstu vyvolanou SPP, dokonce i v nejnižší testované koncentraci. Nejúčinnější byly Mn^{2+} a Zn^{2+} ionty. Tempo růstu se zvyšovalo se stoupající koncentrací přidaného kovu do média obsahujícího SPP. Přídavek SPP měl malý účinek na růst na *Listeria monocytogenes* v několika jídlech bohatých na minerální látky [28].

2.4 Rod *Clostridium*

Rod *Clostridium* je velmi rozsáhlý a z potravinářského hlediska velmi důležitý. Jeho druhy tvoří peritrichní tyčinky, které jsou grampozitivní. Spora je širší než vegetativní buňka. Bakterie tohoto rodu bývají uspořádány po dvou nebo v krátkých řetězcích. Rod *Clostridium* je většinou přísně anaerobní. Kyslík inhibuje jejich růst a po 5 až 10 minutách působení usmrcuje vegetativní buňky většiny druhů. Některé jsou však schopny pomalého rozmnožování i za přítomnosti kyslíku. Optimální teplota těchto bakterií se nachází v rozmezí 10 až 65 °C. Některé druhy tohoto rodu produkují velmi nebezpečné toxiny (např. botulotoxiny). Sacharidy fermentují za vzniku kyseliny máselné, kyseliny octové, CO_2 , H_2 a proměnlivého množství alkoholu a acetonu. Klostridia se běžně vyskytují v půdě, mořských sedimentech, rozkládajícím se rostlinném materiálu, živočišných a rostlinných produktech, ve střevním traktu člověka, jícnu obratlovců, u hmyzu a v humánním či veterinárním klinickém materiálu [20, 21, 22].

Přítomnost klostridií byla zkoumána ve vzorcích sterilovaných pokrmů a dalších potravinách vyráběných za vysokých teplot. Bylo zjištěno, že počty bakterií rodu *Clostridium* v těchto potravinách nepřekračují přípustné hodnoty pro daný produkt dle Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 a jsou tudíž z mikrobiologického hlediska vyhovující [1].

2.4.1 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens je grampozitivní, anaerobní, sporotvorná tyčinka. Má pouzdro a není pohyblivá. Svou relativně značnou velikostí se odlišuje od ostatních klostridií. Přesto, že se jedná o kataláza negativního anaeroba, příležitostně přežívá expozici kyslíku. Roste v rozmezí 12 až 50 °C, s teplotním optimem mezi 37-45 °C. Vyžaduje pH mezi 6,0-7,5 a a_w mezi 0,95-0,97. Vegetativní buňky nepřežívají 60 °C, zatímco spory snáší teplotu 100 °C po dobu 0,31 až 38 minut. Způsobuje asi 80% případů klostridiové myonekrózy (plynové gangrény) [29, 30].

Klostridie jsou v prostředí ubikvitárně rozšířeny. Vegetativní formy se běžně nacházejí ve střevě živočichů i člověka. Spory perzistují v půdě, sedimentech, a to především v oblastech znečišťovaných živočišnými a lidskými exkrementy [31].

Clostridium perfringens roste rychle na selektivních půdách a lze je identifikovat podle Naglerovy reakce. Spočívá v enzymové aktivitě fosfolipázy na vaječný žloutek. Kolem kolonie se vytvoří zóna precipitace. Tento jev je inhibován antisérem proti α -toxinu *Clostridium perfringens* [30].



Obr. 6. *Clostridium perfringens* [32]

2.4.2 Inhibiční účinky fosforečnanů na růst *Clostridium perfringens*

Přestože byl proveden rozsáhlý výzkum na využití polyfosforečnanů jako antimikrobiálních činidel na různé bakterie, nebyly k dispozici žádné informace o antimikrobiálních vlastnostech polyfosforečnanů proti *Clostridium perfringens*. Teplotní rezistence spor umožňuje jejich přežití v tepelně ošetřeném mase a drůbežích výrobcích.

Během nedostatečného chladicího nebo tepelného ošetření, pak tyto spory vyklíčí a vyrostou ve vegetativní buňky, které mohou způsobit otravy [33].

Byly hodnoceny účinky různých polyfosforečnanů (SPP – polyfosforečnan tetrasodný, STPP – tripolyfosforečnan tetrasodný, TSPP – pyrofosforečnan tetrasodný a SAPP – kyselý polyfosforečnan sodný) na růst, sporulaci a klíčení spor *Clostridium perfringens* a na klíčení spor a nárůst buněk ze spor *Clostridium perfringens* v drůbežím mase [33].

Účinky polyfosforečnanů byly nejprve zkoumány na růst vegetativních buněk *Clostridium perfringens* izolovaných z kontaminovaných potravin. Bylo zjištěno, že požadované koncentrace polyfosforečnanů, které inhibují bakteriální růst *Clostridium perfringens*, jsou vyšší než u jiných bakterií. Velmi malý nebo žádný účinek nebyl zaznamenán až do koncentrace 0,4% testovaných polyfosforečnanů. Zvýšení koncentrace SPP na 0,6% výrazně zbrzdilo růst vegetativních buněk. Růst byl inhibován až do 6 hodin při koncentracích 0,8% a do 24 hodin při koncentraci 1% SPP. Růst byl významně zpožděn až do 24 hodin při 0,6% STPP a kompletní inhibice byla pozorována při $\geq 0,8\%$ STPP. TSPP vykazuje podobný inhibiční účinek jako STPP, zatímco 0,6% inhibuje růst až do 5 hodin, růst byl potlačen až do 24 hodin při použití koncentrací 0,8% a 1%. Mezi všemi testovanými polyfosforečnany SAPP vykazoval největší inhibiční účinky na vegetativní buňky *Clostridium perfringens*. Poměrně nízké koncentrace jako 0,4% snížily růstovou rychlost přibližně na polovinu v porovnání s kontrolou bez SAPP a kompletní inhibice byla pozorována již při koncentracích $\geq 0,6\%$ [33].

Při zkoumání inhibičních účinků na sporulaci *Clostridium perfringens* až do koncentrace 0,4% SAPP nebyla patrná žádná inhibice růstu spor. Zvýšení koncentrace SAPP na 0,5% mělo za následek přibližně osminásobně nižší schopnost sporulace. Maximální účinek SAPP na sporulaci byl při koncentraci 0,6%. K významnému snížení schopnosti sporulace došlo také s použitím subletálních koncentrací SPP, TSPP a STPP. U kultur k nimž bylo přidáno 0,9% SPP, 0,6% SAPP, 0,6% STPP a 0,6% TSPP došlo k redukci asi o 5-6 log tepelně odolných spor v porovnání s kontrolou. Ovšem u některých odolnějších kmenů *Clostridium perfringens* byly potřebné vyšší koncentrace [33].

Při hodnocení efektu STPP na klíčení spor a nárůst vegetativních buněk ze spor *Clostridium perfringens* bylo zjištěno, že koncentrace 1% STPP nemá významný vliv na klíčení spor, ale stejná koncentrace dokáže bránit nárůstu vegetativních buněk ze spor.

Bylo tedy navrženo, že STPP může být používán jako antimikrobiální přísada, která snižuje riziko nárůstu buněk ze spor *Clostridium perfringens* v masných výrobcích [33].

2.4.3 *Clostridium tyrobutyricum*

Clostridium tyrobutyricum je grampozitivní, tyčinkovitá bakterie, která roste za anaerobních podmínek a produkuje kyselinu mléčnou, kyselinu octovou a vodík jako nejvýznamnější fermentační produkty glukózy a xylózy [34].

Clostridium tyrobutyricum bylo určeno jako hlavní organismus, který je odpovědný za pozdní duření tvrdých a polotvrdých sýrů. Spory jsou přenášeny z nesprávně fermentované siláže do mléka přes křížovou kontaminaci a mohou klíčit v anaerobním prostředí sýru. Vegetativní buňky produkují fermentací kyselinu máselnou, která může způsobit značné ztráty v důsledku tvorby plynu a produkce zapáchajících látek [35].

2.4.4 Inhibice růstu *Clostridium tyrobutyricum* fosforečnany

Byl zkoumán účinek polyfosforečnanů s dlouhými řetězci (JOHA HBS - polyfosforečnan sodný glassy, který obsahuje $69 \pm 1\%$ P_2O_5 a dvou podobných solí HBS – 1 a HBS – 9) na růst *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 v pasterizovaném taveném sýru [35].

Zatímco 0,1% polyfosforečnan vykazoval malý účinek, vyšší koncentrace měly zvyšující inhibiční účinek na růst spor v inokulu, množení buněk a tvorbu plynů. U 0,5% polyfosforečnanu došlo ze začátku ke zpoždění růstu bakterií asi o 3 týdny v sýru typu A (55% vlhkosti, 47,2% tuku v sušině). Stejná koncentrace však nebyla dostačující, aby zabránila růstu tohoto organismu v sýru typu B (55% vlhkosti, 57% tuku v sušině). Vzhledem k vybraným experimentálním parametrům (vysoká počáteční koncentrace buněk; optimální vnitřní a vnější parametry pro růst klostridií) 0,5% koncentrace fosforečnanu může být dostatečná ke kontrole růstu *Clostridium tyrobutyricum* za normálních podmínek, kde počáteční počty spor jsou spíše nízké a skladovací teploty jsou obvykle 20 °C a nižší. Navíc klostridia byla kompletně inhibována účinkem 1,0% fosforečnanu, který zřejmě indikoval využití těchto fosforečnanů jako prevence duření pasterizovaných tavených sýrů [35].

Výsledky ukazují, že fosforečnany s dlouhými řetězci typu JOHA HBS jsou dostatečně účinné pro kontrolu růstu *Clostridium tyrobutyricum* v sýru. Je také zřejmé, že všechny tři fosforečnany měly téměř identický účinek na *Clostridium tyrobutyricum*, rozdíly mezi HBS, jeho granulovanou formou (HBS-1) a zkušební směsí HBS-9 byly s ohledem

na jejich inhibiční kapacitu zanedbatelné. Experimenty se sýrem byly uskutečněny za podmínek, které podporovaly růst spor klostridií a lišily se od normálních podmínek výroby a skladování pasterizovaných tavených sýrů. Proto byl učiněn závěr, že koncentrace 0,5% až 1,0% polyfosforečnanu by měly být dostatečné k tomu, aby zabránily duření v tomto typu výrobku [35].

2.5 Rod *Bacillus*

Tento rod bakterií je velmi rozsáhlý a v přírodě velmi rozšířený. Jeho druhy tvoří grampozitivní, peritrichní tyčinky různé délky, které jsou často uspořádané ve dvojicích nebo řetězcích a mají zakulacené nebo čtvercové konce. Bakterie tohoto rodu jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní s širokou diverzitou fyziologických schopností (pH, teplota, salinita). Optimální teplota pro jejich růst je mezi 15 až 55 °C. Mají bohaté enzymové vybavení, takže mohou rozkládat nejrůznější organické sloučeniny. Většina druhů má velmi aktivní amylolytické a proteolytické enzymy a řada druhů má také pektolytické enzymy. Hodně druhů produkuje antibiotika polypeptidové povahy, z nichž některá se pomocí těchto bakterií vyrábějí průmyslově (např. bacitracin). Některé druhy tvoří slizová pouzdra polysacharidové povahy (levany), složená z fruktosy, která způsobují nežádoucí nitkovitost pečiva a pšeničného chleba. Určité druhy slouží pro průmyslovou přípravu enzymů [20, 21].

Výskyt bacilů byl sledován ve vzorcích sterilovaných pokrmů a v dalších výrobcích vyráběných za vysokých teplot. Bylo zjištěno, že počty bakterií rodu *Bacillus* nepřekračují přípustné hodnoty pro daný produkt dle Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 a jsou tudíž z mikrobiologického hlediska vyhovující [1].

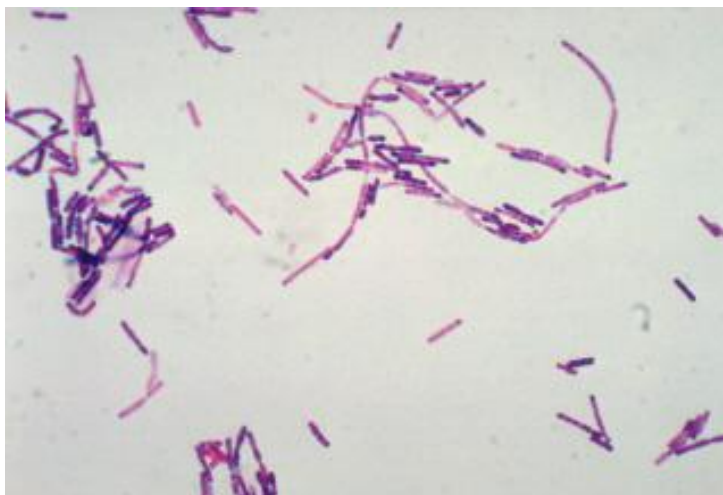
2.5.1 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus je grampozitivní, aerobní tyčinka podobná *Bacillus anthracis*. Znaky odlišující druh *B. cereus* od *B. anthracis* jsou motilita (většina kmenů druhu *B. cereus* je pohyblivá), hemolytická aktivita (*B. cereus* vykazuje β -hemolytickou aktivitu, *B. anthracis* tuto aktivitu většinou nemá) a pouzdro, které *B. cereus* nemá [30].

Bacillus cereus je saprofyt. Tato bakterie se běžně vyskytuje v půdě, prachu a vodě. K diagnostice slouží biochemické testy. Roste v rozmezí teplot 8 až 55 °C, optimálně při 28 - 35 °C. U *B. cereus* nebyla zaznamenána žádná tolerance pro vodní aktivitu

(min. $a_w \sim 0,95$) nebo pH. Rozpětí hodnot pH umožňující ještě růst je přibližně 4,9 – 9,3 [29, 30, 36].

Spory *Bacillus cereus* jsou vysoce termorezistentní, centrální, elipsoidního tvaru, nezpůsobují zduření buňky. Většina kmenů produkuje toxin. Mikroorganismus je hojně rozšířen v prostředí, z potravin pak v obilninách, zejména v rýži [30].



Obr. 7. *Bacillus cereus* [37]

2.5.2 Inhibiční účinky fosforečnanů na růst *Bacillus cereus*

Výsledky současných studií ukazují, že fosforečnan s dlouhým řetězcem JOHA HBS má antimikrobiální účinky na buňky *Bacillus cereus*, které jsou závislé na koncentraci této soli. Vyšší koncentrace vedly k lyzi buněk a měly baktericidní a bakteristatické účinky, subletální koncentrace bránily tvorbě buněčné stěny. Tyto účinky jsou závislé na růstové fázi buněk [38].

Letální koncentrace fosforečnanu měly za následek přímou lyzi buněk, zatímco stacionární fáze buněk nebyla ovlivněna. V logaritmické fázi došlo k lyzi buněk *Bacillus cereus* WSBC 10030 účinkem JOHA HBS. K dezintegraci a rozpadu buněk došlo v 0,1% roztoku polyfosforečnanu, kdežto při kontrole nebyla pozorována žádná lyze. Vyšší koncentrace vedly k zrychlené lyzi. Zbytky buněk se skládaly z prázdné buňky s téměř kompletní buněčnou stěnou a polární částí, což jsou první známky toho, že fosforečnany vyvolaly lyzi. Pozorováním bylo zjištěno, že lyzi buněk by mohly účinně zabránit dvojmocné kationty. Tuto domněnku potvrdil předchozí nález volných Mg^{2+} , které dokázaly zabránit inhibičnímu účinku polyfosforečnanu na *Bacillus cereus*. Výsledky ukázaly, že lytická činnost související s fosforečnany zahrnuje interakce kationů [38].

Fosforečnany brání růstu nejen vegetativním buňkám, ale ovlivňují také spory. Nižší koncentrace JOHA HBS (0,05% a 0,1%) kompletně zabránily nárůstu spor bacilů. Vyšší koncentrace (1%) měly dokonce sporocidní účinek; koncentrace spor (počáteční inokulum 2×10^6 CFU/ml) se snížila na méně než 10^5 CFU/ml během 8 hodin. Ve vzorcích obsahujících fosforečnan nebyly fázově kontrastní mikroskopií objeveny žádné vegetativní buňky [38].

Kromě lytických a baktericidních účinků vyšších koncentrací JOHA HBS měly subletální koncentrace překvapující účinek na rostoucí buňky *Bacillus cereus*. V přítomnosti 0,05% polyfosforečnanu se normální tyčinkovité buňky (délka 3 – 5 μm) přeměnily do dlouhých vláknitých buněk (které byly o 4 až 10 μm delší). Přídavek dvojmocných kationtů vedl k rychlému rozpadu vláken na tři nebo více životaschopných buněk, což vysvětluje pozorovaná krátká generační doba [38].

2.6 Rod *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* tvoří gramnegativní, pohyblivé, rovné nebo mírně zakřivené tyčinky. Tento rod zahrnuje aerobní bakterie bez kvasných schopností, které ale mají schopnost využívat nejrůznější organické sloučeniny jako zdroje energie a uhlíku a bez nároků na specifické růstové látky [20].

Řada druhů tvoří fenazinová barviva žlutých, zelených, modrých nebo červených odstínů, která uvolňují do růstového prostředí. Tím způsobují zabarvení potravin (modránání nebo červenání mléka). Některé druhy uvolňují do prostředí fluoreskující žlutozelené barvivo. Určité druhy vyvolávají v potravinách cizí vůně nebo pachy (ovocný, rybí) nebo pachuti (mýdlovou, hořkou). Silné proteolytické schopnosti jim umožňují rozklad bílkovinných potravin, a proto patří k nejpočetnějším mikroorganismům na povrchu masa. Jejich lipolytické vlastnosti se uplatňují při kažení tuků. Většinou jsou psychrotrofní povahy, takže jejich nežádoucí činnost v potravinách probíhá i při poměrně nízkých skladovacích teplotách [20].

Příslušníci rodu *Pseudomonas* jsou všudypřítomné v půdě, na rostlinách, živočiších a ve vodě. Řada z nich jsou rostlinnými patogeny, kdežto pro člověka a zvířata je jich nebezpečných jen několik. Pouze dva duhy, a to *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonas cocovenans* (přeřazeno do *Burkholderia cocovenans*), způsobují otravy z potravin. U

dospělých tyto otravy vyvolávají mírnou enteritidu, projevující se hlavně průjmem, ale u dětí mohou vést k průjmům velmi silným, končícím i smrtí [16].

2.6.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Jedná se o typový druh rodu *Pseudomonas*, který má vzhled přímé či mírně zahnuté tyčinky o rozměrech $0,5 - 1 \mu\text{m} \times 1,5 - 6 \mu\text{m}$. Akumulují β -hydroxymáseľnou kyselinu, netvoří spory, jsou pohyblivé pomocí svazku polárních bičíků. Mikroorganismus roste pouze za aerobních podmínek v rozpětí teplot $5 - 42 \text{ }^\circ\text{C}$, optimum růstu je $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Je příležitostně patogenní pro člověka, pro starší osoby či malé děti. Vyvolává infekce močových cest, kůže a sliznice, katary [39].

Je přítomen i v hnisu, který díky jeho přítomnosti je zbarven do modrozelená. Do okolí vylučuje antibiotika (pyocyanosu), které potlačují růst jiných mikroorganismů. Indikuje výskyt pro pitnou vodu nevyhovujících organických substrátů, protože využívá těžko rozložitelné látky ve vodách. Vyskytuje se v plaveckých bazénech, bývá součástí biologických nárůstů na vnitřních stěnách potrubí. Stanovení tohoto mikroorganismu je vyžadováno u vod z koupališť a bazénů [39].

Zdrojem této bakterie je především maso, zelenina a zmražené potraviny. Také lidské mléko bývá zdrojem této infekce u novorozenců [16].



Obr. 8. *Pseudomonas aeruginosa* [40]

2.6.2 Inhibice bakterií rodu *Pseudomonas* fosforečnany

V kuřecím mase polyfosforečnany inhibují a ničí část flóry a prodloužují intervaly pro nárůst mikroorganismů, které se po určité době začnou množit. Fosforečnany (75% $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ a 25% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) a ekvivalentní směsi chemicky čistých fosforečnanů inhibovaly růst nefluorescentních pseudomonád na syntetickém médiu. Fluorescentní kmeny rostly s určitým krátkým zpožděním. Inhibice nebyla způsobena vysokými hodnotami pH ale spíše chelatací kovových iontů nezbytných pro růst bakterií. Inhibici dokážou odvrátit Mg^{2+} a přirozené konkurenční chelátory jako pyoverdin [41].

U kuřat zchlazených přes noc v ledu obsahujícím 3% polyfosforečnanů se prodloužila trvanlivost (skladovatelnost) o 17% a u kuřat uchovávaných přes noc v ledu, který obsahoval 8% polyfosforečnanů, se prodloužila trvanlivost o 25%. Kuřata udržovaná v nepřetržitém kontaktu s 3 a 8% roztokem polyfosforečnanů během uskladnění při 2,2 °C zvýšila svou skladovatelnost o 17 a 67%. V přítomnosti 3 a 8% polyfosforečnanů se vyvinuly jen fluorescentní kmeny. Kuřata uchovaná v aseptickém ledu obsahujícím 8% polyfosforečnanů měla o 60% delší údržnost než ta ve vodním ledu [41].

Když byly polyfosforečnany v nepřetržitém kontaktu s povrchem kuřete, prodloužila se jejich údržnost víc než bez jejich použití. Nicméně využití polyfosforečnanů v antiseptickém ledu k přepravě chlazeného ptactva by se mohlo ukázat spíše nákladné než výhodné z hlediska prodloužení údržnosti. Mimoto, jak polyfosforečnanový led taje, koncentrace rozpouštědel postupně v tajícím ledu klesá. Aby byl povrch neustále zásoben zdrojem čerstvého polyfosforečnanu, je nezbytné, aby se rychle vyráběl nový led s polyfosforečnany. Z ekonomického hlediska může být lepší chlazení v kašovitém ledu obsahujícím polyfosforečnany [41].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této práce bylo sledovat inhibiční účinky fosforečnanových solí v různém kondenzačním stupni na růst vybraných mikroorganismů.

Pro dosažení tohoto cíle bylo potřeba:

- vypracovat literární rešerši popisující vlastnosti fosforečnanů, jejich význam v potravinářském průmyslu a využití těchto látek jako antimikrobiálních činidel.
- popsat účinky fosforečnanů na růst konkrétních mikroorganismů.

Pro vypracování praktické části diplomové práce bylo nezbytné splnit tyto cíle:

- stanovit inhibiční vlivy fosforečnanových solí na růst vybraných druhů gram pozitivních a gram negativních bakterií po 24 hodinách kultivace za pomoci indexu růstu (IR).
- zjistit účinky těchto solí na lag fázi a růstovou rychlost zkoumaných mikroorganismů s použitím parametrů (μ_m , λ) Gompertzova růstového modelu.
- na základě teoretické části a výsledků praktické části formulovat závěry o účinku fosforečnanových solí na růst mikroorganismů.

4 PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY

Automatické mikropipety Hirschmann, Nichipet EX

Biologický termostat BT 120

Analytické váhy KERN 440-47 N

Chladnička Elektrolux

Laboratorní sklo

Autokláv Varioklav H+P

Biohazard box EUROFLOW (Clean Air)

Fotometr TECAN Sunrise TW/TC

Ostatní běžné laboratorní pomůcky a vybavení

5 KULTIVAČNÍ PŮDY

5.1 Masopeptonový agar – (MPA)

Složení:

Látka	Množství (g/l)
Beef extrakt (HiMedia)	3,0
Pepton (HiMedia)	5,0
NaCl (Lach-Ner)	5,0
Agar	15,0
Konečné pH (při 25 °C) $6,8 \pm 0,2$	

Příprava půdy:

Do 1000 ml destilované vody bylo naváženo příslušné množství složek a rozpuštěno. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Poté byla půda nalita na Petriho misky.

5.2 Masopeptonový bujón – (MPB)

Složení:

Látka	Množství (g/l)
Beef extrakt (HiMedia)	3,0
Pepton (HiMedia)	5,0
NaCl (Lach-Ner)	5,0
Konečné pH (při 25 °C) $7,0 \pm 0,2$	

Příprava půdy:

V 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno příslušné množství složek dle návodu. Poté byl masopeptonový bujón rozplněn do zkumavek a sterilován při 121 °C po dobu 20 minut.

6 ROZTOKY A OSTATNÍ CHEMIKÁLIE

6.1 Fyziologický roztok

Příprava roztoku:

8,5 g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a sterilováno při 121 °C po dobu 15 minut.

6.2 Fosforečnany

Pro zjištění antimikrobiálního účinku fosforečnanových solí na růst vybraných mikroorganismů byly použity tři druhy komerčně využívaných fosforečnanů v různém kondenzačním stupni.

Použité fosforečnanové soli:

HBS – směs polyfosfosforečnanů s vysokým kondenzačním stupněm a orthofosforečnanů.

S9 – směs polyfosforečnanů (nižší stupeň polymerace než HBS) a orthofosforečnanů.

690 – směs orthofosforečnanů a difosforečnů

Příprava roztoků solí:

Zásobní roztoky všech solí byly připraveny o 9% koncentraci rozpuštěním příslušné navážky v destilované vodě a sterilovány filtrací přes nylonový filtr o porozitě 0,2 µm. Takto připravené roztoky byly uchovávány v uzavřených zásobních lahvích při pokojové teplotě.

7 MIKROORGANIZMY

Pro sledování antimikrobiálních účinků fosforečnanů bylo použito 7 kmenů gramnegativních bakterií a 8 kmenů grampozitivních bakterií, které byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM).

Gramnegativní bakterie:

Citrobater freundii CCM 7187

Escherichia coli CCM 3954

Proteus mirabilis CCM 7188

Pseudomonas aeruginosa CCM 3955

Pseudomonas fluorescens CCM 2798

Salmonella enterica subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

Serratia marcescens subsp. *marcescens* CCM 303

Grampozitivní bakterie:

Bacillus cereus CCM 2010

Bacillus sphaericus CCM 1615

Bacillus subtilis subsp. *spizizenii* CCM 7212

Enterococcus faecalis CCM 4224

Enterococcus faecalis CCM 2665

Enterococcus faecalis CCM 7247

Micrococcus luteus CCM 732

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* CCM 3953

Všechny kmeny bakterií byly uchovávány na MPA na Petriho miskách při teplotě 4 ± 2 °C.

8 POUŽITÉ METODY

8.1 Příprava suspenze bakterií

Suspenze bakterií byla připravena zaočkováním 6 ml masopeptonového bujónu (MPB) ve zkumavkách testovanými bakteriemi narostlými na Petriho miskách (MPA). Zkumavky se suspenzí bakterií byly následně kultivovány v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin.

8.2 Sledování účinku fosforečnanových solí na vybrané bakterie

K pozorování vlivu fosforečnanů na růst mikroorganismů byly použity tři druhy komerčně běžně využívaných fosforečnanových solí lišících se délkou řetězce (HBS, S9, 690). Pro stanovení bylo použito 7 různých koncentrací těchto solí (0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,75% a 1% w/v). Fosforečnany byly v příslušném množství přidány přímo do zkumavek se 4 ml sterilního kultivačního média (MPB). Vzorky, které měly sloužit k pozitivní kontrole, obsahovaly pouze kultivační médium bez fosforečnanových solí. Takto upravená média byla po 200 µl rozpipetována do jamek v mikrotitrační destičce a zaočkována 5 µl suspenze testovaných bakterií vždy v dvojím opakování u každé koncentrace. Jako negativní kontrola posloužily vzorky kultivačních pūd s fosforečnany bez mikroorganismů. Tímto způsobem připravené vzorky byly kultivovány při 25±1 °C po dobu 24 hodin za neustálého protřepávání.

Růst mikroorganismů byl sledován měřením optické denzity buněk (OD₆₀₀) na přístroji TECAN Sunrise TW/TC (TECAN, Rakousko) v třicetiminutových intervalech po dobu 24 hodin. Před každým měřením byly všechny vzorky protřepávány po dobu 10 sekund. Řízení přístroje bylo zajištěno softwarem Magellan. Z naměřených hodnot byly vypočítány průměry a porovnány s průměrnými hodnotami naměřenými u MPB bez mikroorganismů. Z takto získaných hodnot byly vytvořeny růstové křivky. Změny růstu bakterií v prostředí s fosforečnanovými solemi byly vyhodnoceny pomocí indexu růstu (IR).

Index růstu:

$$IR = \frac{(OD_{600} - NK)}{PK} \cdot 100$$

IR – index růstu

OD₆₀₀ – optická denzita daného mikroorganismu při 600 nm

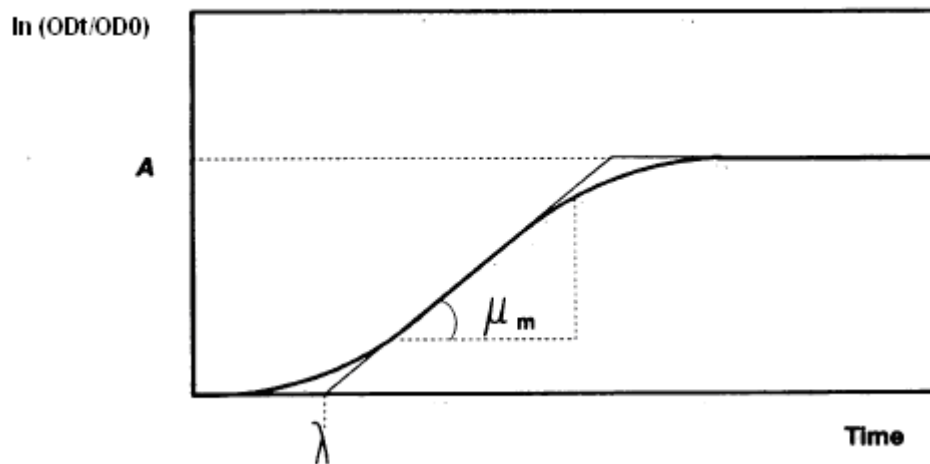
NK – optická denzita negativní kontroly

PK – optická denzita pozitivní kontroly

Z naměřených hodnot byly následně vypočteny logaritmy OD v čase t oproti hodnotám OD v čase 0:

$$[y = \ln (OD_t/OD_0)]$$

Růstové křivky byly znázorněny jako závislost $\ln (OD_t/OD_0)$ (y) na kultivačním čase t (x):



Obr. 9. Parametry růstu testovaných bakterií [42]

Růstové křivky byly popsány pomocí dvou parametrů (μ_m , λ) Gompertzova modelu [42]:

$$y = A \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_m \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

μ_m – maximální růstová rychlost (h^{-1})

λ – lag fáze (h)

Pro výpočet parametrů μ_m a λ byla použita nelineární regresní analýza (Marquardt-Levenburgova metoda) za podmínek $\mu_m > 0$, $\lambda > 0$. K výpočtu bylo využito statistického softwaru Unistat® 5.5. Kvalita navržených modelů byla posuzována pomocí korelačního koeficientu (r).

9 VÝSLEDKY A DISKUZE

Účinky fosforečnanů, které se navzájem liší délkou svého řetězce, byly zkoumány na 15 potravinářsky významných kmenech bakterií.

Vlivy tří komerčně využívaných fosforečnanů (HBS, S9 a 690) o různé koncentraci (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,75 a 1% w/v) byly testovány na 8 kmenech grampozitivních (*Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus sphaericus* CCM 1615, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 7212, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Enterococcus faecalis* CCM 2665, *Enterococcus faecalis* CCM 7247, *Micrococcus luteus* CCM 732, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953) a 7 gramnegativních bakteriích (*Citrobacter freundii* CCM 7187, *Escherichia coli* CCM 3954, *Proteus mirabilis* CCM 7188, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420, *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303).

Účinky fosforečnanů na růst mikroorganismů byly hodnoceny pomocí indexu růstu (IR) po 24 hodinách kultivace a následně pomocí lag času (λ) a maximální růstové rychlosti (μ_m).

9.1 Účinky fosforečnanů na růst vybraných bakterií

9.1.1 Vliv fosforečnanů na růst *Micrococcus luteus* CCM 732 a *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

Růst *Micrococcus luteus* CCM 732 byl výrazně inhibován všemi třemi testovanými fosforečnanovými solemi. Z výsledků znázorněných na Obr. 10-15 je vidět, že soli HBS a S9 zcela inhibovaly růst buněk *Micrococcus luteus* CCM 732 již v nejnižší testované koncentraci (0,1% w/v). Významný inhibiční účinek na růst *Micrococcus luteus* CCM 732 vykazovala i sůl 690 (Obr. 16-18), která zcela zabránila nárůstu tohoto mikroorganismu téměř ve všech testovaných koncentracích. Výjimkou byla 0,2% w/v koncentrace této soli, při níž byl patrný určitý nárůst. Inhibiční účinek se ale i u této koncentrace projevil ve snížení nárůstu buněk cca o 50% v porovnání s kontrolou, která neobsahovala žádnou sůl. Zároveň došlo při této koncentraci také k prodloužení lag fáze a snížení růstové rychlosti oproti kontrole.

Z provedených experimentů, při nichž byly zkoumány různé koncentrace fosforečnanových solí lišících se délkou svého řetězce, byl vyhodnocen *Micrococcus*

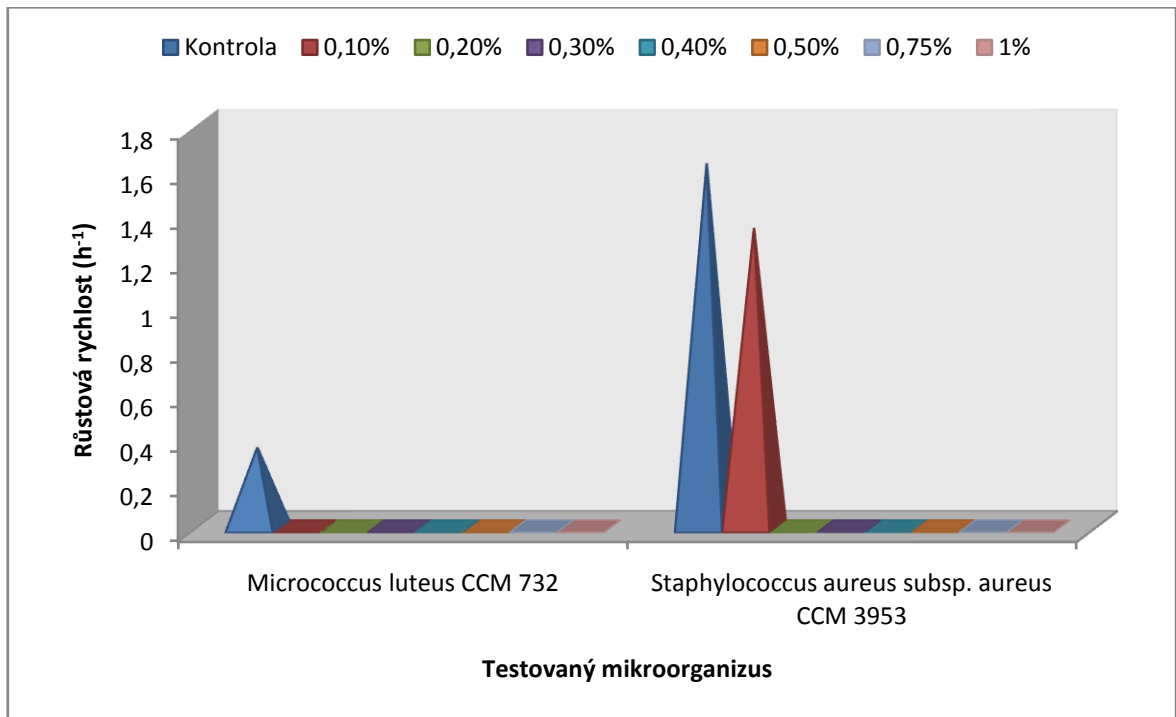
luteus CCM 732 jako nejcitlivější testovaných bakterií. Je to poměrně zajímavé zjištění vzhledem k tomu, že bakterie *Micrococcus luteus* je všeobecně považovány za poměrně rezistentní vůči vnějším vlivům (teplota, sucho, přítomnost NaCl, ionizující záření) [20].

Na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 měly nejvýraznější inhibiční účinky soli HBS a S9. Na Obr. 10-15 je vidět, že obě zmíněné soli zcela bránily růstu *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 od koncentrace 0,2% w/v. Při koncentraci 0,1% w/v došlo u obou těchto solí po 24 kultivace k významnému snížení nárůstu buněk *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 (IR<40%) v porovnání s kontrolou. Prodloužení lag fáze oproti kontrole však bylo při této koncentraci zjištěno pouze u HBS. U S9 byla lag fáze při koncentraci 0,1% w/v v porovnání s kontrolou naopak nižší. Jedním z možných důvodů tohoto zjištění je, že určité nízké koncentrace této fosforečnanové soli mohou přispět k rychlejšímu přizpůsobení podmínkám prostředí. Shodný účinek měla 0,1% w/v koncentrace HBS a S9 na růstovou rychlost, která se výrazně snížila oproti kontrole.

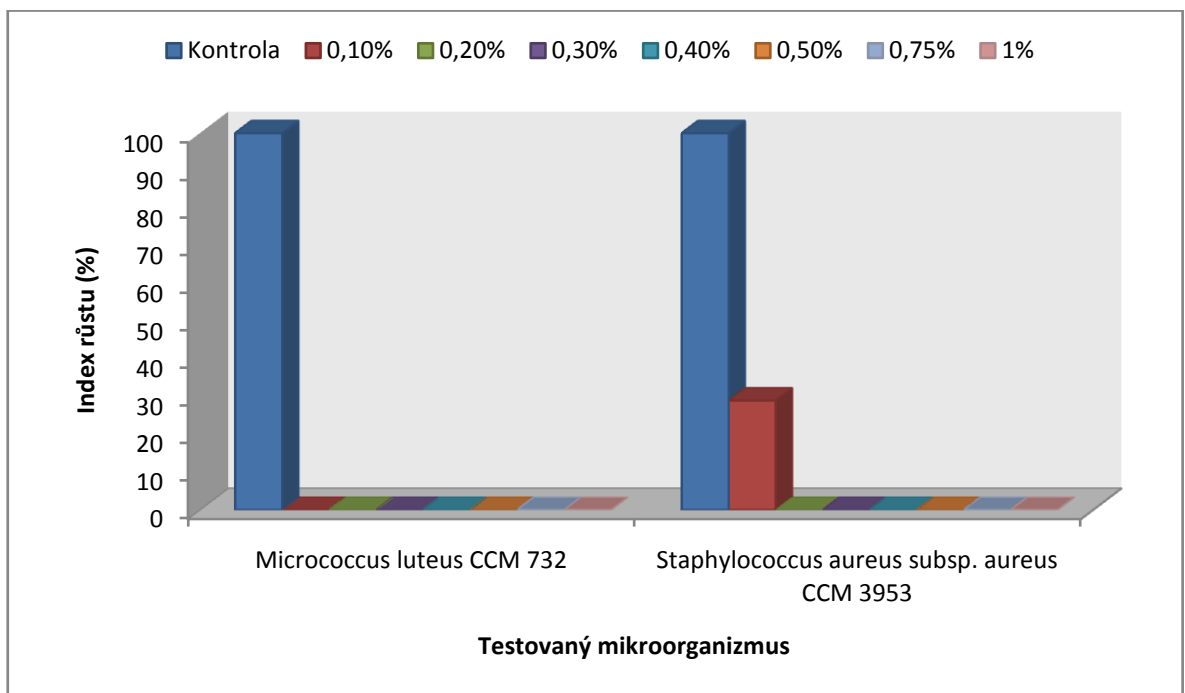
Jako nejméně účinná fosforečnanová sůl na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 byla vyhodnocena 690 (Obr. 16-18). Tato sůl zcela inhibovala růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 až od koncentrace 0,5% w/v. Koncentrace 0,4% w/v snížila o cca 40% nárůst této bakterie po 24 hodinách v porovnání s kontrolou. Zároveň se při této koncentraci více než o polovinu snížila růstová rychlost oproti kontrolnímu bujónu bez fosforečnanů. Na lag fázi buněk *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 neměla sůl o této koncentraci vliv, naopak došlo ke snížení lag fáze v porovnání s kontrolou. Nižší testované koncentrace 690 (0,1; 0,2; 0,3% w/v) neměly výraznější vliv na nárůst buněk během kultivace. Inhibiční účinek těchto tří nejnižších testovaných koncentrací se projevil v postupném prodlužování lag fáze a snižování růstové rychlosti úměrně s rostoucí koncentrací.

Získané výsledky odpovídají výsledkům studií uskutečněných Lee a kol. [3, 24], kteří zkoumali inhibiční účinky SPG (polyfosforečnan sodný glassy) a UP (ultrafosforečnan sodný) na růst *Staphylococcus aureus*. A shodují se i s výsledky zkoumání provedené Matsuoka a kol. [43], kteří zjišťovali vliv HP (hexametfosforečnan) na růst *Staphylococcus aureus*. Obě studie stejně jako tato práce uvádí, že růst buněk *Staphylococcus aureus* byl výrazně ovlivněn již při 0,1% w/v fosforečnanu s dlouhým řetězcem.

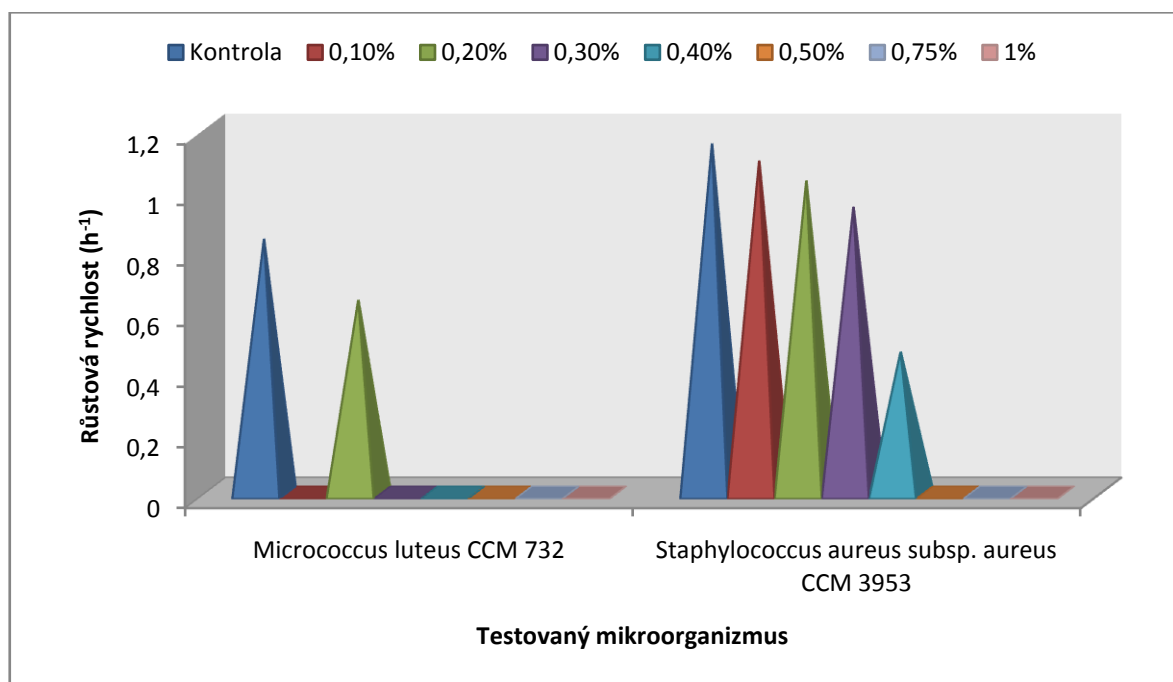
Obr. 12. Vliv HBS na růstovou rychlost (μ_m) *Micrococcus luteus* CCM 732 a *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953



Obr. 13. Vliv S9 na růst *Micrococcus luteus* CCM 732 a *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 po 24 hodinách kultivace



Obr. 18. Vliv 690 na růstovou rychlost (μ_m) *Micrococcus luteus* CCM 732 a *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953



9.1.2 Vliv fosforečnanů na růst bakterií rodu *Enterococcus*

Bakterie rodu *Enterococcus* se ukázaly jako značně odolné vůči působení fosforečnanových solí (Obr. 28-36). Jednoznačné inhibiční účinky na růst těchto mikroorganismů nevykazovala žádná z testovaných solí.

Nejrezistentnějším kmenem vůči působení fosforečnanů byl vyhodnocen *Enterococcus faecalis* CCM 7247. U tohoto kmene nebyl pozorován inhibiční vliv na jeho nárůst po 24 hodinách kultivace u žádné testované soli. HBS vykazovala inhibiční efekt na *Enterococcus faecalis* CCM 7247 pouze v prodloužení lag fáze při vyšších koncentracích soli (0,3-1% w/v) a v postupném snižování růstové rychlosti s rostoucí koncentrací soli. U S9 byl zjištěn inhibiční účinek pouze na růstovou rychlost, která se snižovala s rostoucí koncentrací a u nejvyšší testované koncentrace byla zhruba o polovinu nižší než u kontroly. 690 neměla prokazatelný vliv na žádný ze zkoumaných parametrů.

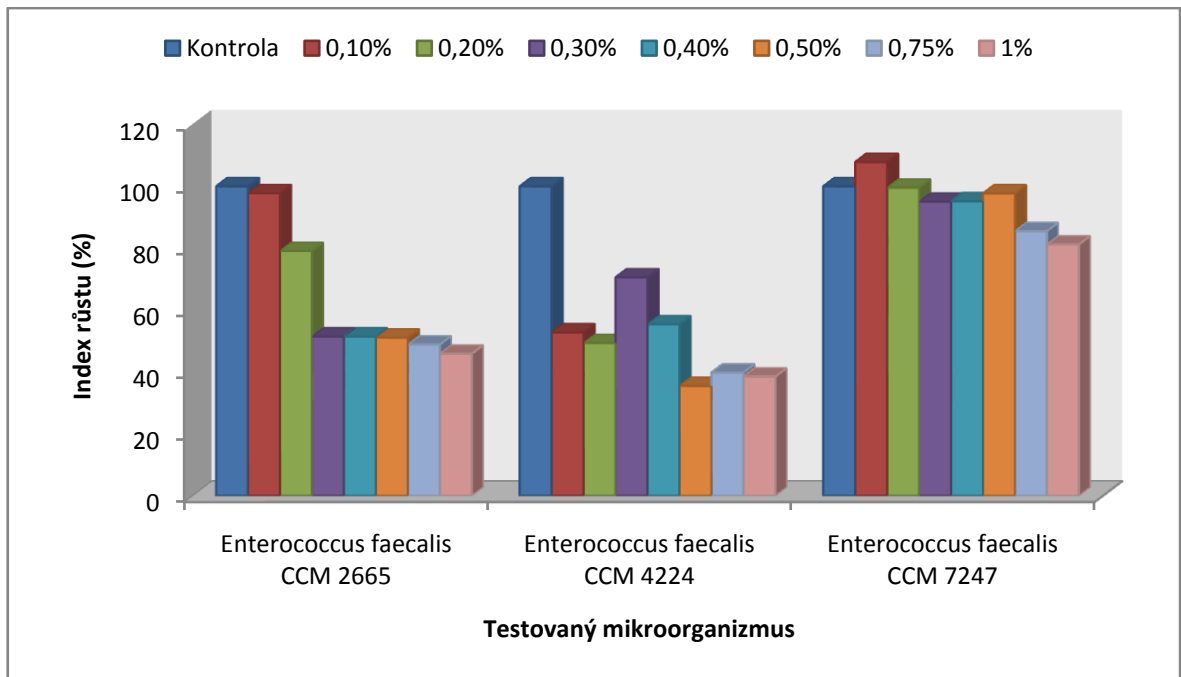
Vyšší inhibiční vliv fosforečnanů byl zjištěn u *Enterococcus faecalis* CCM 4224. HBS dokázala ve všech testovaných koncentracích snížit nárůst tohoto mikroorganismu, prodloužit jeho lag fázi a snížit růstovou rychlost. Jejich inhibiční účinky na tyto bakterie však nebyly tak jednoznačné a výrazné jako u jiných testovaných grampozitivních bakterií.

Soli S9 a 690 nedokázaly zabránit nárůstu *Enterococcus faecalis* CCM 4224. Při použití S9 a 690 došlo u těchto bakterií pouze k postupnému snižování růstové rychlosti, které bylo úměrné rostoucí koncentraci soli. Vliv těchto solí na lag fázi *Enterococcus faecalis* CCM 4224 byl jednoznačný až u tří nejvyšších testovaných koncentrací.

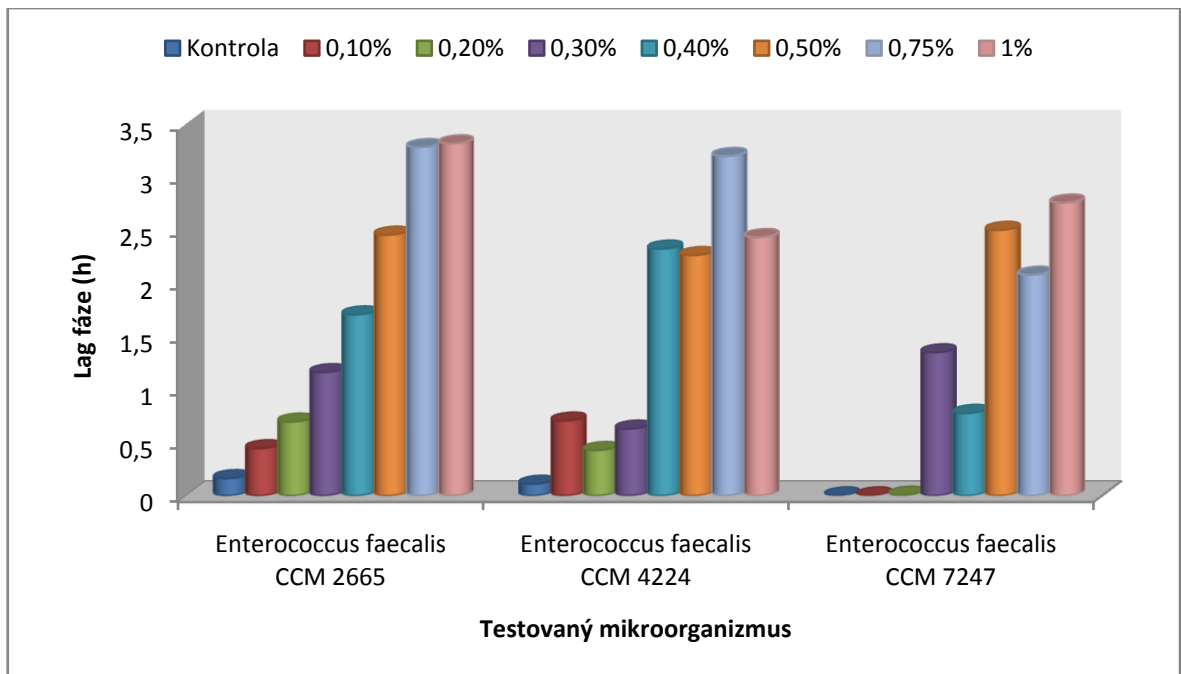
Největší vliv fosforečnanových solí byl zjištěn u kmene *Enterococcus faecalis* CCM 2665. Při aplikaci HBS došlo od koncentrace 0,3 % w/v k snížení indexu růstu cca o 50%. Zároveň došlo při použití této soli k pozvolnému prodlužování lag fáze a snižování růstové rychlosti se zvyšující s koncentrací. Obdobný inhibiční účinek na růst *Enterococcus faecalis* CCM 2665 měla i sůl S9, která při koncentraci 0,1% w/v snížila nárůst tohoto mikroorganismu o 40% a při vyšších koncentracích v průměru až o 60%. Při použití této soli došlo také ke zpomalení růstové rychlosti a u dvou nevyšších koncentrací k výraznému prodloužení lag fáze. Třetí testovaná sůl 690 nevykazovala jednoznačné inhibiční účinky na růst tohoto mikroorganismu.

Bakterie rodu *Enterococcus* byly vyhodnoceny jako nejodolnější grampozitivní bakterie, jejichž citlivost k fosforečnanovým solím byla zkoumána touto studií. Výzkumem citlivosti streptokoků, které jsou s enterokoky taxonomicky příbuzné, k účinkům fosforečnanů se zabýval Radkowski. Zkoumal inhibiční účinky fosforečnanů v 7 koncentracích (0,1-0,9% w/v) na růst vybraných kmenů streptokoků kultivovaných na krevním agaru a v mléce. Zjistil, že růst všech kmenů zmíněných bakterií byl kompletně inhibován 0,3% w/v koncentrací fosforečnanů v krevním agaru. Zatímco koncentrace nezbytná k úplné inhibici streptokoků v mléce byla od 0,6 do 0,9% w/v v závislosti na testovaném kmenu [44].

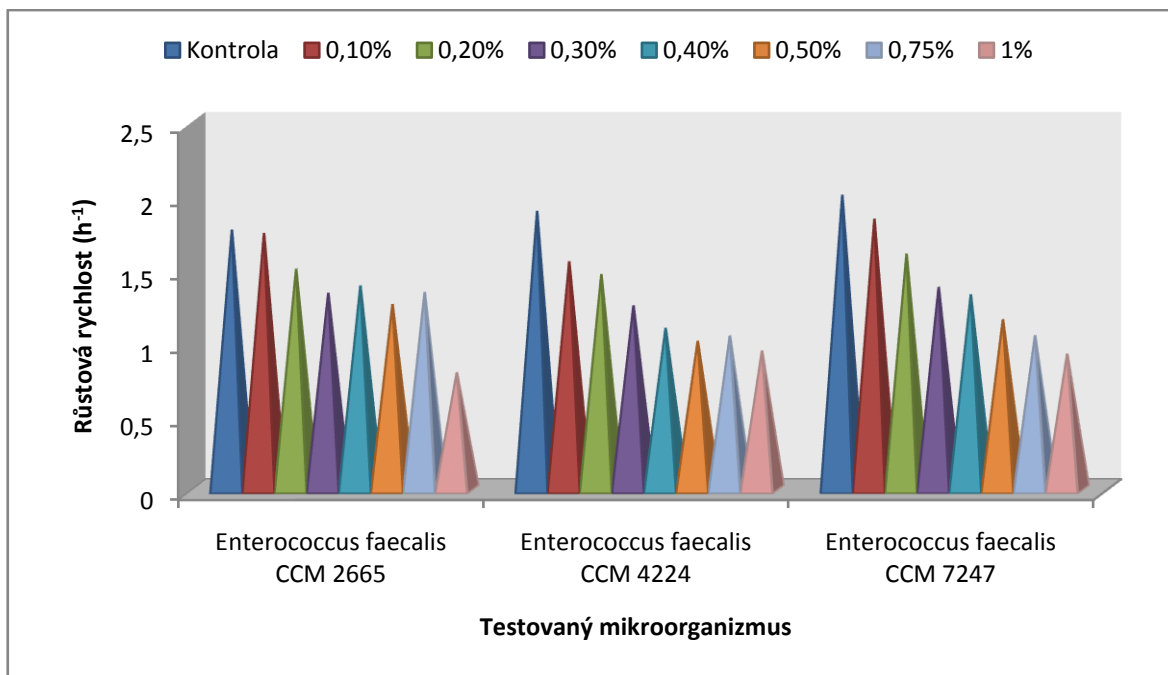
Obr. 19. Vliv HBS na růst bakterií rodu *Enterococcus* po 24 hodinách kultivace



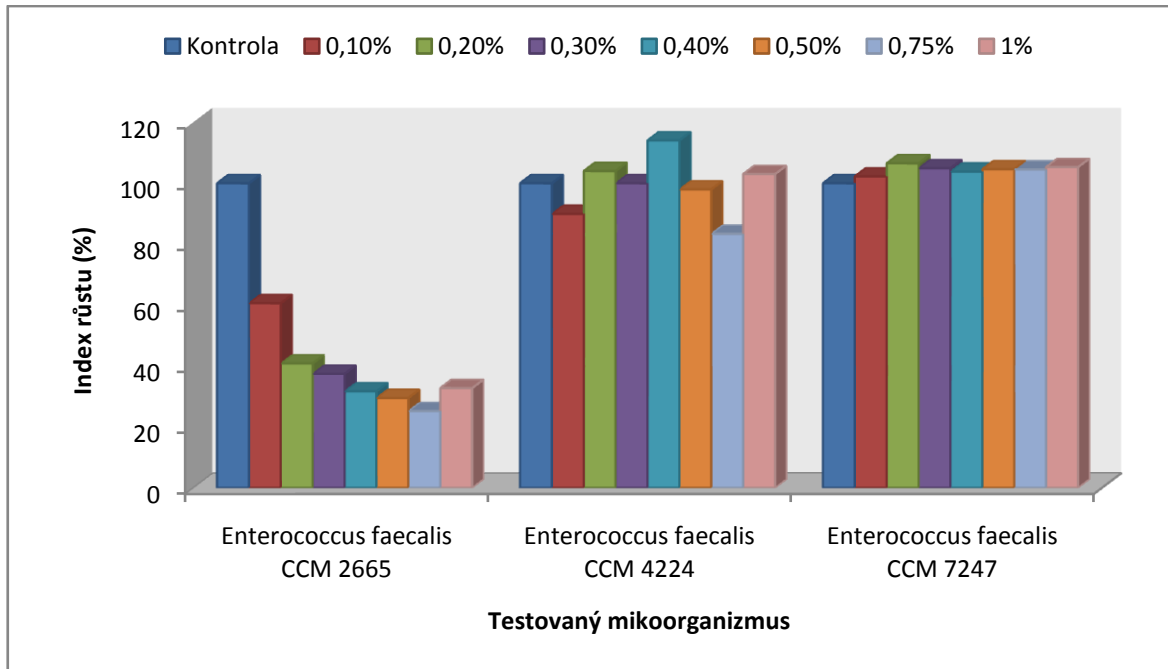
Obr. 20. Vliv HBS na lag fázi (λ) bakterií rodu *Enterococcus*



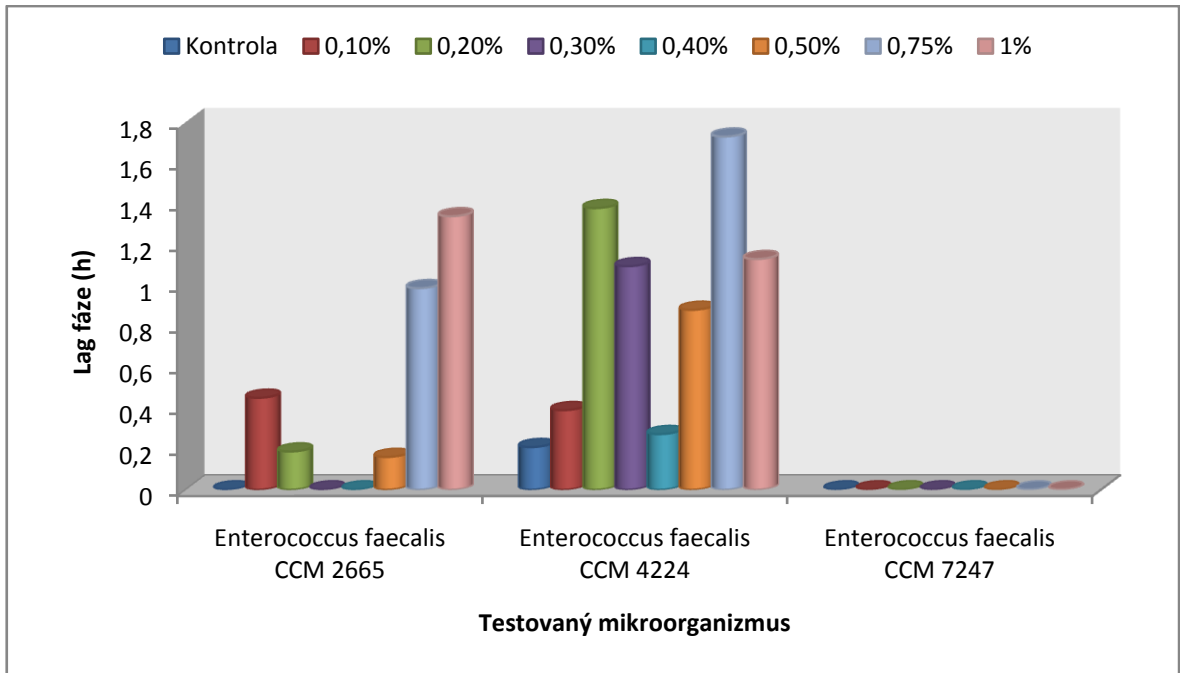
Obr. 21. Vliv HBS na růstovou rychlost (μ_m) bakterií rodu *Enterococcus*



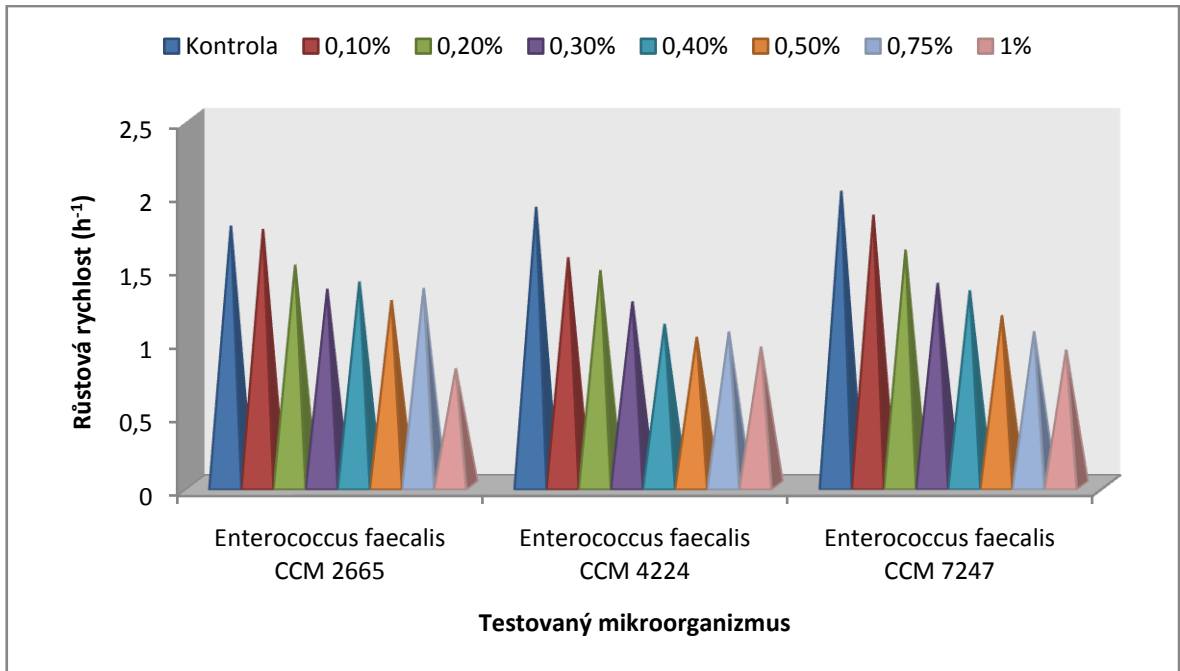
Obr. 22. Vliv S9 na růst bakterií rodu *Enterococcus* po 24 hodinách kultivace



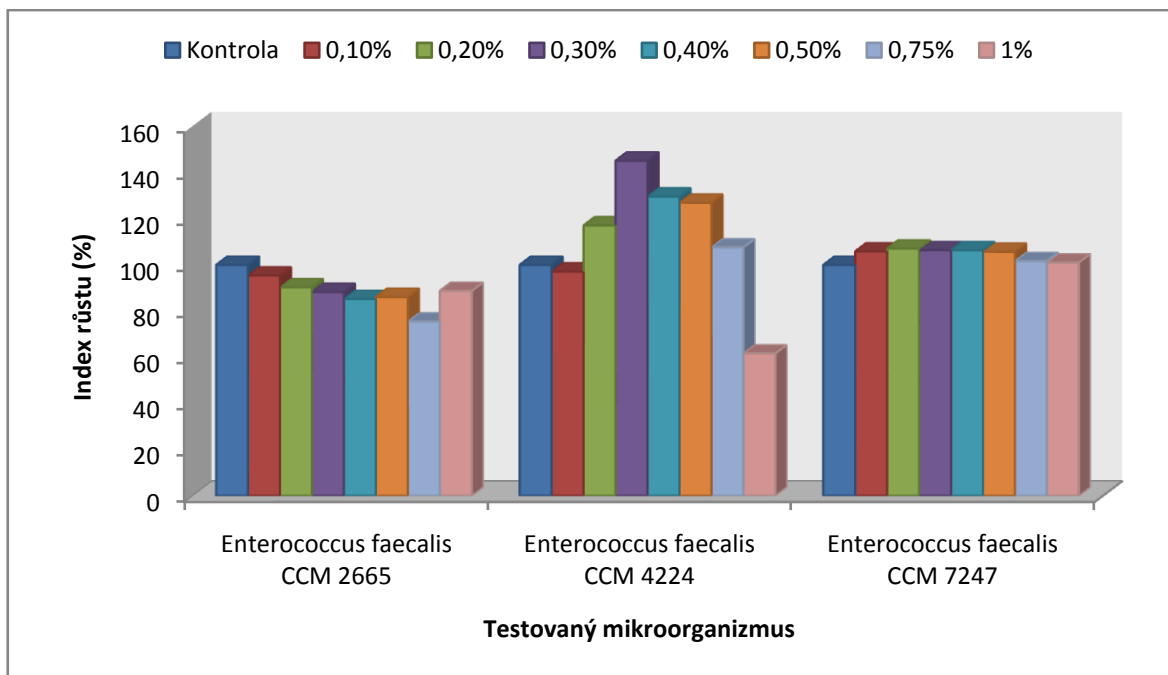
Obr. 23. Vliv S9 na lag fázi (λ) bakterií rodu *Enterococcus*



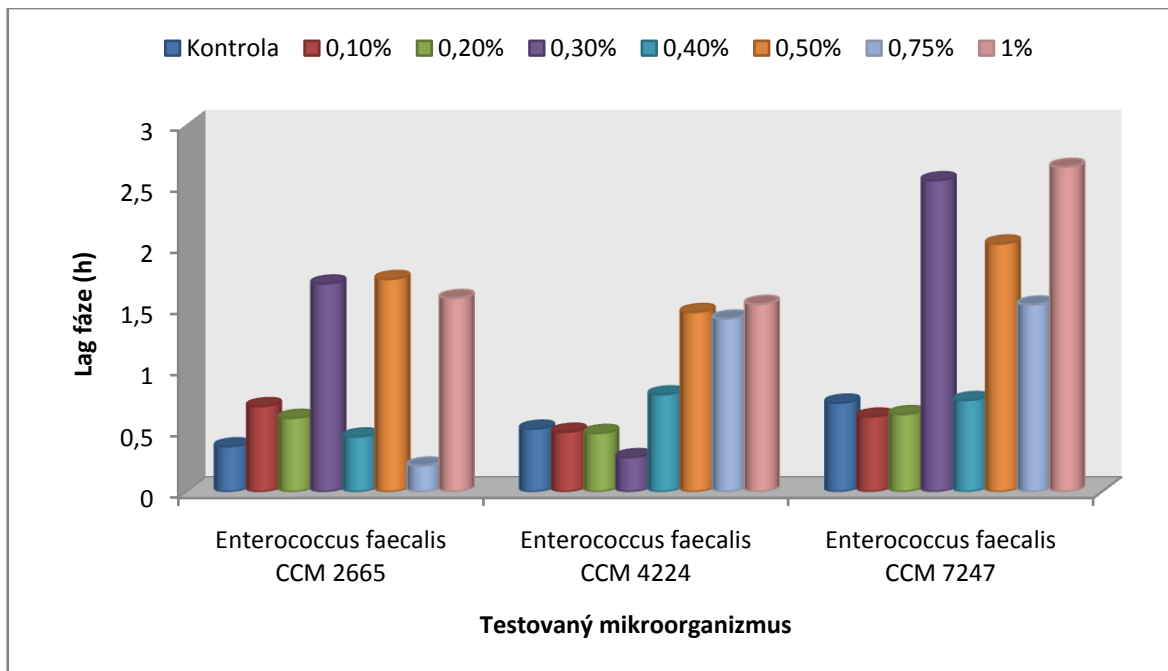
Obr. 24. Vliv S9 na růstovou rychlost (μ_m) bakterií rodu *Enterococcus*

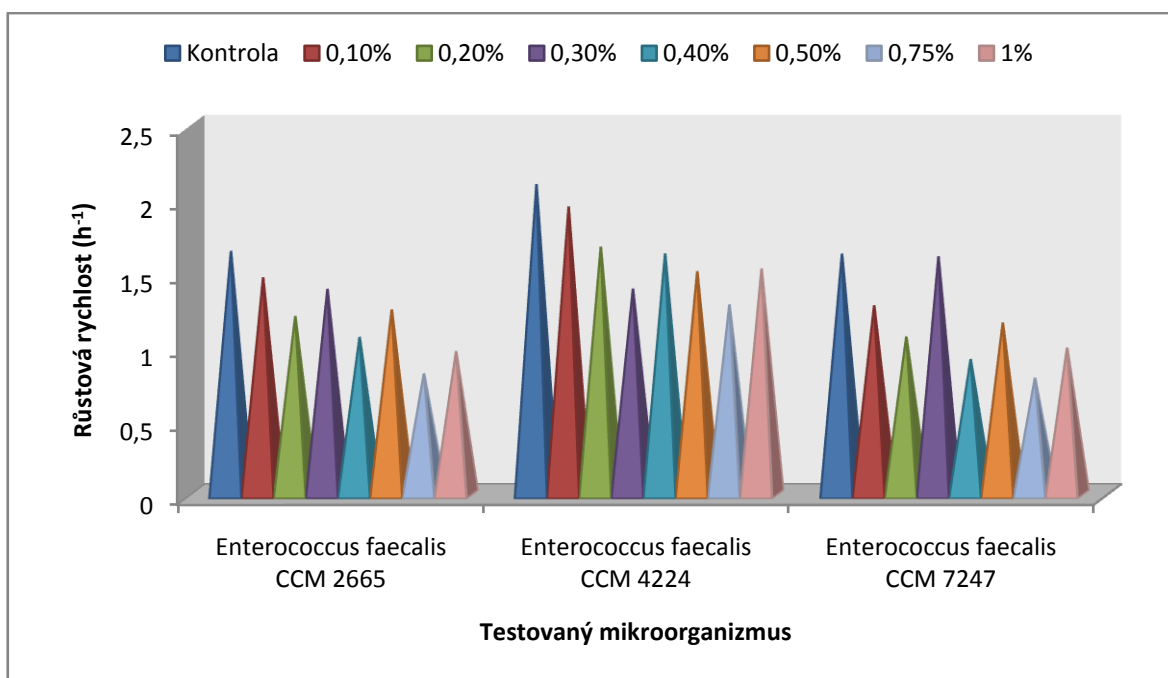


Obr. 25. Vliv 690 na růst bakterií rodu *Enterococcus* po 24 hodinách kultivace



Obr. 26. Vliv 690 na lag fázi (λ) bakterií rodu *Enterococcus*

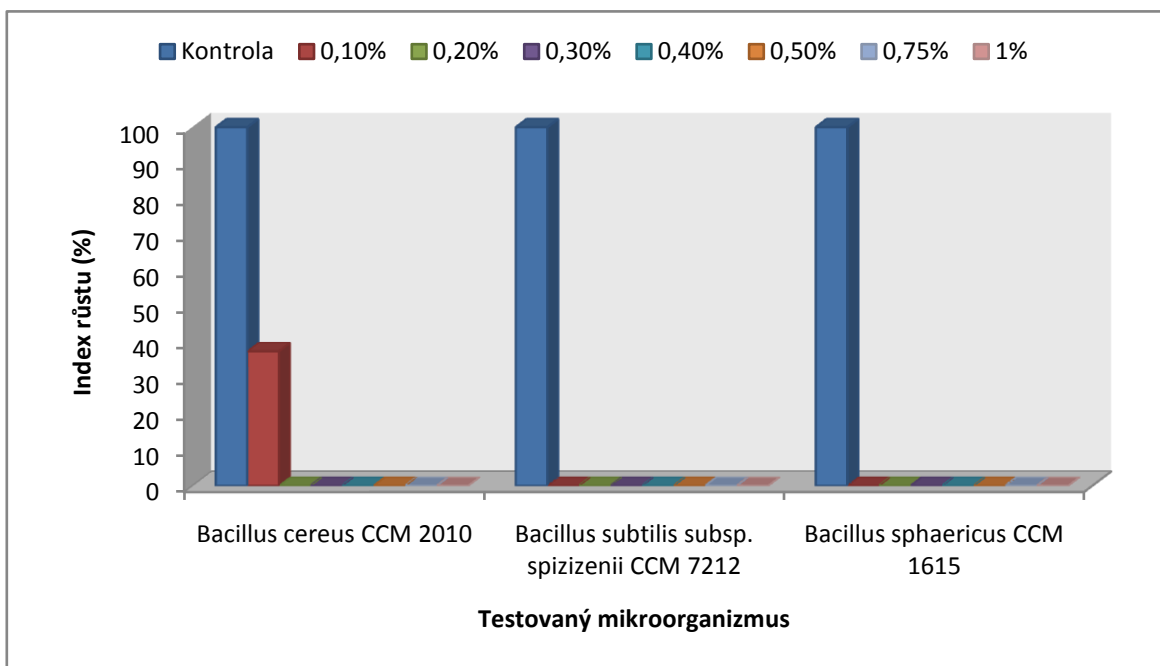
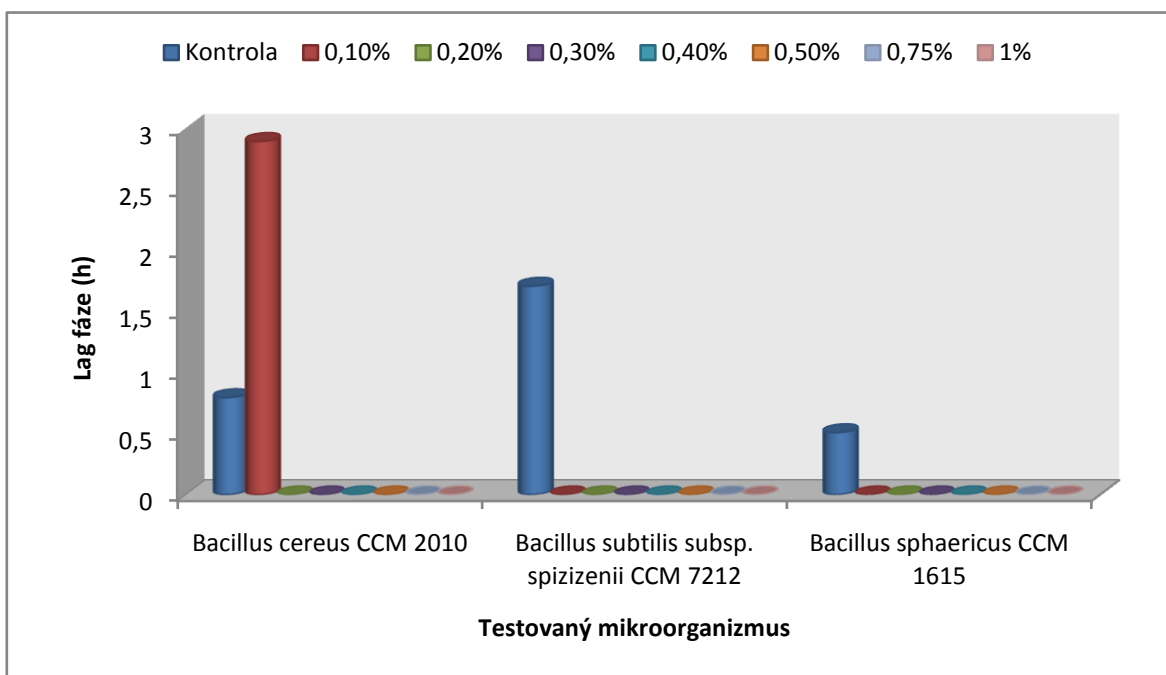


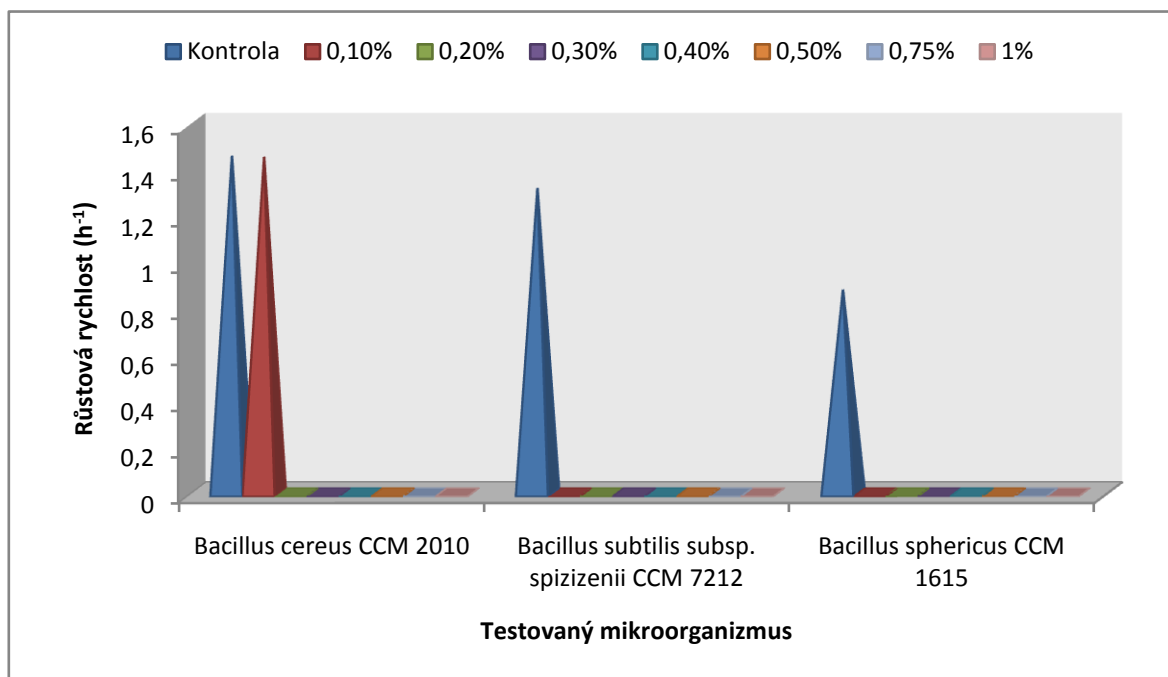
Obr. 27. Vliv 690 na růstovou rychlost (μ_m) bakterií rodu *Enterococcus*

9.1.3 Vliv fosforečnanů na růst bakterií rodu *Bacillus*

Vliv fosforečnanových solí na růst mikroorganismů byl zkoumán také u sporulujících bakterií. Účinky fosforečnanů byly testovány na třech kmenech bacilů (*Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 7212 a *Bacillus sphaericus* CCM 1615).

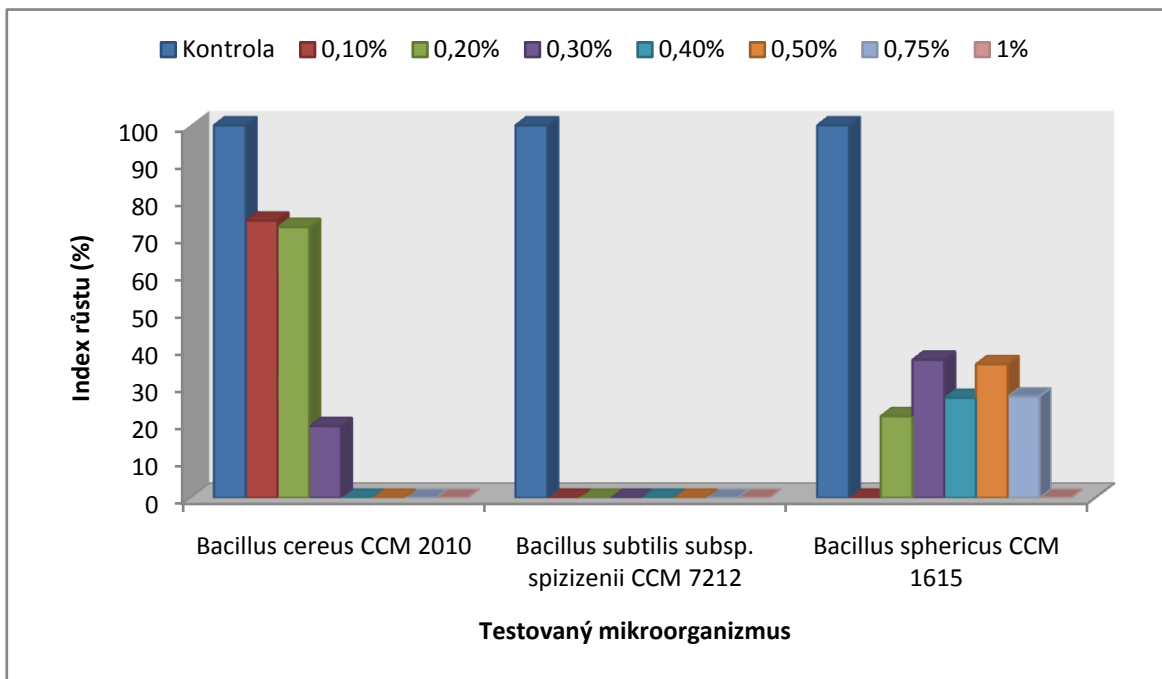
Největší inhibiční efekt na růst bakterií rodu *Bacillus* vykazovala sůl HBS (Obr. 28-30). Již v nejnižší testované koncentraci (0,1% w/v) dokázala tato sůl zcela inhibovat růst kmenů *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 7212 a *Bacillus sphaericus* CCM 1615. Stejná koncentrace výrazně snížila také nárůst *Bacillus cereus* CCM 2010 v porovnání s kontrolou a projevila se také v prodloužení lag fáze a snížení růstové rychlosti. Od koncentrace 0,2% w/v byl pak zcela inhibován i růst *Bacillus cereus* CCM 2010.

Obr. 28. Vliv HBS na růst bakterií rodu *Bacillus* po 24 hodinách kultivaceObr. 29. Vliv HBS na lag fázi (λ) bakterií rodu *Bacillus*

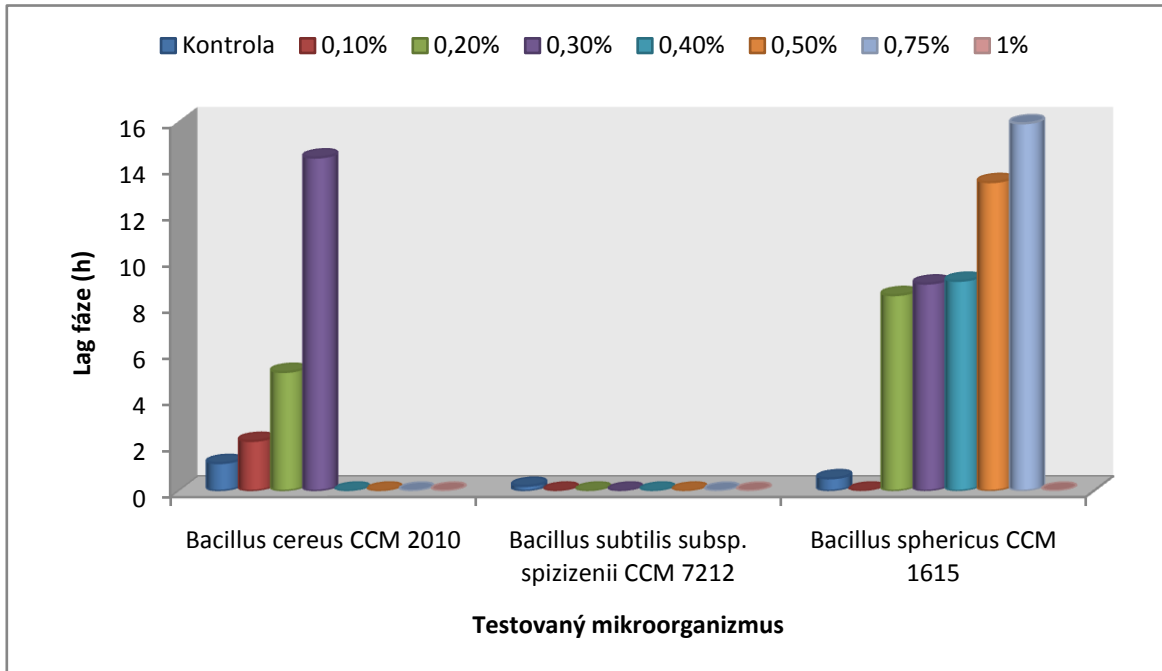
Obr. 30. Vliv HBS na růstovou rychlost (μ_m) bakterií rodu *Bacillus*

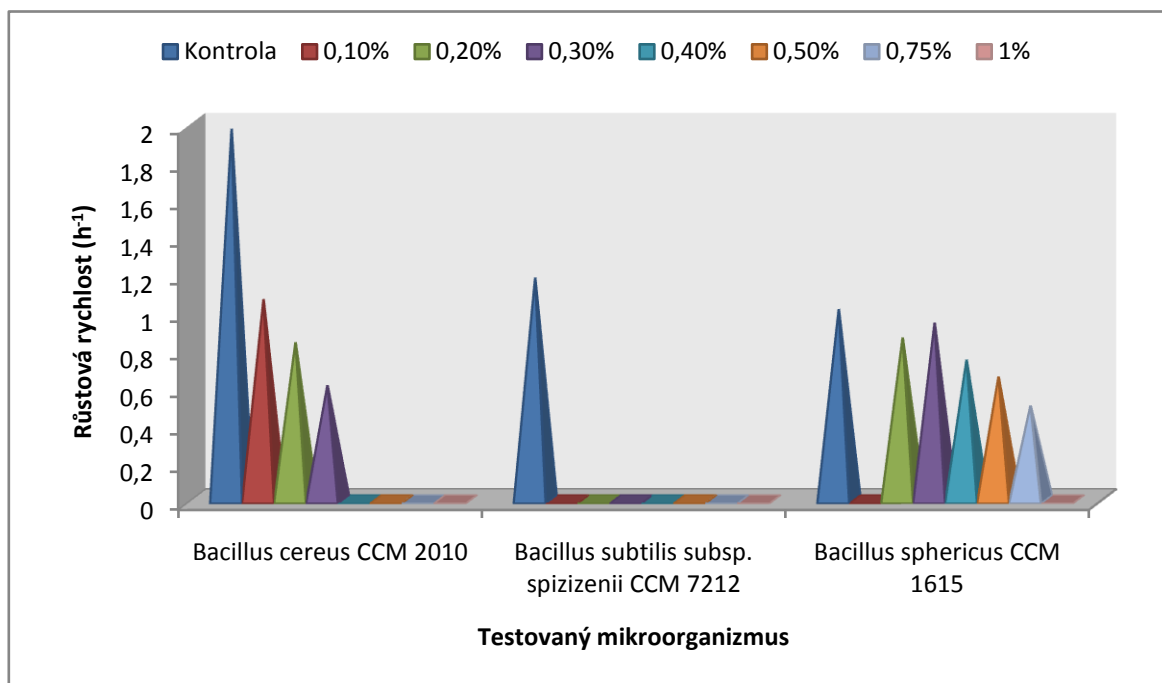
Nižší inhibiční účinek vykazovala sůl S9 (Obr. 31-33). V nejnižší testované koncentraci tato sůl zcela bránila růstu *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 7212. 0,1% w/v bránila také růstu buněk *Bacillus sphaericus* CCM 1615. Při vyšších koncentracích (0,2-0,75% w/v) byl pak u tohoto kmene bacilů pozorován významný inhibiční účinek (IR<40%) a nejvyšší testovaná (1% w/v) koncentrace pak zcela bránila nárůstu těchto mikroorganismů. Při kultivaci buněk *Bacillus sphaericus* CCM 1615 v přítomnosti soli došlo také k postupnému prodlužování lag fáze a zpomalování růstové rychlosti s rostoucí koncentrací soli. U bakterií *Bacillus cereus* CCM 2010 byla zjištěna úplná inhibice růstu od koncentrace 0,4% w/v. U nižších koncentrací byl zaznamenán prokazatelný inhibiční vliv na růst *Bacillus cereus* CCM 2010 pouze při koncentraci 0,3% w/v, kdy došlo k poklesu růstu více než o 80%. Současně došlo při této koncentraci k výraznému prodloužení lag fáze a poklesu růstové rychlosti oproti kontrole. U dvou nejnižších testovaných koncentrací se projevil inhibiční účinek S9 na růst *Bacillus cereus* CCM 2010 pouze v prodloužení lag fáze a snížení růstové rychlosti.

Obr. 31. Vliv S9 na růst bakterií rodu *Bacillus* po 24 hodinách kultivace



Obr. 32. Vliv S9 na lag fázi (λ) bakterií rodu *Bacillus*

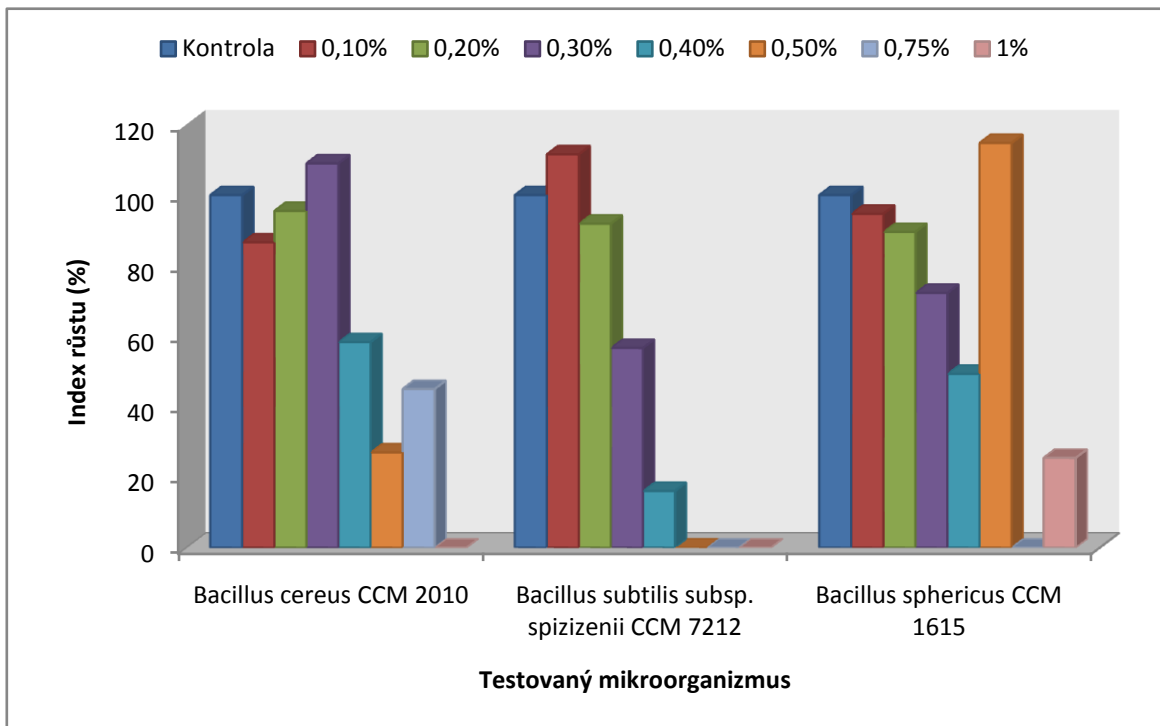


Obr. 33. Vliv S9 na růstovou rychlost (μ_m) bakterií rodu *Bacillus*

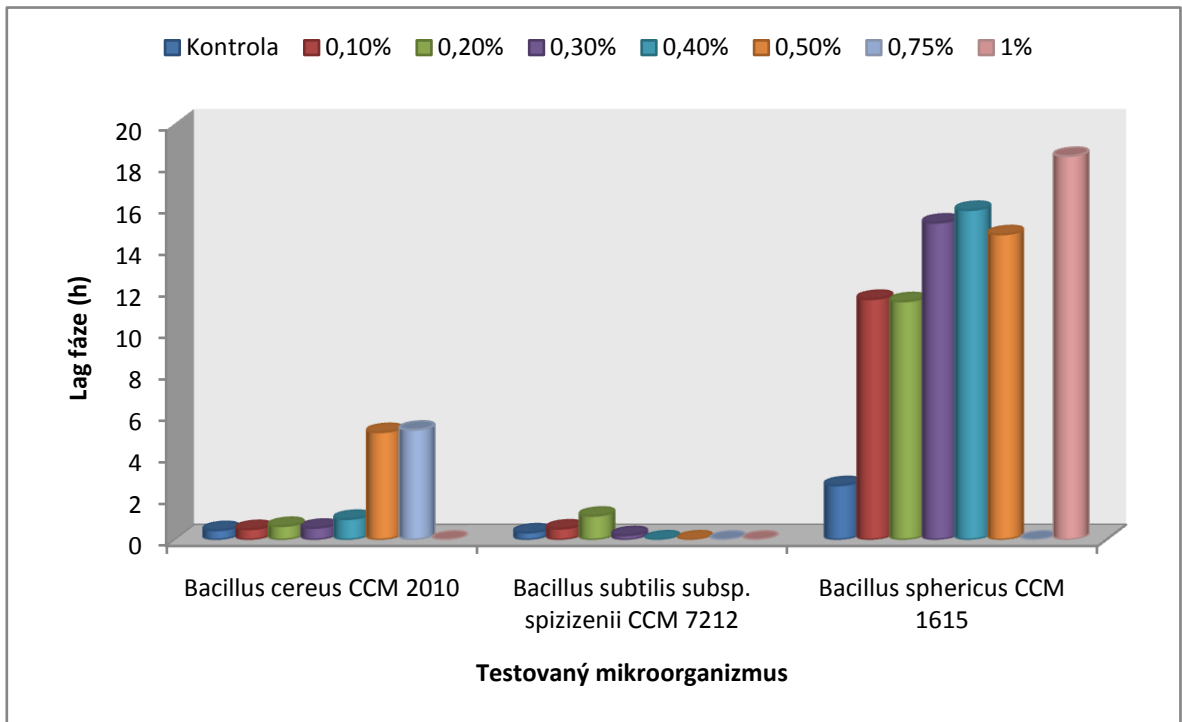
Nejmenší vliv na růst bakterií rodu *Bacillus* vykazovala sůl 690 (Obr. 34-36). Tato sůl vykazovala inhibiční účinky na růst bacilů až v nejvyšších testovaných koncentracích. Od koncentrace 0,5% w/v bránila 690 zcela růstu *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 7212. Koncentrace 0,3 a 0,4% w/v způsobily snížení optické denzity buněk *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 7212 v porovnání s kontrolou o cca 43 a 83%. Při těchto koncentracích došlo také snížení růstové rychlosti. Lag fáze se však od kontroly výrazně nelišila. Při nižších koncentracích se inhibiční účinek 690 na kmen *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 7212 projevil pouze ve snížení růstové rychlosti. Sůl 690 dokázala v nejvyšší testované koncentraci (1% w/v) zcela inhibovat také růst *Bacillus cereus* CCM 2010. Koncentrace 0,75, 0,5 a 0,4% w/v vedly ke snížení indexu růstu, postupnému prodlužování lag fáze a zpomalování růstové rychlosti. U nižších koncentrací nebyly zjištěny výraznější inhibiční účinky na růst *Bacillus cereus* CCM 2010. U kmenu *Bacillus sphaericus* CCM 1615 byly pozorovány výrazné inhibiční účinky 690 až u dvou nejvyšších testovaných koncentrací. Koncentrace 0,75% w/v úplně zabránila růstu *Bacillus sphaericus* CCM 1615. 1% w/v koncentrace výrazně snížila ($IR < 20$) narůst buněk po 24 hodinách kultivace. Při této koncentraci došlo také k významnému prodloužení lag fáze a snížení růstové rychlosti v porovnání se vzorkem bujónu, který neobsahoval sůl. Od koncentrace 0,1-0,4% w/v je patrný klesající trend růstu buněk v závislosti na rostoucí koncentraci. Při

těchto koncentracích došlo také k postupnému prodlužování lag fáze s rostoucí koncentrací, výrazný vliv na růstovou rychlost ale pozorován nebyl. Zajímavý je výrazný nárůst buněk *Bacillus sphaericus* CCM 1615 při koncentraci 0,5% w/v. Inhibiční účinek soli 690 se při této koncentraci projevil pouze v prodloužení lag fáze.

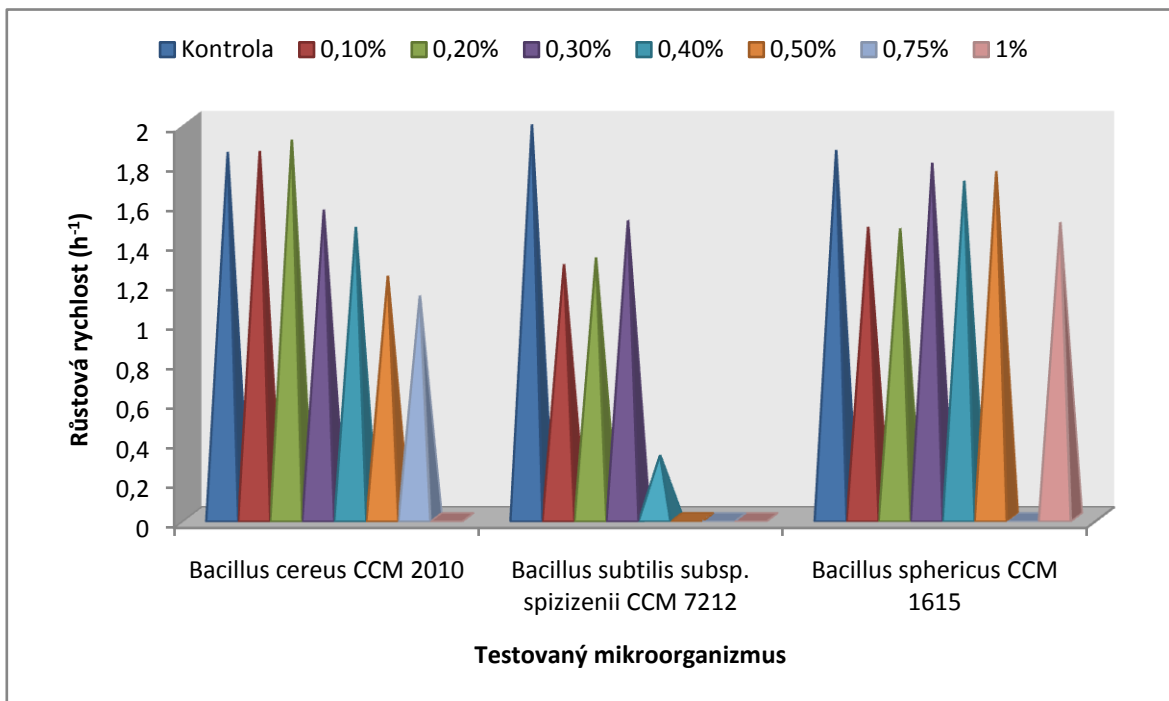
Obr. 34. Vliv 690 na růst bakterií rodu *Bacillus* po 24 hodinách kultivace



Obr. 35. Vliv 690 na lag fázi (λ) bakterií rodu *Bacillus*



Obr. 36. Vliv 690 na růstovou rychlost (μ_m) bakterií rodu *Bacillus*



Maier a kol. [38] zkoumali inhibiční účinky fosforečnanů s dlouhým řetězcem (JOHA HBS) na růst *Bacillus cereus*. Zjistili, že tyto fosforečnany brání růstu nejen vegetativních

buněk, u kterých došlo k jejich rozpadu už při koncentraci 0,1% w/v, ale i spor. Již od koncentrace 0,05% a 0,1% w/v tyto fosforečnany kompletně zabránily nárůstu spor bacilů. Vyšší koncentrace (1%) měly dokonce sporocidní účinek. Shodně s výsledky uvedenými v této práci lze tvrdit, že fosforečnany s dlouhými řetězci mají inhibiční účinky na růst bacilů již při koncentraci 0,1% w/v.

Antibakteriální účinek fosforečnanů byl popsán také u dalších sporulujících bakterií. Akhtar a kol. zkoumali inhibiční účinky fosforečnanových solí na růst *Clostridium perfringens*. Zjistili, že k inhibici těchto bakterií je potřeba vyšších koncentrací solí než je tomu u ostatních grampozitivních bakterií. Inhibiční účinky testovaných fosforečnanů na růst *Clostridium perfringens* bylz patrné od koncentrace 0,4% w/v. Stejná koncentrace byla také dostatečná k tomu, aby bránila sporulaci těchto mikroorganismů. 1% w/v koncentrace dokázala zabránit nárůstu vegetativních buněk ze spor [33]. Loessner a kol. zase zkoumali inhibiční účinky fosforečnanů na růst *Clostridium tyrobutyricum*. Objevili, že koncentrace 0,5-1% w/v dokázaly zabránit nárůstu těchto mikroorganismů [35].

Vzhledem k tomu, že fosforečnany dokáží zabránit výskytu i odolných spor, lze uvažovat o jejich využití jako antimikrobiálních činidel při výrobě masných výrobků. Stejně tak by se dalo využít jejich antimikrobiálního působení při výrobě tvrdých sýrů k prevenci pozdního duření vyvolaného bakteriemi rodu *Clostridium*.

9.1.4 Vliv fosforečnanů na růst gramnegativních bakterií

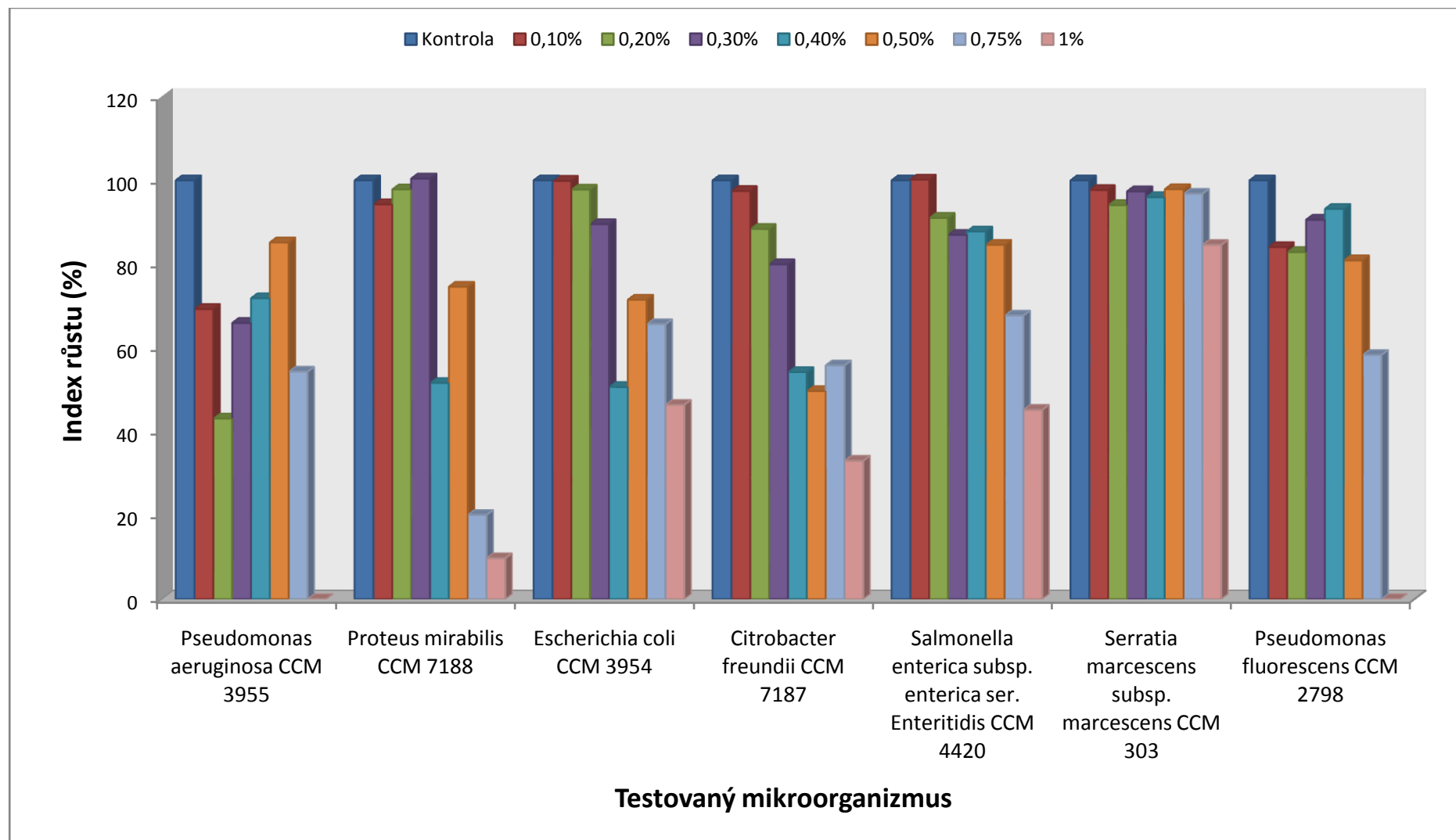
U gramnegativních bakterií nebyl pozorován výrazný inhibiční účinek fosforečnanů na jejich růst. HBS vykazovala patrný inhibiční účinek až ve dvou nejvyšších testovaných koncentracích (Obr. 37-39), kdy 1% w/v HBS zcela bránila růstu bakteriím *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 a *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798. U bakterií *Proteus mirabilis* CCM 7188, *Escherichia coli* CCM 3954, *Citrobacter freundii* CCM 7187 a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 způsobila tato koncentrace snížení nárůstu ($IR < 50$) buněk, prodloužení jejich lag fáze a snížení růstové rychlosti v porovnání s kontrolou. O něco nižší inhibiční vliv vykazovala 0,75% w/v koncentrace, při níž byla optická denzita buněk nižší průměrně o 30-70%. I při této koncentraci došlo u všech testovaných gramnegativních bakterií k prodloužení lag fáze a snížení růstové rychlosti oproti kontrole. Jako nejodolnější vůči účinkům fosforečnanových solí se ukázala být *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303, která byla rezistentní i proti působení HBS ve všech testovaných koncentracích.

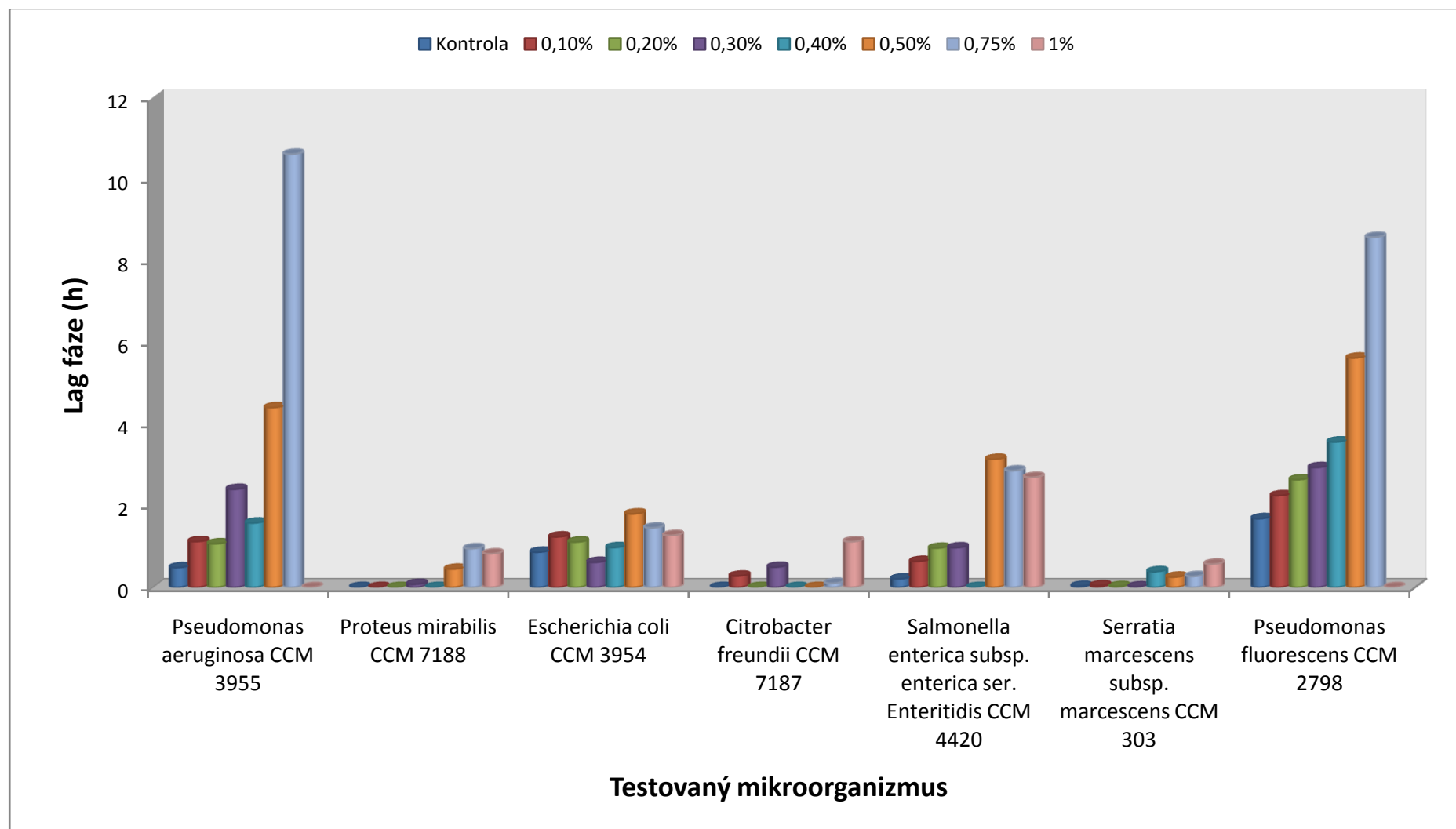
Fosforečnanové soli S9 a 690 neměly většinou výraznější vliv na růst gramnegativních bakterií ani v nejvyšších testovaných koncentracích (Obr 40-45).

Jako nejcitlivější k účinkům fosforečnanových solí byly vyhodnoceny bakterie rodu *Pseudomonas*. U těchto bakterií byl zaznamenán inhibiční účinek při kultivaci v přítomnosti HBS a byl prokázán i jistý vliv S9 a 690 na jejich růst. U *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 došlo při použití S9 ve dvou nejvyšších testovaných koncentracích ke snížení optické denzity ($IR < 60$) a zároveň došlo k prodloužení lag fáze a snížení růstové rychlosti oproti kontrole. Na růst *Pseudomonas fluorescens* vykazovala větší inhibiční efekt sůl 690. Tato sůl ve dvou nejvyšších koncentracích významně bránila nárůstu buněk *Pseudomonas fluorescens* během kultivace a způsobila prodloužení jejich lag fáze. Působení 690 nemělo vliv na růstovou rychlost *Pseudomonas fluorescens*, která byla u dvou nejvyšších koncentrací v porovnání s kontrolou naopak vyšší. Citlivost pseudomonád k účinkům fosforečnanových solí je celkem překvapivá vzhledem k tomu, že jsou považovány za odolné k okolnímu prostředí díky své genetické výbavě a stavbě buňky.

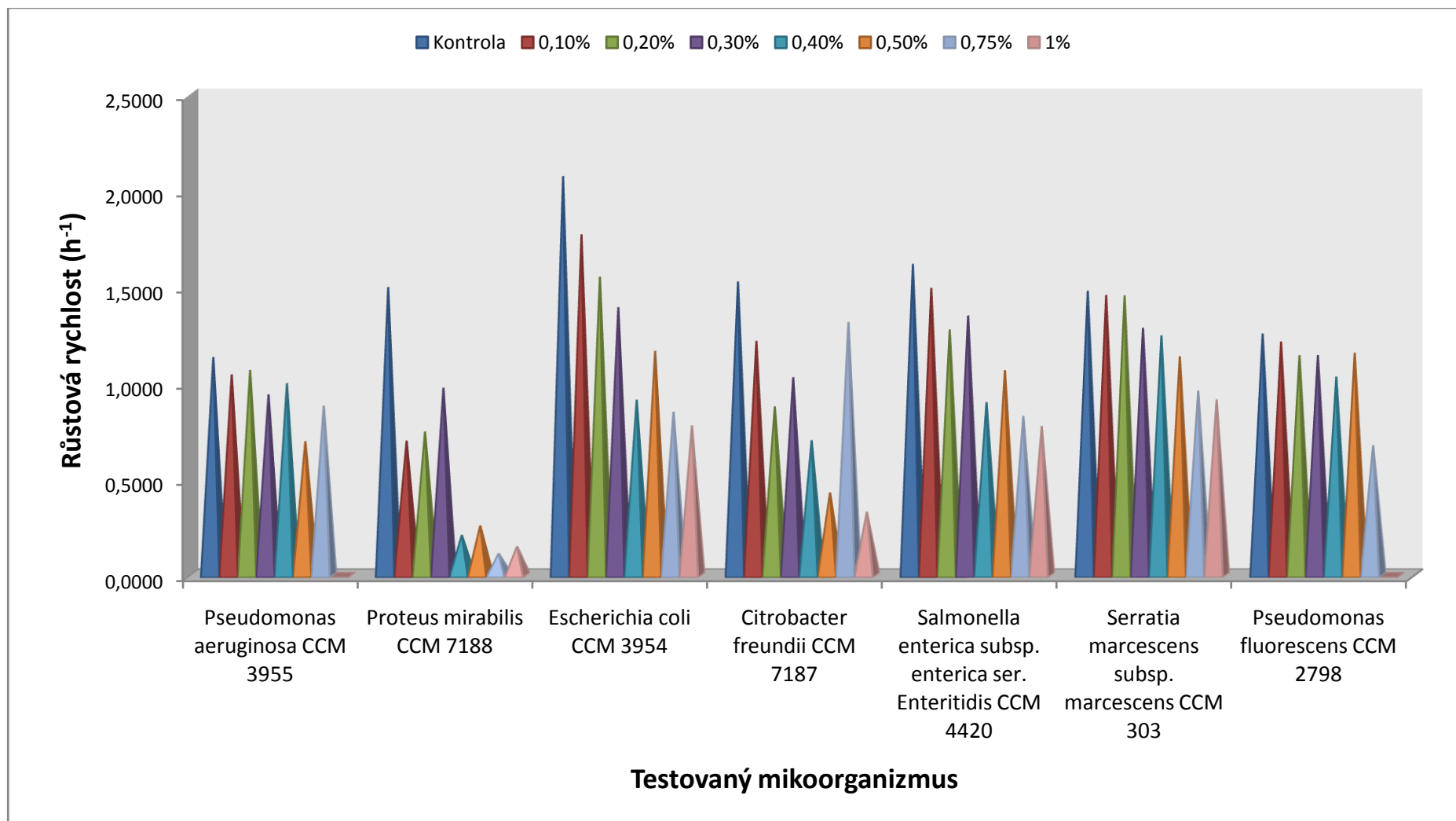
Působení fosforečnanových solí na růst gramnegativních bakterií se zatím věnovalo jen málo studií. Výzkumem účinku fosforečnanů na růst gramnegativních se zabývali například Elliott a kol. [41], kteří zkoumali vliv fosforečnanů na růst pseudomonád z drůbežního masa. Zjistili, že k účinkům fosforečnanových solí jsou citlivější nefluorescentní kmeny pseudomonád. Dále zjistili, že fosforečnany zcela nezabrání růstu pseudomonád v drůbežím mase, ale výrazně prodlužují dobu jejich nárůstu a tím se zvýší skladovatelnost drůbežního masa. Výsledky zmíněného výzkumu podpořily výsledky získané touto prací, která také popisuje jisté inhibiční účinky fosforečnanů na růst pseudomonád.

Obr. 37. Vliv HBS na růst gramnegativních bakterií po 24 hodinách kultivace

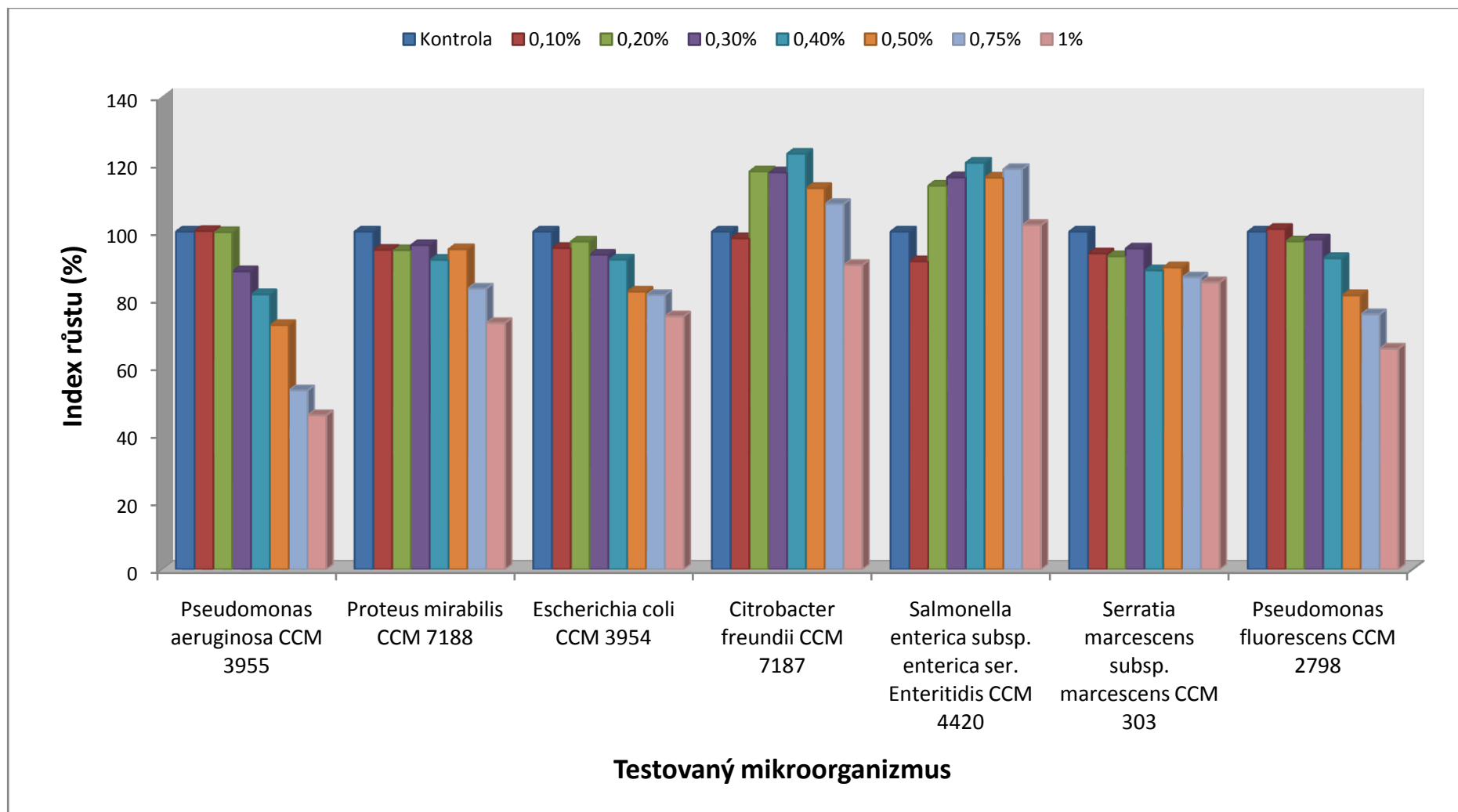


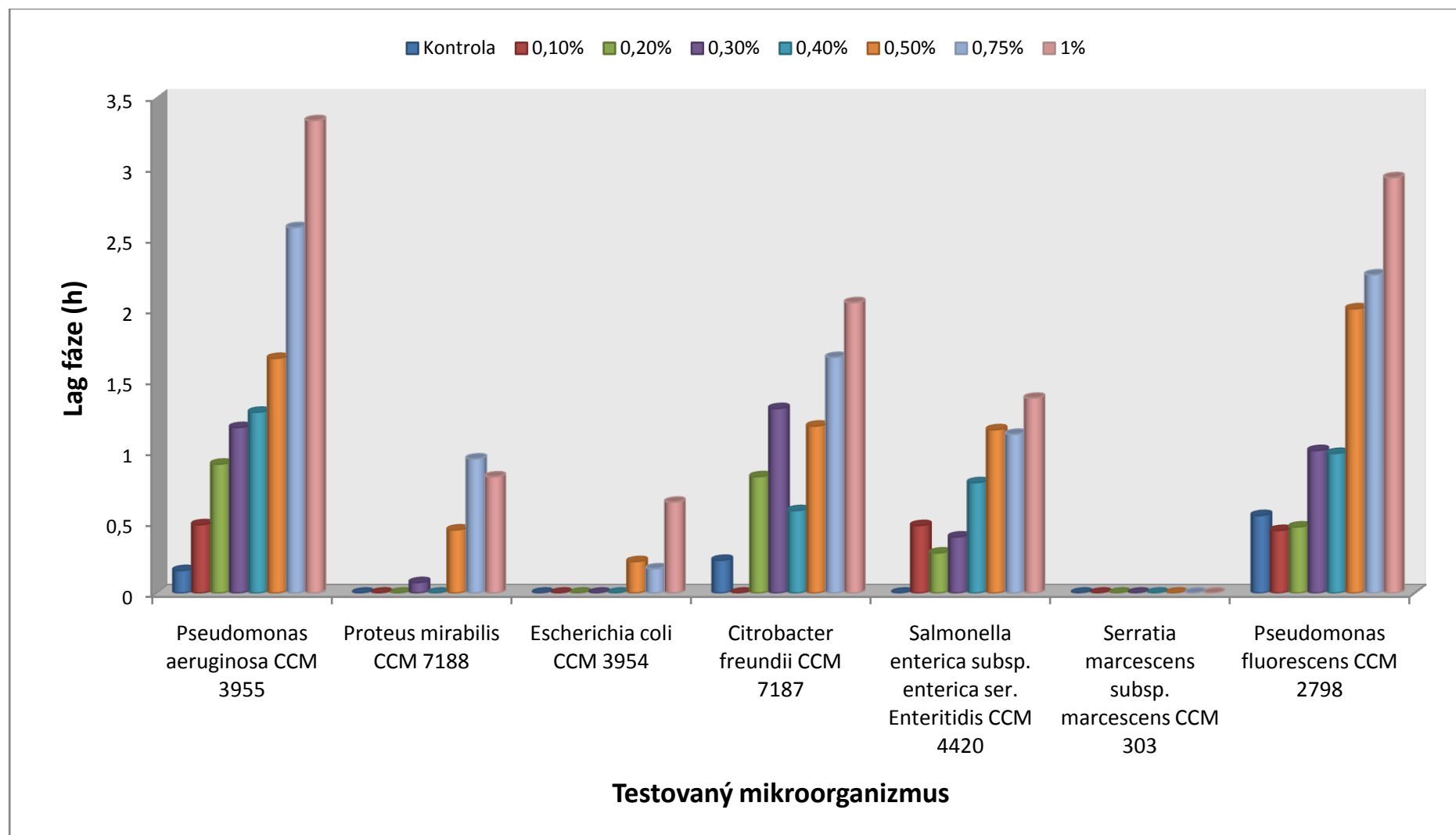
Obr. 38. Vliv HBS na lag fázi (λ) gramnegativních bakterií

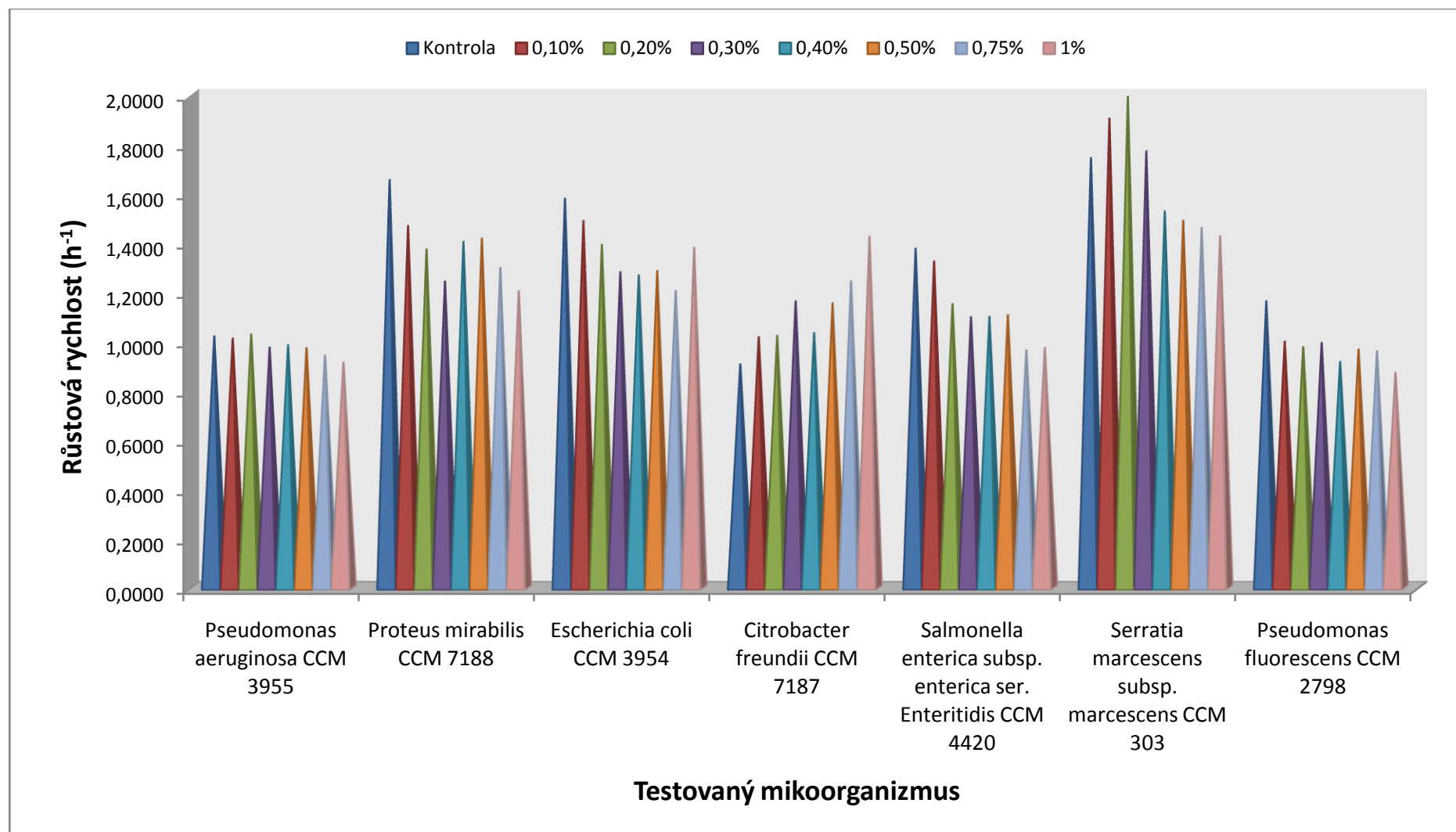
Obr. 39. Vliv HBS na růstovou rychlost (μ_m) gramnegativních bakterií



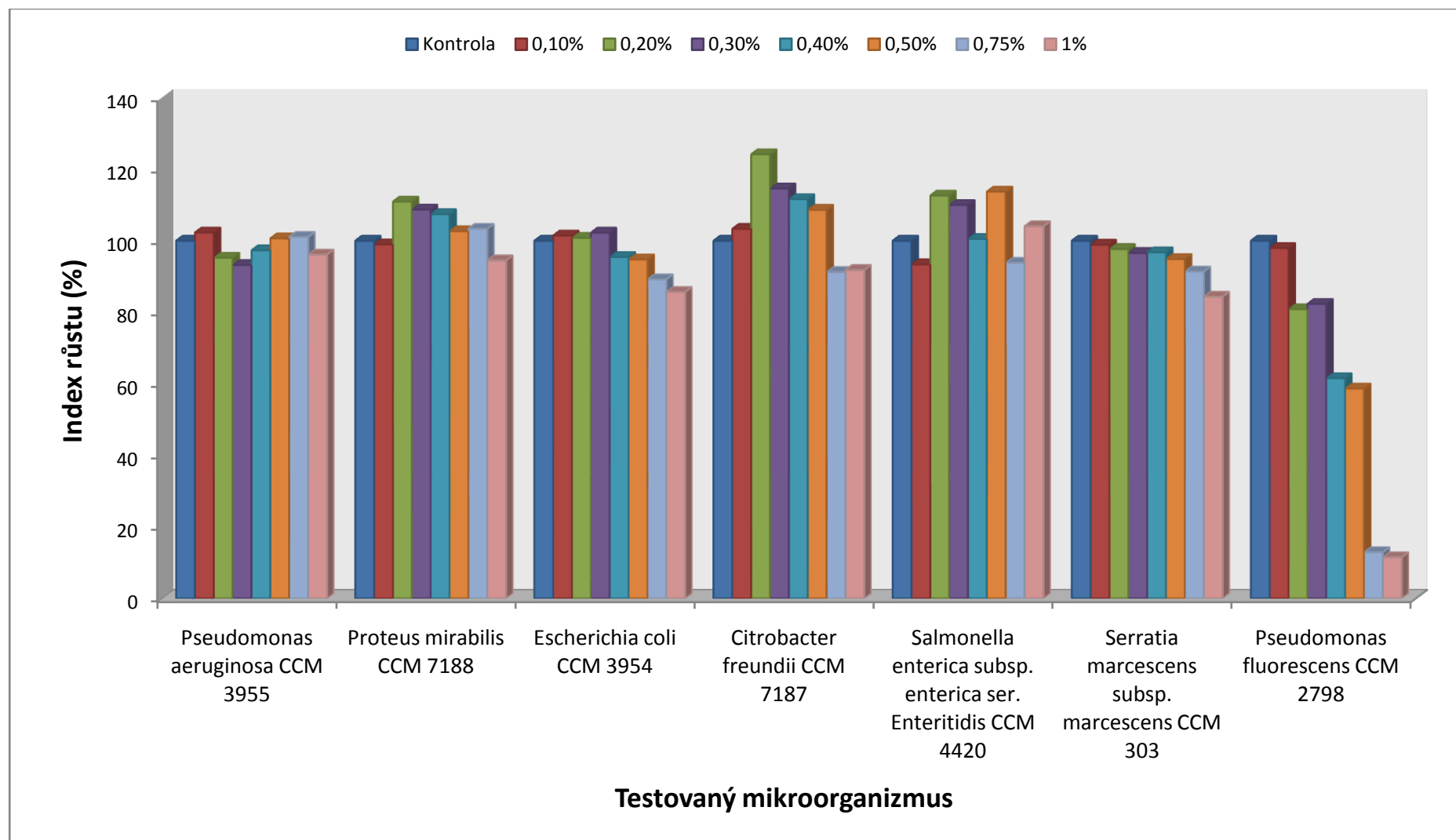
Obr. 40. Vliv S9 na růst gramnegativních bakterií po 24 hodinách kultivace

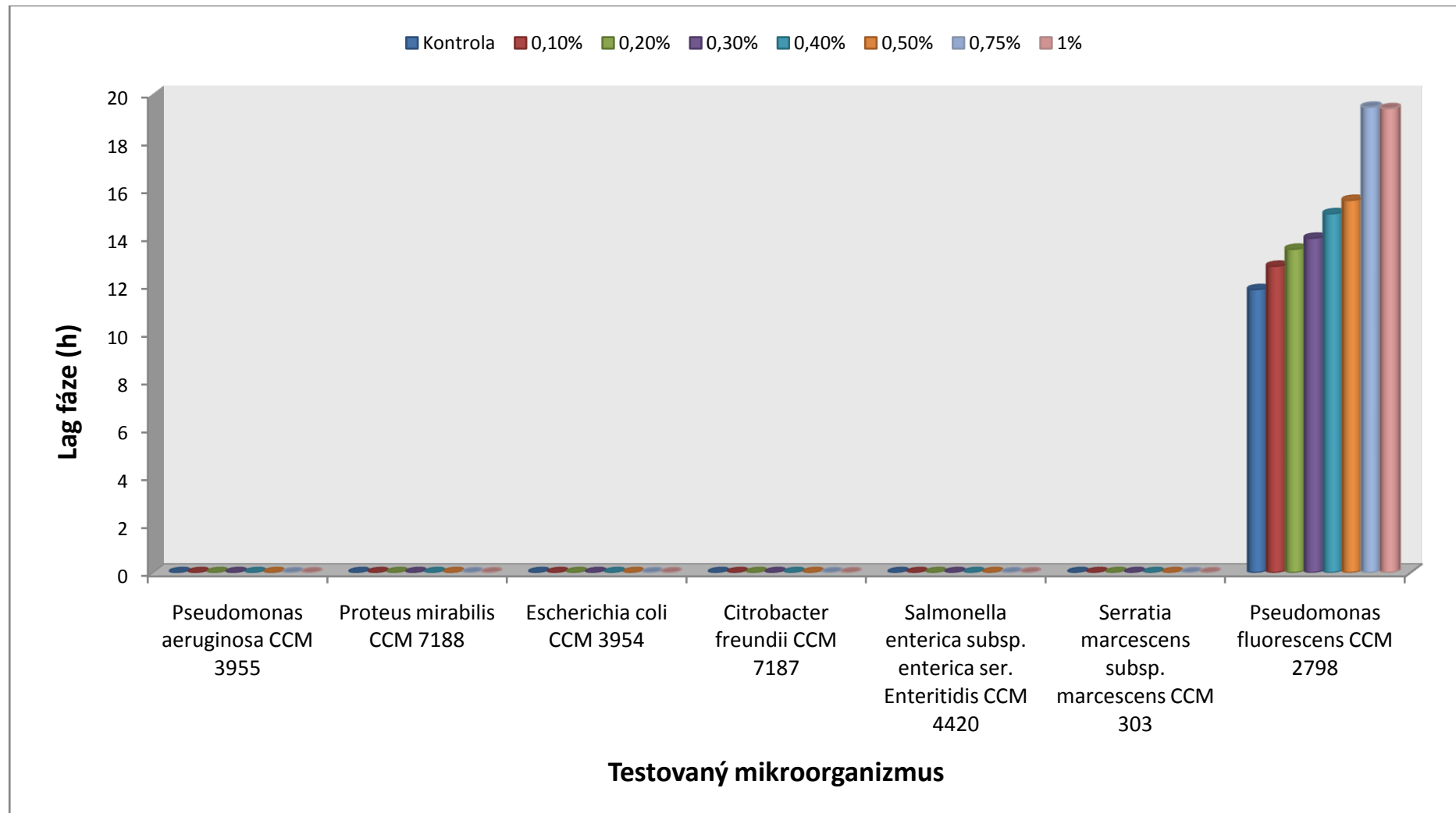


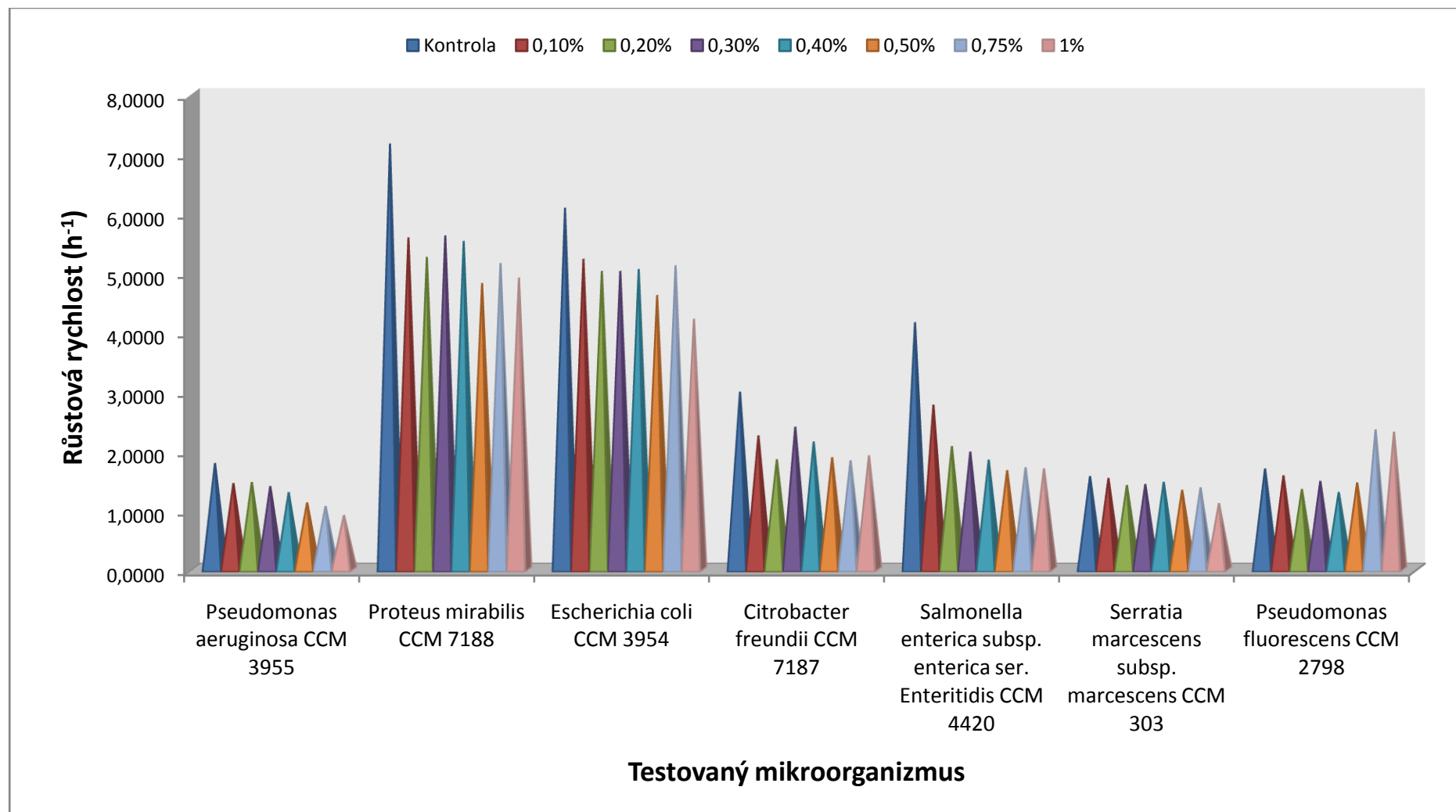
Obr. 41. Vliv S9 na lag fázi (λ) gramnegativních bakterií

Obr. 42. Vliv S9 na růstovou rychlost (μ_m) gramnegativních bakterií

Obr. 43. Vliv 690 na růst gramnegativních bakterií po 24 hodinách kultivace



Obr. 44. Vliv 690 na lag fázi (λ) gramnegativních bakterií

Obr. 45. Vliv 690 na růstovou rychlost (μ_m) gramnegativních bakterií

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo sledovat inhibiční účinky tří komerčních fosforečnanových solí v různém kondenzačním stupni (HBS, S9, 690) na růst vybraných mikroorganismů.

Na základě výsledků získaných měření lze tvrdit, že k účinkům fosforečnanů jsou výrazně citlivější grampozitivní bakterie. Ze tří testovaných fosforečnanových solí vykazovala výrazný inhibiční účinek na růst grampozitivních pouze HBS, která obsahuje směs polyfosfosforečnanů s vysokým kondenzačním stupněm a orthofosforečnanů. Nižší antimikrobiální účinek byl zjištěn u S9 a nepatrný vliv na růst grampozitivních bakterií byl pozorován u 690. Je tedy patrné, že se antimikrobiální účinek fosforečnanů zvyšuje s délkou jejich řetězce. Nejcitlivější bakterií k účinkům zkoumaných solí byl *Micrococcus luteus*. Naopak nejrezistentnějšími grampozitivními bakteriemi byly bakterie rodu *Enterococcus*, na jejichž růst neměly fosforečnany významný vliv.

U gramnegativních bakterií nebyl zjištěn výrazný účinek fosforečnanů na jejich růst. HBS působila inhibičně až ve dvou nejvyšších testovaných koncentracích. Působení solí S9 a 690 nemělo vliv na růst gramnegativních bakterií. Slabé inhibiční účinky těchto dvou solí byly pozorovány pouze ve dvou nejvyšších koncentracích na bakterie rodu *Pseudomonas*, které se ukázaly jako nejcitlivější gramnegativní bakterie k účinkům fosforečnanových solí. Nejodolnější gramnegativní bakterií je naopak *Serratia marcescens*, které byla rezistentní i k nevyšším testovaným koncentracím HBS.

Závěrem je možno říci, že zkoumané komerční fosforečnanové soli vykazují významné antimikrobiální účinky a to zejména na grampozitivní bakterie. Další zkoumání těchto inhibičních vlastností fosforečnanů by tedy mohlo vést ke zvýšení jejich využití v potravinářském průmyslu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] POSPÍŠILOVÁ, Zuzana. *Detekce sporulujících bakterií ve vybraných sterilovaných pokrmech*. [s.l.], 2007. 52 s. Bakalářská práce.
- [2] SUÁREZ, V.B., et al. Inhibitory Activity of Phosphates on Molds Isolated from Foods and Food Processing Plants. *Journal of Food Protection*. 2005, no. 11, s. 2475-2479.
- [3] LEE, Ruby, et al. Antibacterial Mechanism of Long-Chain Polyphosphates in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*. 1994, no. 4, s. 289-294.
- [4] *Fosfát* [online]. 1996-2009, 17.12.2007 [cit. 2008-06-06]. Dostupný z WWW: <<http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/251480-fosforecnany>>.
- [5] *Fosforečnany* [online]. 2009 [cit. 2009-04-01]. Dostupný z WWW: <<http://leccos.com/index.php/clanky/fosforecnany>>.
- [6] BUŇKA, František, BUŇKOVÁ, Leona. Úloha tavicích solí při výrobě tavených sýrů. In *Potravinářská Revue*. [s.l.] : [s.n.], 2009. s. 68.
- [7] MOLINS, R.A. *Phosphates in Food*. [s.l.] : [s.n.], 1991. 261 s.
- [8] *Fosfát* [online]. 2002, 7.2.2009 [cit. 2008-06-23]. Dostupný z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Fosf%C3%A1t>>.
- [9] HÁJEK, Bohumil, KLIKORKA, Jiří, VOTINSKÝ, Jiří. *Obecná a anorganická chemie*. [s.l.] : [s.n.], 1989. 592 s.
- [10] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. [s.l.] : [s.n.], 2002. 304 s.
- [11] HVÍZDALOVÁ, Iva. *Masné výrobky* [online]. 2007 [cit. 2009-02-21]. Dostupný z WWW: <http://www.agronavigator.cz/UserFiles/File/Agronavigator/masn_vrobky.pdf>.
- [12] HVÍZDALOVÁ, Iva. *Látky používané v německém masném průmyslu* [online]. 2005 [cit. 2009-02-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=37632&ids=418>>.
- [13] *Emulgátory - Stanovisko k letáku Kliniky dětské onkologie University Düsseldorf* [online]. 2008 [cit. 2009-02-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.bezlepkovadieta.cz/?url=pridatne-latky-E-clanky&clanek=4902>>.
- [14] ČECHOVÁ, Leona, JANALÍKOVÁ, Magda. *Obecná mikrobiologie*. [s.l.] : [s.n.], 2007. 190 s.

- [15] FASSATIOVÁ, Olga. *Plísňe a vláknité houby v technické mikrobiologii*. [s.l.] : [s.n.], 1979. 211 s.
- [16] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologické zkoumání potravin*. [s.l.] : [s.n.], 1987. 104 s.
- [17] *Plíseň* [online]. 2009 [cit. 2008-10-06]. Dostupný z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Pl%C3%ADse%C5%88>>.
- [18] *Welcome to the Microbiology Web Site!* [online]. 2004 [cit. 2009-04-08]. Dostupný z WWW: <<http://webnt.calhoun.edu/distance/internet/Natural/bio220-collier/index.htm>>.
- [19] KNABEL, S.J., WALKER, H.W., HARTMAN, P.A. Inhibition of *Aspergillus flavus* and Selected Gram-positive Bacteria by Chelation of Essential Metal Cations by Polyphosphates. *Journal of Food Protection*. 1991, no. 54, s. 360-365.
- [20] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. [s.l.] : [s.n.], 1995. 361 s.
- [21] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. [s.l.] : [s.n.], 2006. 270 s.
- [22] GÖRNER, Fridrich, VALÍK, L'ubomír. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. [s.l.] : [s.n.], 2004. 528 s.
- [23] *Staphylococcus aureus Bacteria* [online]. 1997-2009 [cit. 2009-04-08]. Dostupný z WWW: <http://www.biology4kids.com/extras/dtop_micro/7821.html>.
- [24] LEE, Ruby, et al. Bactericidal and Bacteriolytic Effects of Selected Food-Grade Phosphates, Using *Staphylococcus aureus* as a Model System. *Journal of Food Protection*. 1994, no. 4, s. 276-283.
- [25] *Listérie* [online]. 2008 [cit. 2009-03-22]. Dostupný z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/List%C3%A9rie>>.
- [26] *Listeria monocytogenes* [online]. 2009 [cit. 2008-09-22]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Listeria_monocytogenes>.
- [27] *Chemical changes turn milk protein into a Listeria killer* [online]. 2006 [cit. 2009-03-21]. Dostupný z WWW: <http://www.sflorg.com/sciencenews/scn080706_01.html>.

- [28] ZAIKA, Laura, SCULLEN, Joseph, FANELLI, Joseph. Growth Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Sodium Polyphosphate as Affected by Polyvalent Metal Ions. *Journal of Food Science*. 1997, no. 4, s. 867.
- [29] *Přehled změn probíhající v potravinářských surovinách a potravinách během zpracování a skladování* [online]. 2009 [cit. 2006-10-25]. Dostupný z WWW: <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/studium/KP/KP1.pdf>.
- [30] GREENWOOD, David. *Lékařská mikrobiologie : přehled infekčních onemocnění : patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. [s.l.] : [s.n.], 1999. 686 s.
- [31] KOMPRDA, Tomáš. *Obecná hygiena potravin*. [s.l.] : [s.n.], 2007. 148 s.
- [32] *Clostridium perfringens* [online]. 2009 [cit. 2009-03-31]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium_perfringens>.
- [33] AKHTAR, Saeed, PAREDES-SABJA, Daniel, SARKER, Mahfuzur. Inhibitory effects of polyphosphates on *Clostridium perfringens* growth, sporulation and spore outgrowth. *Food Microbiology*. 2008, no. 25, s. 802-808.
- [34] *Clostridium tyrobutyricum* [online]. 2008 [cit. 2008-09-24]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium_tyrobutyricum>.
- [35] LOESSNER, Martin, et al. Long-Chain Polyphosphates Inhibit Growth of *Clostridium tyrobutyricum* in Processed Cheese Spreads. *Journal of Food Protection*. 1997, no. 5, s. 493-498.
- [36] *Bacillus cereus* [online]. 2001 [cit. 2006-11-18]. Dostupný z WWW: <<http://kolar-jiri.sweb.cz>>.
- [37] *Bacillus cereus PROJECT* [online]. 2009 [cit. 2009-04-08]. Dostupný z WWW: <<http://www.stop-readymeals.com/phdi/p1.nsf/supppages/1866?opendocument&=6>>.
- [38] MAIER, Simon, SCHERER, Siegfried, LOESSNER, Martin. Long-Chain Polyphosphate Causes Cell Lysis and Inhibits *Bacillus cereus* Septum Formation, Which Is Dependent on Divalent Cations. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, no. 9, s. 3942-3949.

- [39]ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Pseudomonas aeruginosa* [online]. 2007 [cit. 2009-02-26]. Dostupný z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=P041>.
- [40]*Pseudomonas Aeruginosa (P. Pyocyanea)* [online]. 2008 [cit. 2009-04-08]. Dostupný z WWW: <<http://bryanking.net/tag/pseudomonas-aeruginosa>>.
- [41]ELLIOTT, Paul, STRAKA, Robert, GARIBALDI, John. *Polyphosphate Inhibition of Growth of Pseudomonads From Poultry Meat* [online]. 1964 [cit. 2009-03-20]. Dostupný z WWW: <<http://aem.asm.org/cgi/reprint/12/6/517.pdf>>.
- [42]ZWIETERING, M.H., et al. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Enviromental Microbiology*. 1990, no. 6, s. 1875-1881.
- [43]MATSUOKA, A., TSUTSUMI, M., WATANABE, T. Inhibitory Effect of Hexametaphosphate on the Growth of Staphylococcus aureus. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 1995, no. 5, s. 588-594.
- [44]RADKOWSKI, M. Teh Effect of Polyphosphates on Streptococci Isolated from Mastitis Cases. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2006, no. 2, s. 135-138.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

E338	kyselina fosforečná
E341	fosforečnany vápenaté
E450	difosforečnany
E452	polyfosforečnany
ATP	adenosintrifosfát
PSE	bledé, měkké, vodnaté maso
TAS	trifosforečnan sodný
PAS	kyselý pyrofosforečnan sodný
TRI	tripolyfosforečnan sodný
N	neutrální pyrofosfosforečnan sodný
SPG	polyfosforečnan sodný glassy
UP	ultrafosforečnan sodný
SPP	polyfosforečnan sodný
BHI	brain heart infusion (kultivační médium)
a_w	vodní aktivita
CPE	enterotoxin <i>Clostridium perfringens</i> typu A
STPP	tripolyfosforečnan tetrasodný
TSPP	pyrofosforečnan tetrasodný
SAPP	kyselý polyfosforečnan sodný
CFU	počet mikroorganismů
HP	hexametafosforečnan

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Struktura fosfátové skupiny [8]	10
Obr. 2. Anorganický hydrogenfosfát HPO_4^{2-} ; barevné značení: P (fialová); O (červená); H (bílá) [8].....	11
Obr. 3. <i>Penicillium</i> [18]	17
Obr. 4. <i>Staphylococcus aureus</i> [23]	19
Obr. 5. <i>Listeria monocytogenes</i> [27]	21
Obr. 6. <i>Clostridium perfringens</i> [32]	23
Obr. 7. <i>Bacillus cereus</i> [37]	27
Obr. 8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [40]	29
Obr. 9. Parametry růstu testovaných bakterií [42].....	38
Obr. 10. Vliv HBS na růst <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732 a <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953 po 24 hodinách kultivace.....	41
Obr. 11. Vliv HBS na lag fázi (λ) <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732 a <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953	41
Obr. 12. Vliv HBS na růstovou rychlost (μ_m) <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732 a <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953.....	42
Obr. 13. Vliv S9 na růst <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732 a <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953 po 24 hodinách kultivace.....	42
Obr. 14. Vliv S9 na lag fázi (λ) <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732 a <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953	43
Obr. 15. Vliv S9 na růstovou rychlost (μ_m) <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732 a <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953.....	43
Obr. 16. Vliv 690 na růst <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732 a <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953 po 24 hodinách kultivace.....	44
Obr. 17. Vliv 690 na lag fázi (λ) <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732 a <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953	44
Obr. 18. Vliv 690 na růstovou rychlost (μ_m) <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732 a <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953.....	45
Obr. 19. Vliv HBS na růst bakterií rodu <i>Enterococcus</i> po 24 hodinách kultivace.....	47
Obr. 20. Vliv HBS na lag fázi (λ) bakterií rodu <i>Enterococcus</i>	47
Obr. 21. Vliv HBS na růstovou rychlost (μ_m) bakterií rodu <i>Enterococcus</i>	48
Obr. 22. Vliv S9 na růst bakterií rodu <i>Enterococcus</i> po 24 hodinách kultivace	48

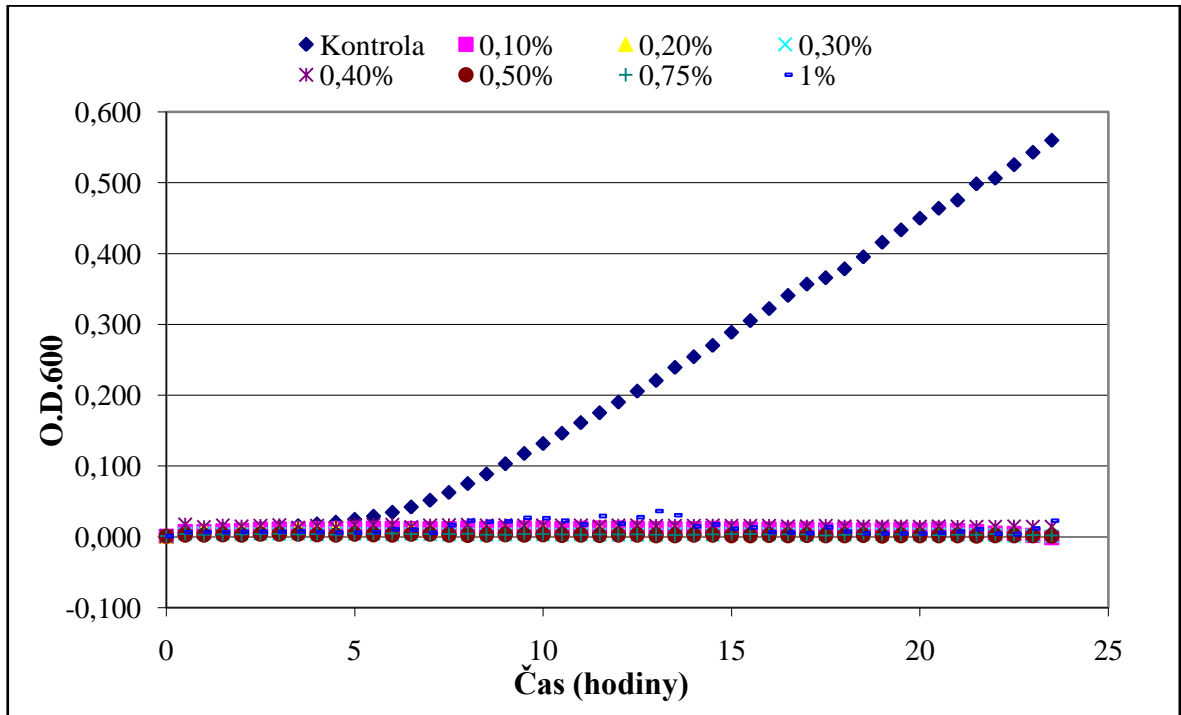
Obr. 23. Vliv S9 na lag fázi (λ) bakterií rodu <i>Enterococcus</i>	49
Obr. 24. Vliv S9 na růstovou rychlost (μ_m) bakterií rodu <i>Enterococcus</i>	49
Obr. 25. Vliv 690 na růst bakterií rodu <i>Enterococcus</i> po 24 hodinách kultivace.....	50
Obr. 26. Vliv 690 na lag fázi (λ) bakterií rodu <i>Enterococcus</i>	50
Obr. 27. Vliv 690 na růstovou rychlost (μ_m) bakterií rodu <i>Enterococcus</i>	51
Obr. 28. Vliv HBS na růst bakterií rodu <i>Bacillus</i> po 24 hodinách kultivace.....	52
Obr. 29. Vliv HBS na lag fázi (λ) bakterií rodu <i>Bacillus</i>	52
Obr. 30. Vliv HBS na růstovou rychlost (μ_m) bakterií rodu <i>Bacillus</i>	53
Obr. 31. Vliv S9 na růst bakterií rodu <i>Bacillus</i> po 24 hodinách kultivace	54
Obr. 32. Vliv S9 na lag fázi (λ) bakterií rodu <i>Bacillus</i>	54
Obr. 33. Vliv S9 na růstovou rychlost (μ_m) bakterií rodu <i>Bacillus</i>	55
Obr. 34. Vliv 690 na růst bakterií rodu <i>Bacillus</i> po 24 hodinách kultivace	56
Obr. 35. Vliv 690 na lag fázi (λ) bakterií rodu <i>Bacillus</i>	57
Obr. 36. Vliv 690 na růstovou rychlost (μ_m) bakterií rodu <i>Bacillus</i>	57
Obr. 37. Vliv HBS na růst gramnegativních bakterií po 24 hodinách kultivace	60
Obr. 38. Vliv HBS na lag fázi (λ) gramnegativních bakterií	61
Obr. 39. Vliv HBS na růstovou rychlost (μ_m) gramnegativních bakterií.....	62
Obr. 40. Vliv S9 na růst gramnegativních bakterií po 24 hodinách kultivace.....	63
Obr. 41. Vliv S9 na lag fázi (λ) gramnegativních bakterií.....	64
Obr. 42. Vliv S9 na růstovou rychlost (μ_m) gramnegativních bakterií	65
Obr. 43. Vliv 690 na růst gramnegativních bakterií po 24 hodinách kultivace.....	66
Obr. 44. Vliv 690 na lag fázi (λ) gramnegativních bakterií.....	67
Obr. 45. Vliv 690 na růstovou rychlost (μ_m) gramnegativních bakterií	68

SEZNAM PŘÍLOH

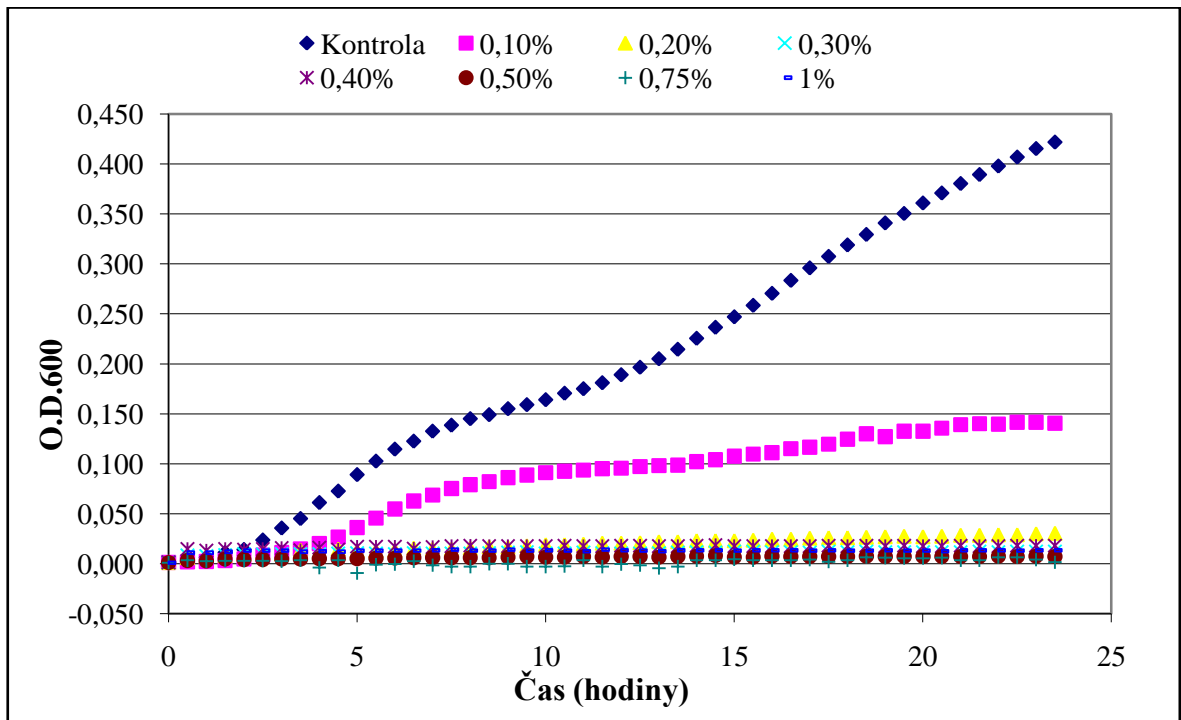
Příloha PI A: Vliv HBS na růst <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732.....	78
Příloha PI B: Vliv HBS na růst <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953	78
Příloha PI C: Vliv HBS na růst <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010	79
Příloha PI D: Vliv HBS na růst <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> CCM.....	79
Příloha PI E: Vliv HBS na růst <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188	80
Příloha PI F: Vliv HBS na růst <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis CCM 4420	80
Příloha PII A: Vliv S9 na <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732.....	81
Příloha PII B: Vliv S9 na růst <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010.....	81
Příloha PII C: Vliv S9 na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665	82
Příloha PII D: Vliv S9 na růst <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955.....	82
Příloha PII E: Vliv S9 na růst <i>Escherichia coli</i> CCM 3954	83
Příloha PII F: Vliv S9 na růst <i>Pseudomonas fluorescens</i> CCM 2798	83
Příloha III A: Vliv 690 na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224.....	84
Příloha III B: Vliv 690 na růst <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953.....	84
Příloha III C: Vliv 690 na růst <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010.....	85
Příloha III D: Vliv 690 na růst <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	85
Příloha III E: Vliv 690 na růst <i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> CCM 303	86
Příloha III F: Vliv 690 na růst <i>Escherichia coli</i> CCM 3954.....	86

PŘÍLOHA P I: VLIV HBS NA RŮST MIKROORGANIZMŮ

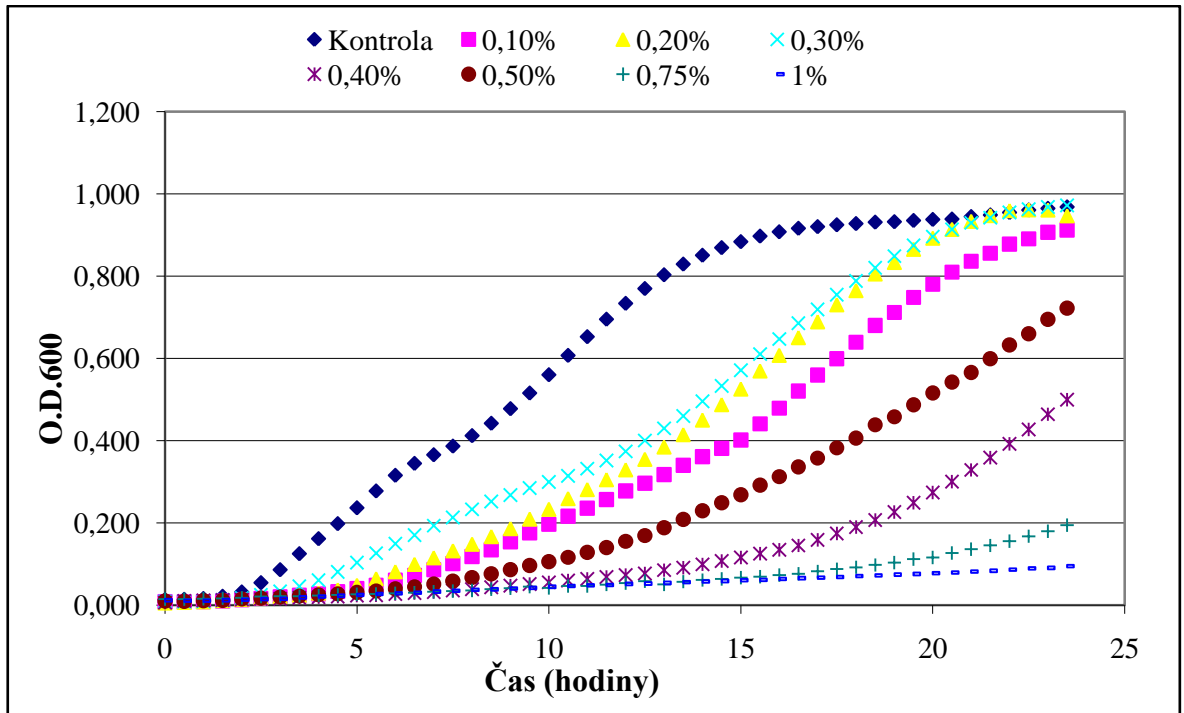
Příloha PI A: Vliv HBS na růst *Micrococcus luteus* CCM 732



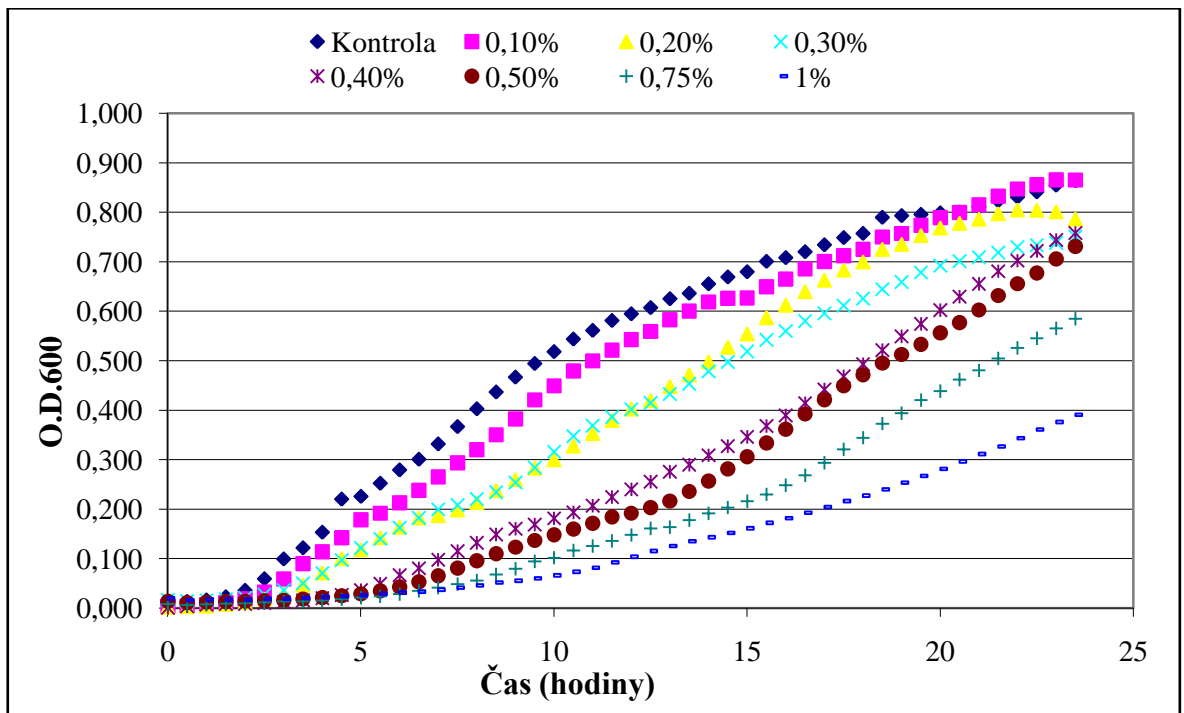
Příloha PI B: Vliv HBS na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953



Příloha PI E: Vliv HBS na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188

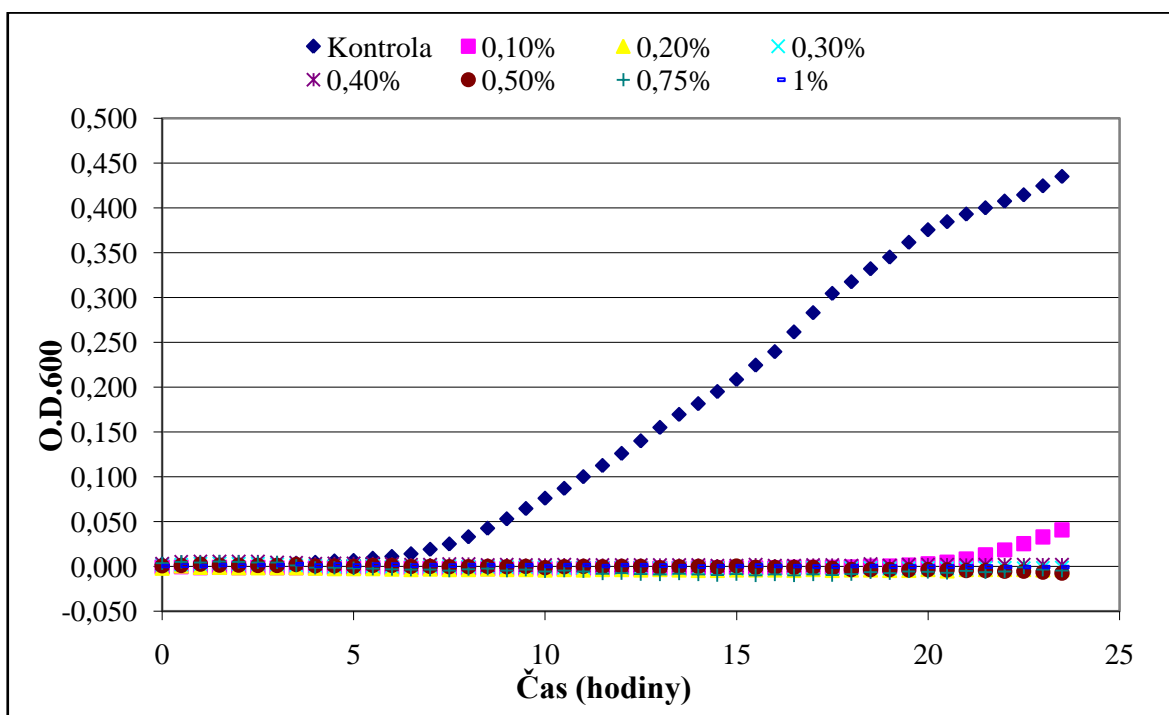


Příloha PI F: Vliv HBS na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

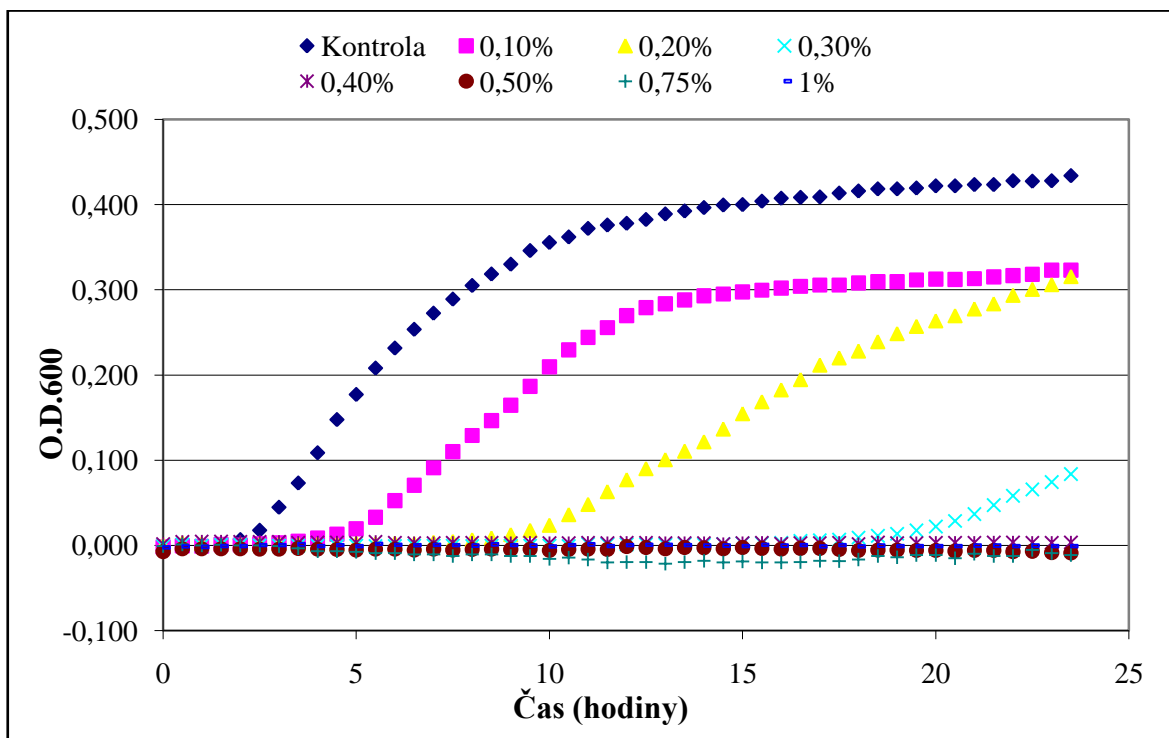


PŘÍLOHA PII: VLIV S9 NA RŮST MIKROORGANIZMŮ

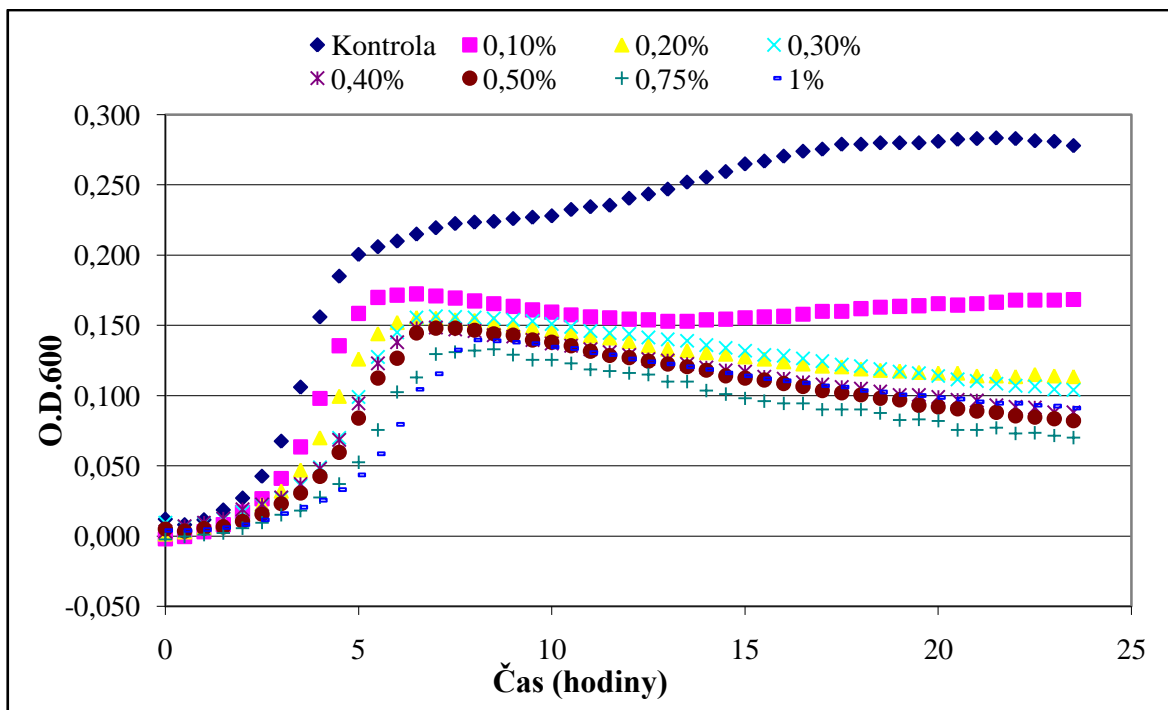
Příloha PII A: Vliv S9 na *Micrococcus luteus* CCM 732



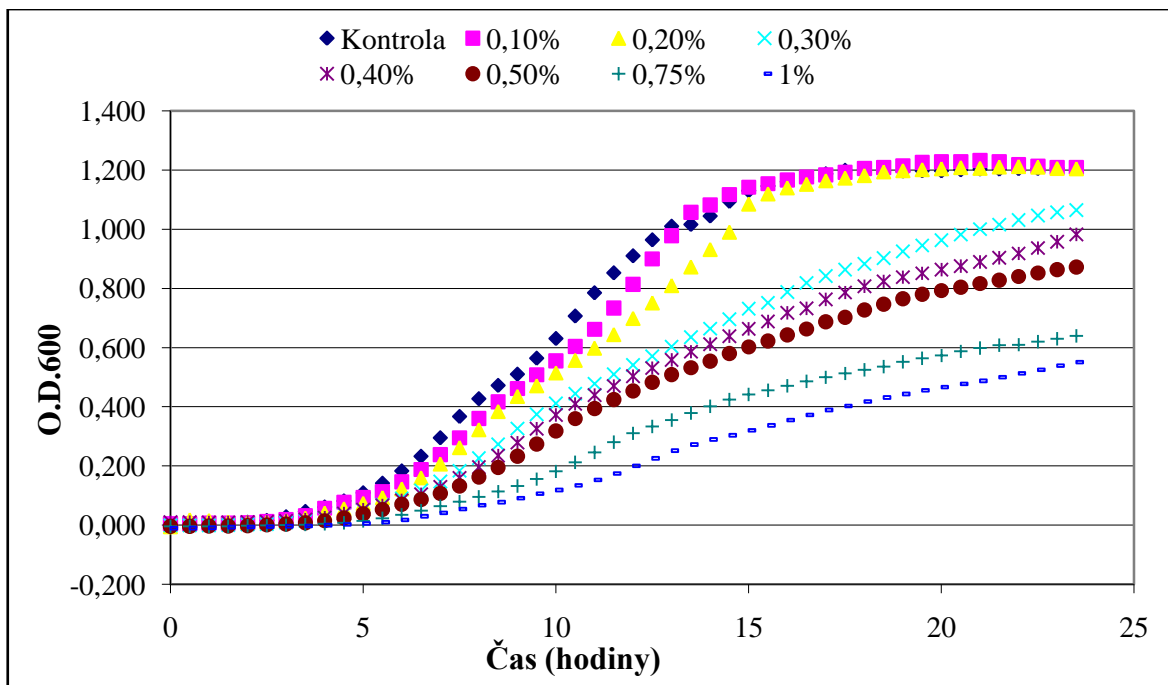
Příloha PII B: Vliv S9 na růst *Bacillus cereus* CCM 2010



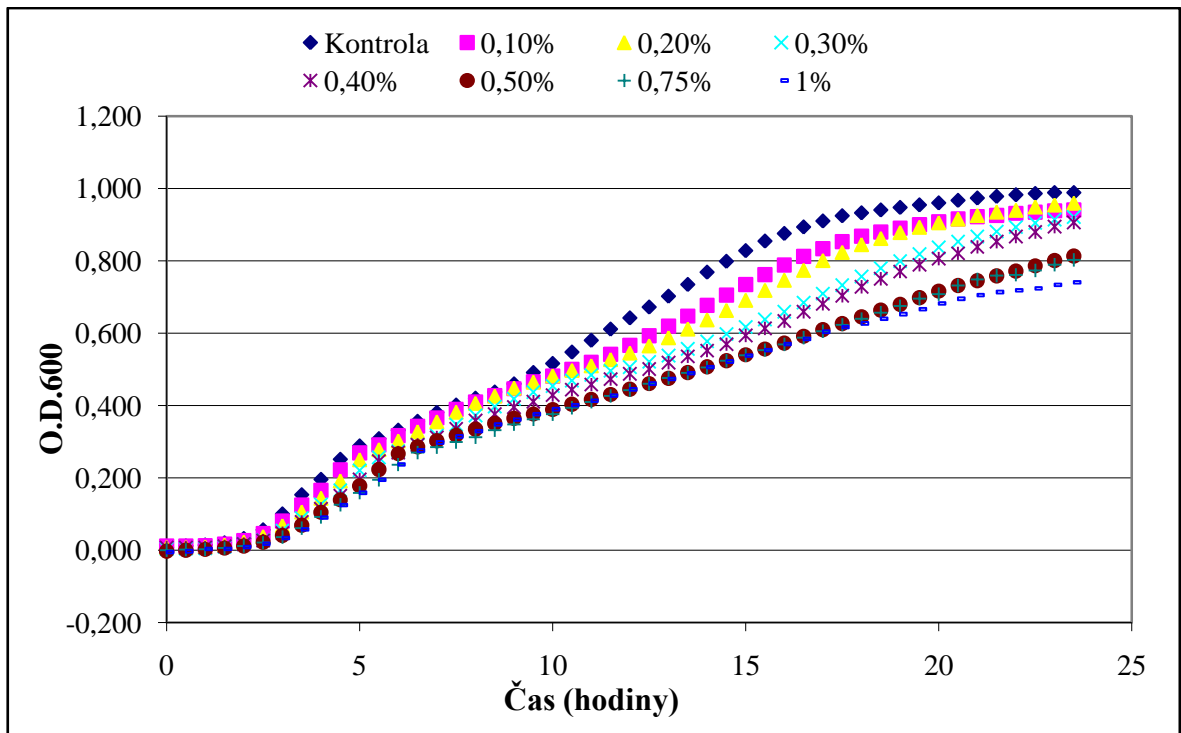
Příloha PII C: Vliv S9 na růst *Enterococcus faecalis* CCM 2665



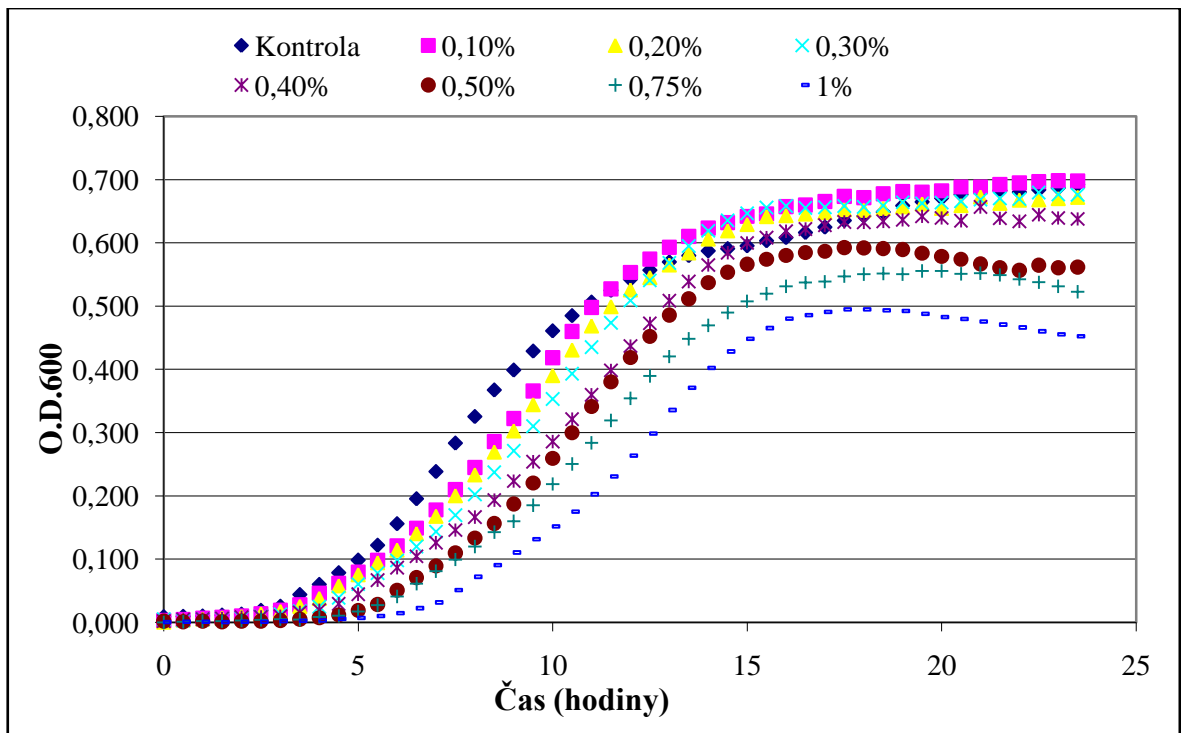
Příloha PII D: Vliv S9 na růst *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955



Příloha PII E: Vliv S9 na růst *Escherichia coli* CCM 3954

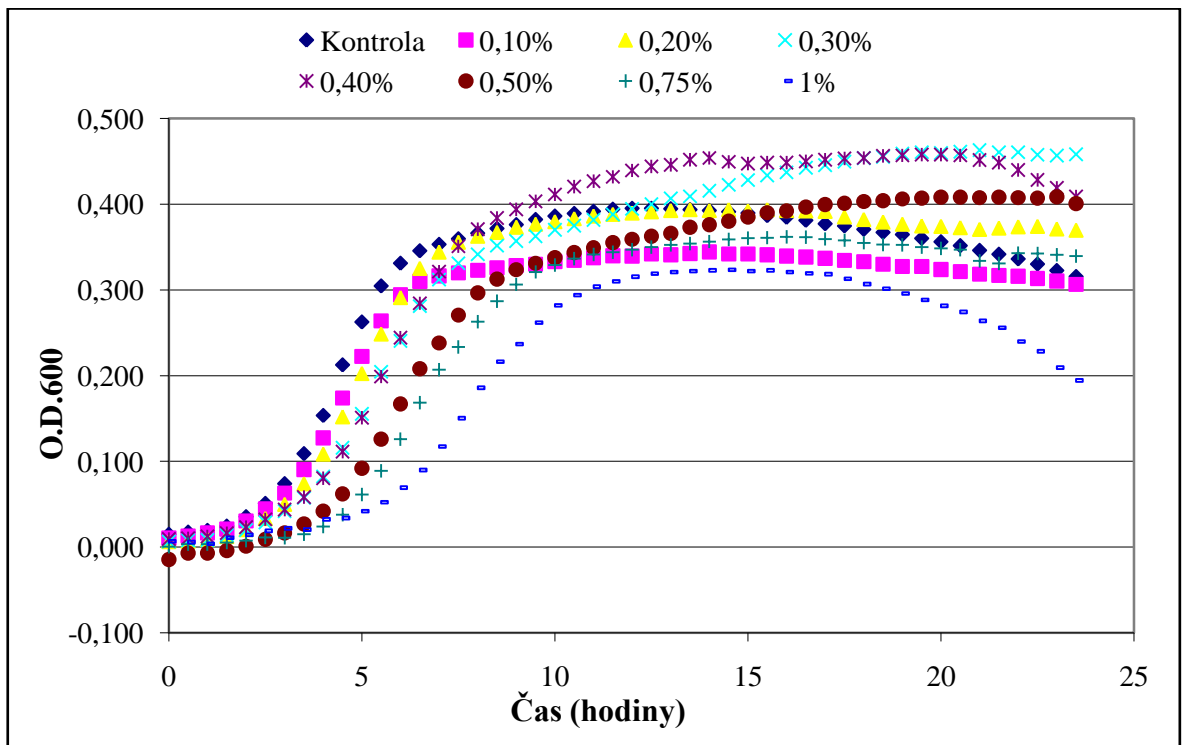


Příloha PII F: Vliv S9 na růst *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798

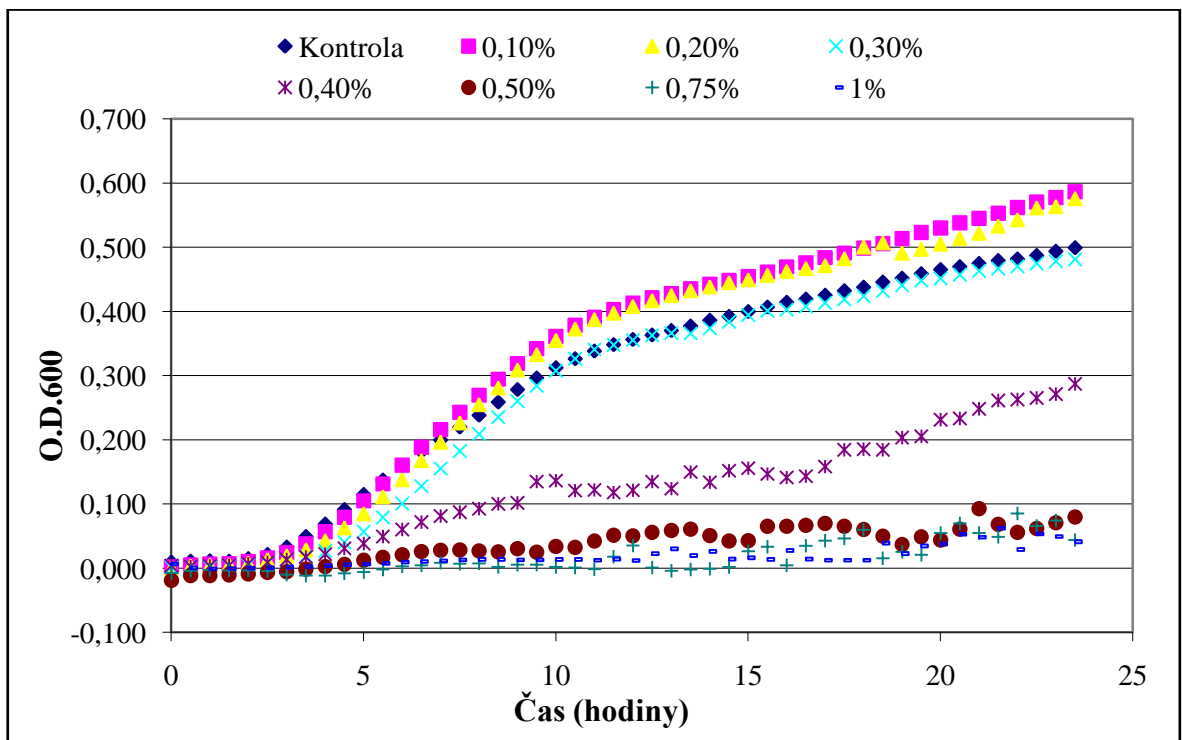


PŘÍLOHA PIII: VLIV 690 NA RŮST MIKROORGANIZMŮ

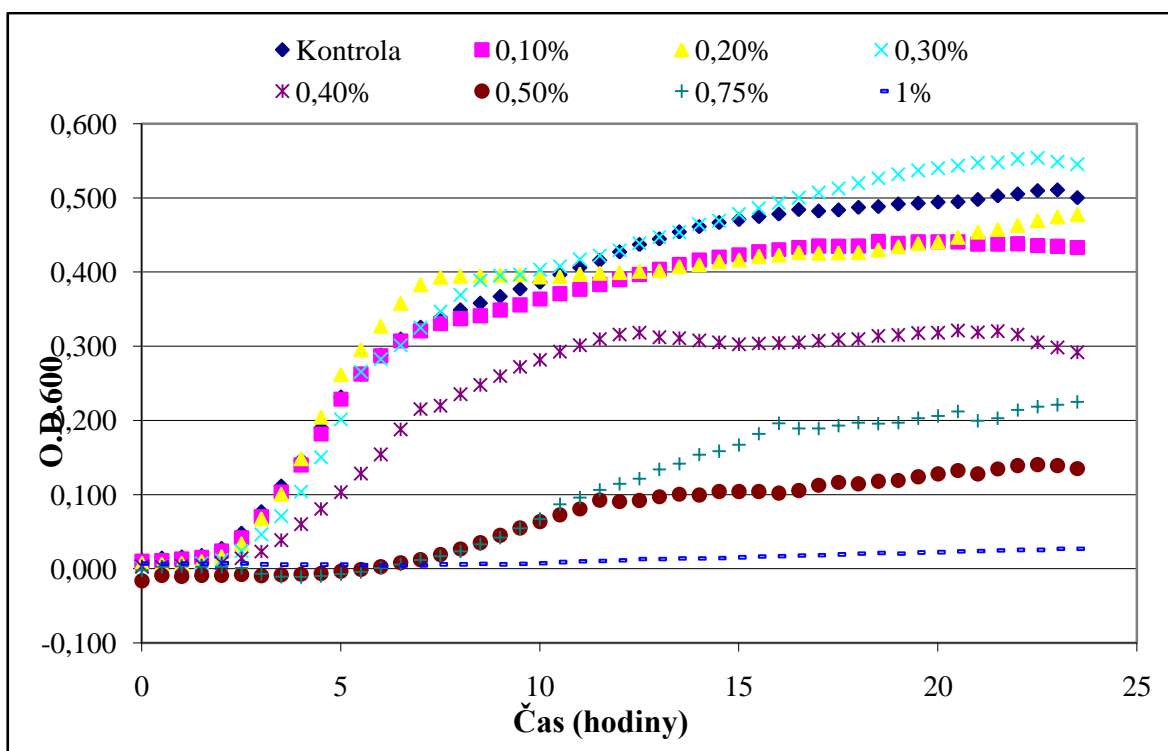
Příloha III A: Vliv 690 na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224



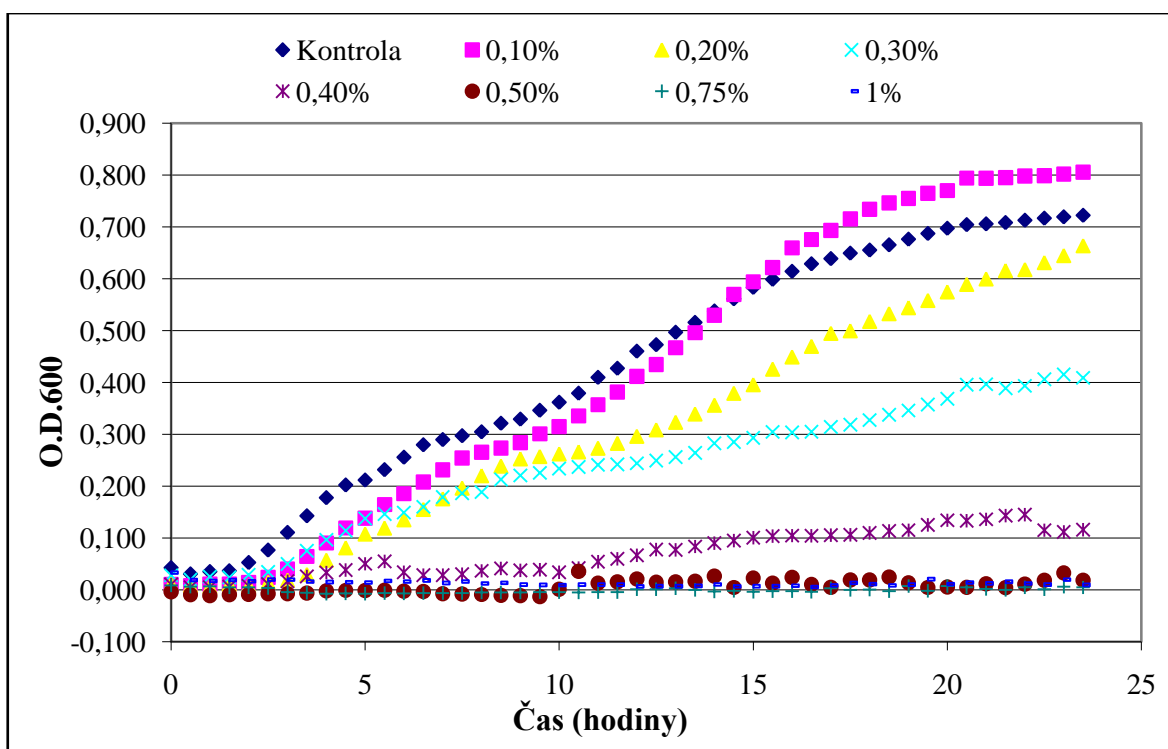
Příloha III B: Vliv 690 na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953



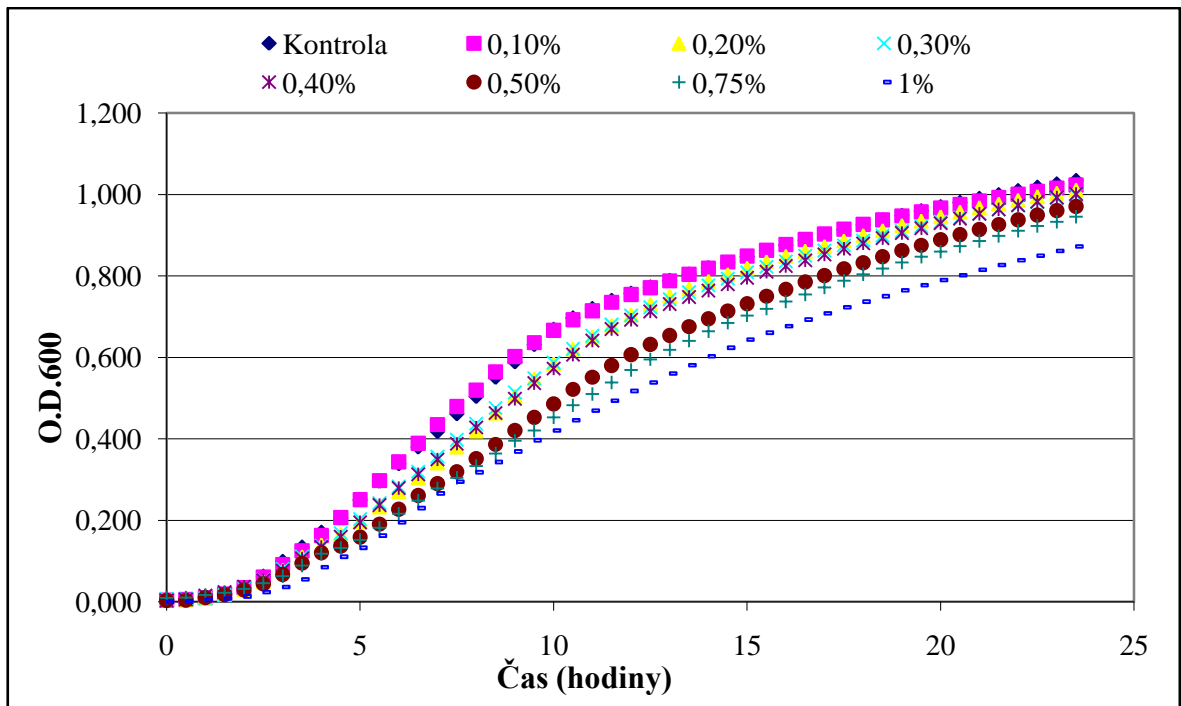
Příloha III C: Vliv 690 na růst *Bacillus cereus* CCM 2010



Příloha III D: Vliv 690 na růst *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*



Příloha III E: Vliv 690 na růst *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303



Příloha III F: Vliv 690 na růst *Escherichia coli* CCM 3954

