

Antibakteriální účinek tavicí soli HBS (polyfosforečnan s dlouhým lineárním řetězcem)

Adéla Nováková

Bakalářská práce
2006



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Adéla NOVÁKOVÁ**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Téma práce: **Antibakteriální účinek tavící soli HBS
(polyfosforečnan s dlouhým lineárním řetězcem).**

Zásady pro vypracování:

Sůl HBS se přidává jako aditivum do tavených sýrů. Je předpoklad, že tato sůl vykazuje antibakteriální účinek.

Cílem studie je přesvědčit se na vybraných kmenech bakterií, zda uvedený předpoklad platí.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Dle doporučení vedoucího BP.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Miroslav Grossmann

Ústav potravinářského inženýrství a chemie


Datum zadání bakalářské práce:

10. října 2005


Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2006

Ve Zlíně dne 20. dubna 2006


prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Abstrakt česky

Za účelem zlepšení nebo úpravy chemického složení a fyzikálně chemických vlastností se do potravin přidávají potravinářská aditiva. Mezi tyto látky se řadí i tavicí soli, které pomáhají stabilizovat směs bílkovin a tuků v tavených sýrech. Nejčastěji používané tavicí soli jsou fosforečnany sodné (E 339), difosforečnany (E 450) a polyfosforečnany (E 452). Tato práce je zaměřená na tavicí sůl JOHA HBS. Jde o důkaz antibakteriálního účinku JOHA HBS na vybraných kmenech bakterií.

Klíčová slova:

Tavicí sůl, JOHA HBS, fosforečnany, antibakteriální účinek, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mikrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*.

ABSTRACT

Abstrakt ve světovém jazyce

With the view of improvement or adjustment chemical constitution and physiochemical feature to the food products carry the food additive. Among these matters lines also smelting salts that can help stabilize mixture albumins and oils in molten cheeses. Most often used smelting salts are phosphates soda lye (E 339), diphosphate (E 450) and polyphosphate (E 452). This work is bent on smelting salt JOHA HBS. JOHA HBS is concerned verification antimicrobial activity on choice log bacteria.

Keywords:

Smelting salt, JOHA HBS, additive, phosphates, antibacterial effect, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mikrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*.

„Objev nového jídla znamená pro štěstí člověka víc než objev hvězdy.“ A. Brillat-Savarin

Na tomto místě bych chtěla poděkovat RNDr. Miroslavu Grossmannovi za jeho cenné odborné rady, čas a hlavně trpělivost, které mi velmi pomohli při realizaci této práce.

OBSAH

ÚVOD.....	8
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 MIKROORGANISMY	11
1.1 ROZDĚLENÍ MIKROORGANISMŮ PODLE FYZIOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ.....	11
1.2 BAKTERIE.....	17
1.2.1 Morfologie bakterií	18
1.3 ESCHERICHIA COLI	20
1.3.1 Morfologie.....	20
1.3.2 Metabolizmus.....	20
1.3.3 Patogenita <i>Escherichia coli</i>	21
1.3.4 Citlivost na antibiotika	22
1.4 STAPHYLOCOCCUS AUREUS	23
1.4.1 Morfologie.....	23
1.4.2 Metabolizmus.....	24
1.4.3 Rezistence	24
1.4.4 Patogenita.....	25
1.4.5 Citlivost na antibiotika	25
1.5 MICROCOCCUS LUTEUS	25
1.5.1 Morfologie.....	26
1.5.2 Metabolizmus.....	26
1.5.3 Výskyt	26
1.6 BACILLUS CEREUS	27
1.6.1 Morfologie.....	27
1.6.2 Metabolizmus.....	27
1.6.3 Patogenita.....	27
1.7 BACILLUS SUBTILIS.....	28
1.7.1 Morfologie.....	28
2 FOSFÁTY	29
2.1 CHEMIE FOSFÁTŮ V JÍDLE	30
2.1.1 Názvosloví fosfátů	30
2.1.2 Chemická struktura	30
2.2 FOSFÁTY V MLÉCE A MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH.....	30
2.2.1 Fosfáty v mléčných výrobcích.....	30
2.2.2 JOHA HBS.....	31
II PRAKTICKÁ ČÁST	32
3 KULTIVACE BAKTERIÍ.....	33

3.1	PODMÍNKY KULTIVACE.....	33
3.2	KULTIVAČNÍ PŮDY.....	35
3.3	PŘÍPRAVA PŮD.....	36
3.4	OČKOVÁNÍ PŮD	37
3.4.1	Růst bakterií na půdách.....	39
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
4.1	PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY	40
4.2	KULTIVAČNÍ PŮDY.....	41
4.2.1	Masopectonový agar – (MPA)	41
4.2.2	Mueler hinton agar – (MHA)	41
4.2.3	Nutrient Broth	42
4.3	ROZTOKY A OSTATNÍ CHEMIKÁLIE.....	43
4.4	POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KMENY	44
4.5	TESTOVÁNÍ TAVÍCÍ SOLI JOHA HBS	45
4.6	POUŽITÉ METODY STANOVENÍ	46
4.6.1	Kultivace na pevné půdě	46
4.6.2	Kultivace na pevné půdě s použitím časového odstupu.....	50
4.6.3	Kultivace v tekutém médiu a následná kultivace na pevné půdě.....	51
	ZÁVĚR	52
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	53
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	57
	SEZNAM OBRÁZKŮ	58
	SEZNAM TABULEK.....	59
	SEZNAM PŘÍLOH.....	60

ÚVOD

Není asi místa na naší planetě, kde by nebyly bakterie. Nejvíce je jich v půdě a ve vodě, velmi mnoho je jich v tělech a na tělech jiných organismů, rostlin, živočichů i člověka, a mnoho je jich ve vzduchu, jehož prostředím se šíří. Vyskytují se i v tak extrémních podmínkách prostředí, kde jiné formy života už nenajdeme: v mrazech Antarktidy, v horkých pramenech, v solných jezerech i na mimořádně prosluněných vrcholcích velehor. Jejich koncentrace je ovšem různá v různých prostředích.

Živá příroda jako celek je ve stavu dynamické rovnováhy. Tvoří systém, jehož jednotlivé prvky jsou propojeny složitými vazbami vzájemné funkční podmíněnosti, pořádajícími je v koloběhu hmoty do uzavřeného cyklu. Tím je umožněno trvání živé přírody jako celku v čase i její vývoj.

Člověk od pradávna využíval životní činnost mikroorganismů včetně bakterií k výrobě prostředků ke svému vlastnímu životu a uměl jejich činnost i řídit, aniž ovšem měl tušení o jejich existenci. S postupem času však člověk začal objevovat stále nové možnosti a toužit po ovládnutí všeho živého. Jenže ne všechny mikroorganismy, které se kolem člověka vyskytují jsou jemu prospěšné. Některé jsou patogenní jiné pouze podmíněně patogenní. Proto člověk hledal způsob jak by jejich výskyt a činnost eliminoval.

Největší problém patogenních mikroorganismů pro člověka nastává ve spojení s potravinami. Proto jsme nuceni velmi dbát na hygienu provozu, přepravy, skladování a všech operací, které souvisejí s výrobou a následným exportem potravin. Jenomže nebyli bychom lidé, kdybychom nehledali vylepšení a zjednodušení. Jedním z takových zjednodušení je používání potravinářských aditiv, které slouží nejen ke zlepšení fyzikálně chemických vlastností. Mezi tyto látky se řadí i tavicí soli, které pomáhají stabilizovat směs bílkovin a tuků v tavených sýrech. Nejčastěji používané tavicí soli jsou fosforečnany sodné (E 339), difosforečnany (E 450) a polyfosforečnany (E 452). Do této skupiny tavicích solí patří též tavicí sůl JOHA HBS, která díky svým baktericidním účinkům má obrovský vliv na kvalitu sýrů a samozřejmě i na možnost delšího skladování.

Cílem práce bylo pomocí několika mikrobiologických metod kultivace mikroorganismu dokázat antibakteriální účinek tavicí soli JOHA HBS.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MIKROORGANISMY

Jako mikroorganismy označujeme jednobuněčné nebo vícebuněčné organismy, které nejsou schopny tvořit funkčně diferenciované tkáně nebo pletiva. Společným znakem mikroorganismů jsou velmi malé rozměry jejich těl – od několika desetin μm do několika desetin mm – podle toho byly také nazvány. V systematice organismů jsou mikroorganismy označovány jako příslušníci třetí biologické říše podle Haeckela, Protista; dělí se na Prokaryota, jež nemají diferenciované jádro, mikrobiální Eukaryota a Archea. [1]

Mikroorganismy hrají v přírodě i v životě člověka obrovskou roli, neboť jsou jedním z hlavních činitelů ovlivňujících tvorbu a zachování životního prostředí na naší planetě. [1]

1.1 Rozdělení mikroorganismů podle fyziologických vlastností

Po fyziologické stránce jsou mikroorganismy velmi rozmanité. Jednotlivé skupiny mikroorganismů se od sebe vzájemně liší svými nároky na výživu, na kyslík, i způsobem získávání potřebné energie.

Podle nároků na výživu rozdělujeme mikroorganismy na:

- a) autotrofní, kterým k výživě stačí pouze anorganické sloučeniny. Přítomnost organických sloučenin často inhibuje jejich rozmnožování. Tyto mikroorganismy nejsou schopny syntetizovat všechny složky své buněčné hmoty z anorganických sloučenin. Některé z nich získávají energii oxidací anorganických sloučenin, jiné využívají světelné energie; jako zdroje uhlíku pro syntézu své buněčné hmoty využívají oxidu uhličitého a jako zdroje dusíku amonných solí nebo dusičnanů, v některých případech i plynného dusíku. Patří sem řasy a některé bakterie;
- b) heterotrofní, které vyžadují přítomnost organických sloučenin v živném prostředí, ať už jako zdroj uhlíku, vodíku nebo energie; patří sem kvasinky, plísně a většina bakterií. Heterotrofní mikroorganismy rozdělujeme dále na prototrofní, kterým stačí k výživě jednoduché organické uhlíkaté sloučeniny (např. sacharidy, ethanol, jednoduché organické kyseliny apod.) spolu s anorganickými solemi, a auxotrofní, které kromě toho vyžadují některé složité sloučeniny (např. vitaminy, aminokyseliny apod.).

Podle nároku na kyslík dělíme mikroorganismy na:

- a) aerobní, které vyžadují vzdušný kyslík, neboť mají vyvinutý pouze aerobní metabolismus; patří sem plísně, octové bakterie (rod *Acetobacter*), některé hnilobné bakterie a některé kvasinky;
- b) anaerobní, které využívají volný kyslík, neboť mají pouze anaerobní metabolismus; vzdušný kyslík na ně působí inhibičně (např. u sporotvorných bakterií rodu *Clostridium*) nebo dokonce toxicky;
- c) mikroaerofilní, které mají anaerobní metabolismus, avšak nízké koncentrace kyslíku urychlují jejich rozmnožování; patří sem např. v přírodě velmi rozšířená skupina mléčných bakterií (rod *Lactobacillus*);
- d) fakultativně anaerobní, které mají anaerobní metabolismus, takže mohou růst za přítomnosti i nepřítomnosti vzdušného kyslíku; za aerobních podmínek se většinou rozmnožují rychleji, neboť aerobní metabolismus účinněji přeměňuje substrát v energii; [1]

Podle způsobu získávání energie řadíme mikroorganismy do těchto skupin:

A. Fototrofní mikroorganismy, jejichž zdrojem energie je přeměna světelné energie v energii chemickou, která je pak využitelná pro životní pochody buňky. Podobně jako rostliny potřebují i fototrofní mikroorganismy k přeměně světelné energie v energii chemickou chlorofyl. Kromě tohoto zeleného barviva obsahují některé fototrofní mikroorganismy ještě karotenoidní barviva, jejichž funkcí je absorpce světla a jeho předání do reakčního centra v chlorofylu. Fototrofní mikroorganismy syntetizují buněčnou hmotu z anorganických živin a oxidu uhličitého, k jehož redukci používají různé sloučeniny. Podle toho rozeznáváme:

- a) Fotolithotrofní (neboli fotoautotrofní) mikroorganismy, jimž vodík pro redukci oxidu uhličitého poskytují anorganické sloučeniny, takže jde o autotrofní mikroorganismy. Voda slouží jako zdroj vodíku pouze u cyanobakterií a řas tzv. sírné fototrofní bakterie využívají jako zdroj vodíku pouze sirovodík nebo thiosíran. Jsou to anaeroby a jsou přísnými fototrofy. Patří sem zelené sírné bakterie. [1]

- b) Fotoorganotrofní (neboli ftoheterotrofní) mikroorganismy, jimž slouží organické sloučeniny jako zdroj vodíku pro redukci oxidu uhličitého a také jako zdroj uhlíku. Patří sem nesírné purpurové bakterie (*Rhodospirillaceae*), které vedle bakteriochlorofylu obsahují ještě karotenoidní barviva. Většinou jsou schopny využívat také plynný vodík. Za světla je jejich metabolismus anaerobní, avšak ve tmě jsou schopny aerobně oxidovat organické sloučeniny, aby získaly potřebnou energii. Nejsou tedy ani přísnými anaeroby, ani striktními fototrofy. [1]

Sírné i nesírné fototrofní bakterie jsou schopny za světla v anaerobních podmínkách využívat vzdušný dusík.

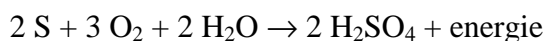
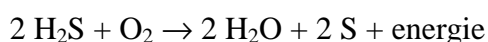
Výskyt sírných i nesírných fototrofních bakterií je omezen jejich růstovými požadavky a proto jsou přítomny hlavně v zahnívajících tůních, organicky znečištěných tocích, sírných pramenech a v mořích. Vyskytují se pod vrstvou řas, aby měly zajištěné anaerobní podmínky; odlišné složení chlorofylu jim umožňuje absorbovat světlo o vlnových délkách, jež řasy neabsorbují (především je to oblast nejzazšího červeného a infračerveného světla). Karotenoidní barviva jim umožňují využívat také světlo o vlnové délce 450 až 550 nm. [1]

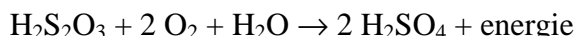
Fototrofní bakterie mají v přírodě mnohem menší význam než cyanobakterie a řasy, které jsou důležitými producenty kyslíku, především v oceánech, kde také složí jako potrava drobným živočichům. [1]

- B. Chemotrofní mikroorganismy získávají energii oxidací chemických sloučenin. Rozdělujeme je do těchto skupin:

- a) Chemolithotrofní čili chemoautotrofní mikroorganismy, získávají energii oxidací anorganických sloučenin. Jsou to většinou aerobní autotrofní bakterie. Patří sem:

- 1) Bezbarvé sírné bakterie a vláknité sírné bakterie; získávají energii oxidací síry a jejich sloučenin, především sirovodíku:



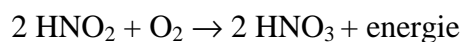


Síru jako rezervní zdroj energie, ukládají ve formě zrníček ve svých buňkách. Někteří příslušníci rodu *Thiobacillus* produkují tolik H_2SO_4 , že silně okyselují prostředí (na pH 0,5 a nižší). Tím přispívají k rozpouštění hornin zvyšování tvrdosti vody. Jsou také hlavní příčinou koroze kovových konstrukcí a potrubí, uložených v zemi. Příslušníci čeledi *Beggiatoaceae* mohou získávat energii také oxidací organických sloučenin.

1. Nitrifikační bakterie (*Nitrobacteraceae*), získávající energii oxidací sloučenin dusíku. Patří sem rody *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* aj., které jsou obligátními chemolithotrofy, získávají energii oxidací amoniaku na dusitany:



Dále sem patří rody *Nitrobacter*, *Nitrococcus* aj., jimž slouží jako zdroj energie oxidace dusitanů na dusičnany:



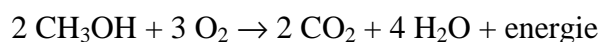
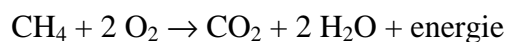
Rod *Nitrococcus* je obligátní chemolithotrof, kdežto některé kmeny rodu *Nitrobacter* mohou získávat energii také oxidací organických sloučenin.

Nitrifikační bakterie hrají velmi důležitou roli v koloběhu prvků v přírodě, neboť oxidují amoniak vzniklý mikrobiálním rozkladem bílkovin a jiného organického materiálu. Na značný výskyt a vysokou aktivitu těchto bakterií lze usuzovat ze skutečnosti, že většina dusíkatých rezerv půdy přechází ve formě rozpustných dusičnanů do vodních toků. [1]

2. Železité bakterie (*Siderocapsaceae*), získávající energii oxidací železnatých iontů na železité. Jsou to kulovité až tyčinkovité bakterie, vyskytující se ve vodách bohatých na železnaté ionty a hromadící nerozpustné železité sloučeniny ve svých slizovitých obalech nebo mimo své buňky. Jejich činností vznikla ložiska železitých rud, a proto mají velký geologický význam. Naproti tomu tzv. vláknité železité bakterie, které ukládají sloučeniny železa nebo manganu ve formě dlouhých pouzder podél

řetězců svých buněk, jsou většinou chemoorganotrofní, neboť získávají energii oxidací organických sloučenin. Chemolithotrofní je však rod *Gallionella*, který vytváří z železitých sloučenin vláknité pochvy. Jeho činnost má za následek ucpávání potrubí, jimiž prochází voda s vysokým obsahem železnatých iontů. Tento rod je řazen mezi pučící bakterie. [1]

3. Bakterie využívající pouze metan a methanol (tj. rody *Methylomonas* a *Methylococcus*). Tyto bakterie jsou obvykle zařazovány mezi chemolithotrofní mikroorganismy, neboť nejsou schopny využívat žádné další organické sloučeniny a pro syntézu své buněčné hmoty používají oxid uhličitý. Získávají energii reakcemi:



Některé druhy však získávají energii také oxidací sacharidů a jiných organických sloučenin, takže nejsou přísně chemolithotrofní, ale jsou mixotrofní. [1]

- b) Chemoorganotrofní čili chemoheterotrofní mikroorganismy získávají energii oxidací organických sloučenin, jichž využívají také jako zdroje uhlíku, vodíku a většinou i kyslíku k syntéze své buněčné hmoty. Do této skupiny patří kvasinky, plísně a většina bakterií. Činnost chemoorganotrofních mikroorganismů je důležitá v přírodě i v průmyslu. V přírodě jsou společenství různých druhů těchto mikroorganismů schopna rozložit veškeré organické sloučeniny živočišného i mikrobiálního původu až na oxid uhličitý, vodu a amoniak a vracet tyto látky do koloběhu, který je nutný pro zachování života na naší planetě. Činnost těchto mikroorganismů je žádoucí jednak ve vodních tocích, mořích a umělých vodních nádržích, neboť způsobuje tzv. samočištění vod, jednak v půdě, neboť zvyšuje její úrodnost. Chemoorganotrofní mikroorganismy jsou však na druhé straně původci nežádoucího rozkladu potravin a potravinářských surovin. Způsobují také rozklad nepotravinářského organického materiálu uloženého ve vlhku (papíru, tkanin, kůže i materiálu z některých plastů). Mezi chemoorganotrofní mikroorganismy pa-

tří i patogenní mikroorganismy, které způsobují nemoci člověka, zvířat nebo rostlin, a valná většina mikroorganismů používaných v průmyslu. [1]

Oxidace organických sloučenin může u chemoorganotrofních mikroorganismů probíhat za aerobních nebo anaerobních podmínek. Za aerobních podmínek (tj. u aerobů a fakultativních anaerobů) mohou být organické sloučeniny oxidovány úplně až na oxid uhličitý a vodu, přičemž dusík těchto organických sloučenin je přeměňován většinou na amoniak. Při nadbytku organického substrátu, sloužícího jako zdroj energie, ovšem může dojít pouze k jeho částečné oxidaci, a to za vzniku velkého množství organického produktu; této skutečnosti se průmyslově využívá při aerobní kvasné výrobě některých kyselin (např. octové, citronové, fumarové atd.). [1]

Anaerobní oxidace organických substrátů může probíhat i na úkor kyslíku dusičnanů (např. u příslušníků rodu *Bacillus* a u řady jiných bakterií) nebo síranů (např. u anaerobního rodu *Desulfovibrio* nebo u anaerobního sporetvorného rodu *Desulfotomaculum*). Tento proces bývá také označován jako anaerobní dýchání. Ze síranů vzniká při anaerobním dýchání sirovodík, který s železnatými ionty nebo jinými kationty přítomnými v prostředí tvoří černé sulfidy. Z dusičnanů přitom vznikají jedovaté dusitany nebo nižší oxidy dusíku. Toto tzv. dusitanové kvašení může proběhnout v obrovských kontejnerech melasy v cukrovarech, lihovarech nebo drožd'árnách, pokud melasa má mimořádně vysoký obsah bakterií; projevuje se vznikem hnědavých dýmů oxidů dusíku. Dusitanově kvasící melasy jsou pro svůj vysoký obsah toxických sloučenin dusíku nevhodné jako surovina pro kvasný průmysl. Mohou dokonce způsobit zastavení průmyslového kvasného procesu. [1, 2]

Většinou však oxidace organických sloučenin za anaerobních podmínek probíhá tak, že část molekuly se oxiduje až na oxid uhličitý a její zbývající část se redukuje na produkt, který je uvolňován do kultivačního prostředí. Protože tímto způsobem získá mikroorganismus ze substrátu poměrně malé množství energie, musí rozložit velké množství substrátu. Anaerobní procesy jsou proto spojeny s hromaděním organických produktů energetického metabolismu a většinou také s intenzivním uvolňováním oxidu uhličitého. K hlavním anaerobním procesům, jimiž mikroorganismy získávají energii, pa-

tří ethanolové kvašení kvasinek, mléčné kvašení mléčných bakterií a máselné kvašení příslušníků rodu *Clostridium*. Všechna tato kvašení se využívají průmyslově pro kvasnou přípravu produktů metabolismu. [1, 2]

1.2 Bakterie

Velké pokroky v biologii, a mimo jiné i rozvoj mikroskopie a ostatních metod srovnávací cytologie vyústily v dnešní jednoznačný závěr, že buňka bakterií a sinic se velmi výrazně odlišuje od buňky všech ostatních organismů svojí podstatně jednodušší strukturní organizací; jsou tedy dva typy buněčné organizace. Snad nejdůležitějším rozdílem mezi oběma typy buněk je strukturní organizace buněčného jádra, a proto se vžilo označení „prokaryotní“ a „eukaryotní“ buňka. Rozdíly mezi prokaryotními a eukaryotními organismy jsou většinou zásadnější, než jsou rozdíly mezi rostlinami a živočichy; prokaryota a eukaryota jsou od sebe ostře odděleny; mezi nimi neexistují přechodné formy mezi prokaryotní a eukaryotní organizací buňky. [1, 2]

Jsou tři klíčové charakteristiky, které platí pro všechna prokaryota:

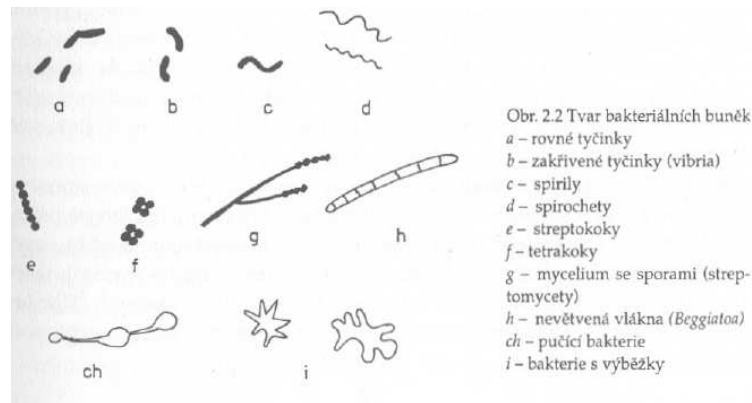
1. Organizace buněčného jádra. Jádro prokaryot je útvar morfologicky zřetelný, neoddělený však od cytoplazmy membránou a tvořený jedinou, do kruhu uzavřenou dvoušroubovicí molekuly DNA. Prokaryotní buňka je haploidní. Množí se jen pohlavně.
2. Nepřítomnost buněčných organel. V prokaryotní buňce nejsou ani mitochondrie, chloroplasty, ani endoplazmatické retikulum, ani žádné jiné membránou ohraničené organely. Jedinou membránou je cytoplazmatická membrána na povrchu cytoplazmy. To znamená, že prokaryotní buňka je jediným, dále již membránami nedělitelným prostorem.
3. Vlastnosti ribosomů. Ribosomy prokaryotních buněk se liší od ribosomů eukaryotních buněk v celé řadě dílčích funkčních a stavebních vlastností, mimo jiné i ve velikosti a hmotnosti.

Kromě toho mají prokaryotní buňky mnoho dalších specifických vlastností odlišujících je od buněk eukaryotních, i když tyto vlastnosti mohou zpravidla chybět. Příkladem je :

- a) peptidoglykan, který není znám u eukaryot, zatím co je podstatnou součástí stěny u všech prokaryot kromě mykoplazmat a několika dalších výjimek.
- b) Bičinky, které jsou přítomny u některých bakterií, jsou jednoduchostí své stavby zásadně odlišné od stavby a způsobu funkce brv a bičků eukaryot.
- c) Anaerobióza, striktní nebo fakultativní není u prokaryot, na rozdíl od eukaryot, nikterak vzácná ani výjimečná.
- d) Schopnost vázat vzdušný dusík, která je vlastní řadě prokaryotních druhů, je neznámá u eukaryot, stejně tak jako tvorba poly- β -hydroxymáslé kyseliny, jako zásobního buněčného materiálu.
- e) Pinocytóza, fagocytóza a exocytóza, které jsou běžné u eukaryot.
- f) Přítomnost sterolů v membránách je typické pro eukaryota.
- g) Buňka prokaryotní je asi desetkrát menší než eukaryotní, a je tak velikostí srovnatelná s mitochondrií.
- h) Pro prokaryotní buňku je charakteristická i neschopnost vytvářet funkčně a morfologicky diferenciované tkáně. Prokaryota jsou jen jednobuněčné tkáně. [2, 5]

1.2.1 Morfologie bakterií

Přestože jsou bakterie po fyziologické stránce velmi rozmanité, po morfologické stránce nejsou mezi jednotlivými rody velké rozdíly. Tvar buněk bakterií obr.1 je nejčastěji tyčinkovitý, méně často kulovitý. Vlákňitý tvar se vyskytuje u poměrně rozsáhlé skupiny půdních bakterií patřících do řádu *Actinomycetales* a u několika dalších rodů. [1, 2, 28]



Obr. 1 Tvary buněk bakterií [1]

Tyčinkovité buňky jsou buď rovné, zakřivené, tvaru pravidelné spirály nebo dlouhé nepravidelné spirály. Různé druhy bakterií se liší poměrem délky buňky k šířce, takže se vyskytují jak druhy tvořící velmi krátké tyčinky podobné spíše kokům, tak i druhy tvořící dlouhé tyčinky připomínající spíše krátká vlákna. U většiny tyčinkovitých bakterií se však délka buněk pohybuje v rozmezí od 1 do 3 μm ; u téhož druhu závisí na vnějších podmínkách, tedy na fyziologickém stavu buněk: buňky, které se velmi intenzivně rozmnožují, jsou mnohem kratší než buňky klidové. Naproti tomu šířka tyčinkovitých buněk je u daného druhu poměrně stálá. U většiny druhů bakterií se pohybuje v rozmezí od 0,5 do 1,5 μm . Tyčinkovité bakterie se rozmnožují příčným dělením buňky. [1, 2, 28]

Kulovité vegetativní buňky bakterií se nazývají koky. Jestliže se rozmnožují dělením pouze v jedné rovině, tvoří řetízky, např. rod *Streptococcus*, při dělení ve dvou na sebe kolmých rovinách vytvářejí většinou tetrády, např. rod *Pediococcus*, při dělení ve třech na sebe kolmých rovinách tvoří pravidelné balíčky po osmi až několika stech buňkách (tzv. sarciny). Dělením koků v různých rovinách vznikají nepravidelné shluky buněk (např. rod *Staphylococcus*). [1, 2, 28]

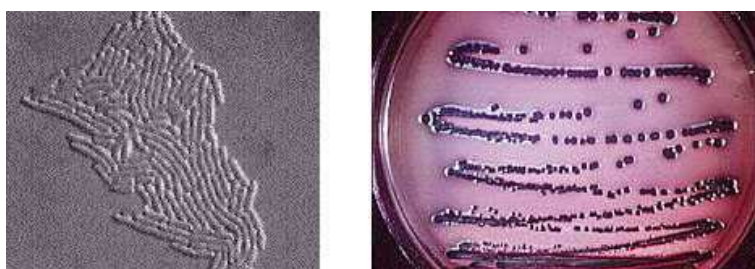
Vláknitý tvar bakterií, vyskytující se u řádu *Actinomycetales*, je charakterizován pravým větvením. Rozmnožování zde probíhá jednak dělením buněk ve vláknech, a tedy rozrůstáním vláken, jednak tvorbou jednobuněčných útvarů čili spor, vznikajících podél vláken nebo na jejich konci, jednak rozpadem vláken v jednotlivé buňky. U některých rodů se tvoří uvnitř buněk (tzv. endospory). [1, 2, 28]

1.3 Escherichia coli

Gastrointestinální trakt většiny teplokrevných živočichů je kolonizován bakterií *Escherichia coli* jen několik hodin nebo dnů po narození. Lidské střevo je obvykle kolonizováno během prvních čtyřiceti hodin po narození. [12]

1.3.1 Morfologie

Escherichia coli je hlavním zástupcem bakteriální rodiny, *Enterobacteriaceae*, střevní bakterie, které jsou fakultativně anaerobní, Gramnegativní tyčinky, které žijí v trávicích traktech jak zdravých, tak i nemocných zvířat a lidí. Z lékařského hlediska patří *Enterobacteriaceae* mezi nejvýznamnější bakterie. Několik druhů bakterií patří do skupiny střevních patogenů (např. *Salmonella*, *Yersinia*) a jiné tvoří přirozenou střevní mikroflóru (např. *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*), které jsou považovány za nepatogenní bakterie. *E. coli* je přirozeným obyvatelům střevní mikroflóry člověka, kde tvoří její převážnou část, ale ve srovnání s celkovým počtem všech bakterií tvoří jen malou část. Anaerobní druhy střevních bacilů v trávicím traktu převyšují počtem *E. coli* přinejmenším v poměru 20:1. *E. coli* mohou infikovat dolní cesty dýchací, rány, způsobují infekty močových cest, bývají též obávanými původci meningitid u novorozenců. Nicméně výskyt *E. coli* v trávicím traktu a fekáliích vedl ke sledování těchto bakterií jako indikátorů fekálního znečištění a kontaminace vod. [7, 8, 12, 19]



Obr. 2 *Escherichia coli* [8]

1.3.2 Metabolismus

Escherichia coli má jak respirační, tak i kvasný metabolismus. Zkvašuje cukry (např. glukosu, laktosu, některé pentosy a alkoholické cukry) za intenzivní tvorby kyselin a plynů. Tvoří z těchto cukrů hlavně kyseliny mléčnou, pyrohroznovou, octovou a mravenčí, přičemž část kyseliny mravenčí rozkládá na oxid uhličitý a vodík. Pro zjištění této bakterie

v potravinách nebo vodě se využívá její schopnosti zkvašovat laktosu za vzniku kyselin; příslušné diagnostické selektivní půdy totiž obsahují laktosu jako zdroj uhlíku, barvivo, které změnou barvy prokáže zkvašování laktosy. [9, 12]

1.3.3 Patogenita *Escherichia coli*

Podle antigenní struktury se dělí na sérotypy. Somatických (O) antigenů je 167, k nim se váží K a H antigeny, takže jejich kombinací vzniká 240 sérotypů. Kapsulární antigen se dělí podle chemického složení na ty, které jsou tvořeny kyselými nebo neutrálními polysacharidy, a na ty, které se skládají z bílkovin a tvoří struktury podobné fimbriím.

Escherichia coli vyvolává dva typy onemocnění:

- a) extraintestinální (zejména močových cest, septická onemocnění, infekce ran, hnisavé procesy)
- b) v intestinálním traktu infekce provázené průjmami (určité kmeny)

Extraintestinální formy jsou vyvolávány převážně komensálními sérotypy a infekce je často endogenní. Mohou se uplatnit ty kmeny, které vzdorují baktericidii séra a fagocytóze, tj. mají polysacharidový kapsulární antigen; v močovém traktu ty, které mají tzv. P fimbrie, jimiž adherují na sliznici močových cest (uropatogenní *E. coli*). *E. coli* je pyogenní bakterie. V zažívací traktu se určité kmeny *E. coli* uplatňují jako patogeny různými mechanismy, podle kterých se skupiny těchto tzv. enteropatogenních kmenů *E. coli* se označují jako

1. enteropatogenní v užším slova smyslu (EPEC)
2. enterotoxigenní (ETEC)
3. enteroinvazivní (EIEC)
4. enterohemoragické (EHEC)

Enteropatogenní *E. coli* EPEC: jsou vyvolavateli novorozeneckých průjmů. Dochází k dehydrataci při vodnatých průjmech, případně i ke smrti. V rozvinutých zemích infekcí ubylo, jsou však problémem v rozvojových zemích. U většiny dětí a u dospělých onemocnění nevyvolávají. Bylo prokázáno, že schopnost vyvolat tyto novorozenecké průjmy je vázána pouze na některé sérotypy, které kolonizují tenké a tlusté střevo. Jejich identifikace se opírá o sérotypizaci. U EPEC kmenů nebyla prokázána tvorba enterotoxinů. Infekce EPEC kme-

ny je spojena s charakteristickými ultrastrukturálními změnami v epiteliálních buňkách tenkého střeva, které jsou patrné jen pod elektronovým mikroskopem.

Enterotoxigenní *E. coli* – ETEC: kolonizují tenké střevo pomocí kolonizačních faktorů, což jsou proteinové fimbrie, které jsou druhově specifické (pro člověka, pro selata, pro telata). Enterotoxigenní kmeny mohou vyvolat průjemy jak u dětí, tak i u dospělých. Vyskytují se převážně endemicky v teplých oblastech (Mexiko, Bangladéš, Egypt), do střední Evropy se dostávají po návratu cestovatelů (cestovatelské průjemy). ETEC kmeny mohou produkovat 2 typy enterotoxinů, a to termolabilní enterotoxin (TL) podobný svou strukturou a stejným mechanismem svého účinku jako cholergen a termostabilní enterotoxin (TS). Genetická informace pro tvorbu enterotoxinů je vázána na plasmidech. Tvorba enterotoxinů je u některých sérotypů častější, ale vazba mezi tvorbou enterotoxinu a sérotypem je volná.

Enteroinvasivní *E. coli* – EIEC – mají podobný mechanismus patogenity jako shigely, tj. pronikají do buněk a v nich se množí. Onemocnění probíhá pod obrazem bacilární dysenterie.

Enterohemoragické *E. coli* – EHEC – mají podobný mechanismus adherence jako enteropatogenní, ale váží se převážně v tlustém střevě. Navíc jsou producenty toxinu, který se označuje jako podobný shigelovému (shigalike toxin) nebo verotoxin (změny se projevují zejména v buněčných kulturách buněk VERO). Izolují se z epidemických onemocnění hemoragickou kolitidou, u některých nemocných se vyvine hemolyticko-uremický syndrom (HUS). Zdrojem infekce je nejčastěji infikované hovězí maso. Onemocnění se vyskytuje v dětském věku, a to nejen v rozvojových zemích. Onemocnění je často smrtelné. Verotoxiny jsou dvou antigenických typů, ale mechanismus toxicity je stejný. Produkce toxinů je vázána na bakteriofága. Průkaz kmenů tvořících verotoxin se opírá o změny v buněčných kulturách nebo genetické sondy. Většina kmenů je odlišná biochemicky (neštěpí sorbitol). Toxin může být prokázán přímo ve filtrátu stolice. Proti verotoxinu se tvoří neutralizační protilátky. Kmeny byly zachyceny i v České republice. [2, 9]

1.3.4 Citlivost na antibiotika

E. coli je citlivá primárně na většinu antibiotik, ale zejména nemocniční kmeny mají sekundární rezistenci přenosového typu. Terapie extraintestinálních infekcí spočívá v léčbě antibiotiky, u intestinálních forem je nutno dbát na rehydrataci. [2]

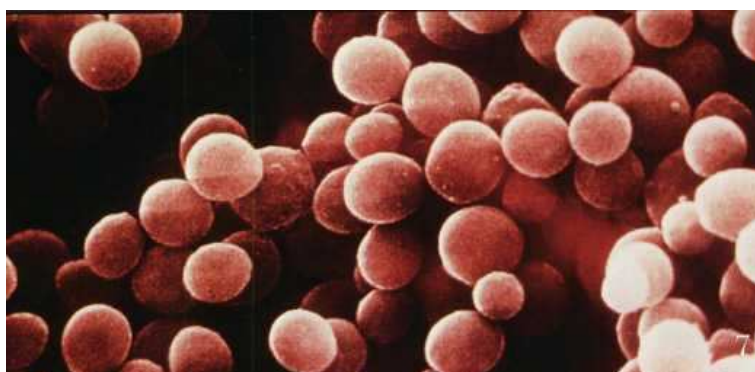
1.4 Staphylococcus aureus

Patří mezi běžné mikroorganismy. Nachází se v širokém zastoupení v krku, v nose, ve vlasech a na povrchu kůže. Stafylokoky mohou růst a přežít ve vysokých koncentracích solí a cukrů, kde ostatní mikroorganismy nepřežijí. Řadí se mezi biochemicky nejaktivnější bakteriální druhy. Produkuje řadu komplexních látek buněčné stěny, exoenzymů a toxinů, z nichž mnohé se uplatňují jako faktory virulence. Je dobře adaptovaný na kolonizaci kůže a sliznic a společně se streptokoky patří mezi nejčastější původce pyogenních infekcí nebo intoxikací člověka i zvířat. [11,12]

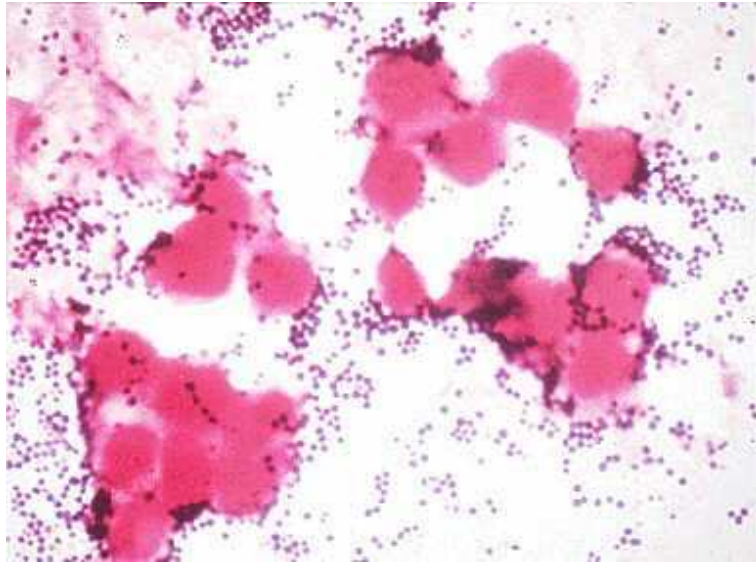
1.4.1 Morfologie

Staphylococcus aureus tvoří žluté kolonie na mediu, které je bohaté na živiny. *S. aureus* je často hemolytický na krevní agar. Stafylokoky jsou charakterizovány jako grampozitivní, nesporulující, nepohyblivé a většinou neopouzdržené sférické koky o průměru asi 1 μm . Bakterie jsou katalasa – pozitivní a oxidasa – negativní. *S. aureus* může růst v teplotním rozmezí od 6,5 °C do 48 °C a při koncentracích NaCl vyšších než 15 %. Patří do skupiny mezofilních bakterií. Mohou se vyskytovat jednotlivě, nebo ve dvojicích a v nepravidelných shlucích, nebo v hroznovitých shlucích.

[2, 3, 4, 12]



Obr. 3 *Staphylococcus aureus* [12]



Obr. 4 Gramovo barvení – *Staphylococcus aureus* [12]

1.4.2 Metabolismus

Stafylokoky mají většinou fermentační i respirační typ metabolismu. Na rozdíl od streptokoků produkují katalázu. Při zkvašování řady cukrů tvoří kyseliny, nikoliv však plyn. Produkce D nebo L - izomeru kyseliny mléčné při anaerobní utilizaci glukózy je užitečným taxonomickým kritériem. Test se provádí přidáním 3 % roztoku peroxidu vodíku ke kolonii a následná kultivace na plotnách nebo šikmém agaru. Kataláza pozitivní kultury tvoří O₂ a bublinky. Tento test se nesmí provádět na krevním agaru, který už sám od sebe obsahuje katalázu. [12]

1.4.3 Rezistence

Stafylokoky jsou do značné míry rezistentní nepříznivým vlivům zevního prostředí. Odolávají zahřátí na 55 °C po dobu 30 minut, vysychání (zvláště za přítomnosti bílkovin přežívají až několik týdnů) a odolávají vyšším koncentracím NaCl. Tyto vlastnosti zřejmě umožňují přechodné nebo i rezistentní osídlení určitých kožních oblastí některými stafylokokovými druhy. Tolerance k 10 % koncentraci NaCl v kultivačním mediu lze využít pro selektivní izolaci stafylokoků ze silně kontaminovaného materiálu, jakým jsou některé potraviny, sliznice a povrch těla zvířat. Pomnožují se i na půdách obsahujících až 40 % žluči. [2]

1.4.4 Patogenita

S. aureus je patogenní pro člověka a prakticky pro všechny teplokrevné živočichy. Lidský organismus je vůči stafylokokové infekci poměrně značně odolný. K onemocnění dochází zpravidla při oslabení organismu nebo infekci velkou dávkou virulentního kmene. Významným predisponujícím faktorem může být chirurgický zákrok, úraz, umělá náhrada, zavedený katetr, maligní onemocnění nebo imunologická nedostatečnost. Více ohroženi jsou novorozenci, kojenci a starci. [2]

Symptomy stafylokokové otravy se projevují 1 až 8 hodin po požití potravin infikované stafylokoky. Symptomy přetrvávají po dobu 6 až 24 hodin od prvních příznaků. Nejběžnější symptomy zvracení, křeče a vyčerpání. Nejčastěji infikovanou potravinou je maso a masité produkty, ale i drůbež, výrobky z vajec, tuňák, brambory a mléko. Nicméně šunka patří mezi nejčastější zdroje stafylokokové otravy. [11]

1.4.5 Citlivost na antibiotika

Většina kmenů (kolem 80%) je rezistentní k penicilinu. Tento problém však řeší semisynтетické penicilináza-rezistentní peniciliny (oxacilin, meticilin, klaxacilin), penicilinové preparáty kombinované s enzymovými inhibitory beta laktamázy. [2]

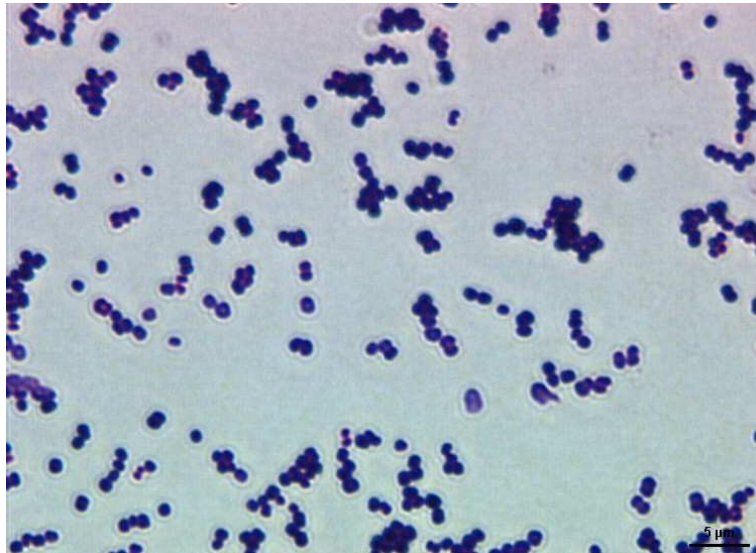
1.5 *Micrococcus luteus*

Mikrokoky byly na základě morfologických a růstových vlastností zařazeny do stejné čeledi jako stafylokoky. Analýzy genomu však ukázaly, že jde o rody velmi odlišné a vývojově vzdálené. Tomu odpovídá i naprostá sérologická (antigenní) odlišnost obou rodů.

Fenotypicky se mikrokoky nejvýrazněji liší od stafylokoků svým striktně respiračním metabolismem. Zatímco stafylokoky jsou fakultativně anaerobní, mikrokoky jsou striktně aerobní. Místem přirozeného výskytu mikrokoků je kůže savců. Sekundárně se vyskytují v mase, mléčných výrobcích, půdě a vodě. Za normálních okolností jsou mikrokoky pokládány za nepatogenní bakterie, u osob se sníženou imunitou však mohou vyvolat i závažné infekce. [2]

1.5.1 Morfologie

Micrococcus luteus je grampozitivní koková bakterie. Uspořádání koků bývá obvykle do balíčku či shluků buněk.



Obr. 5 *Micrococcus luteus* [18]

1.5.2 Metabolismus

Rod *Micrococcus* zahrnuje přísně aerobní druhy. Všechny jsou schopny růst v přítomnosti 5% chloridu sodného, čehož se využívá také při jejich stanovení.

1.5.3 Výskyt

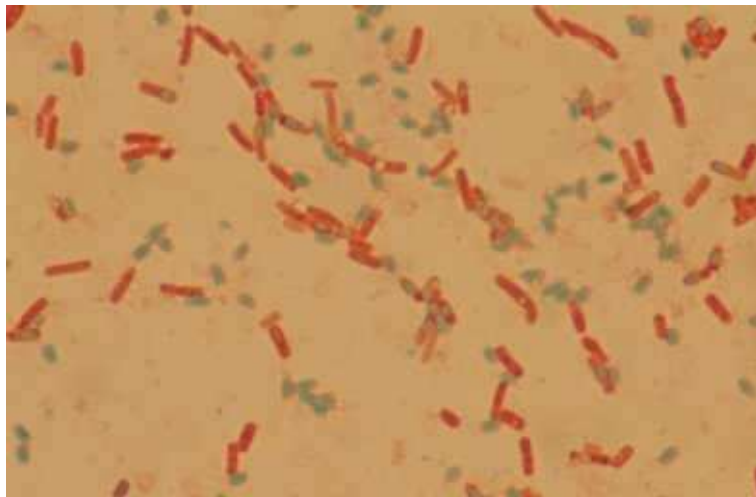
Vyskytují se hlavně na solených potravinách, kde mohou tvořit žluté, oranžové až intenzivně růžové kolonie. Toto zbarvení je způsobeno karotenoidními barvivy, přítomnými v jejich buňkách. Tato barviva chrání buňky před letálními účinky ultrafialové složky slunečního světla, a proto se uvedené bakterie vyskytují jako častá vzdušná kontaminace. Dnes je uznáváno devět druhů tohoto rodu. Některé z nich karotenoidní barviva netvoří. [2]

1.6 *Bacillus cereus*

Běžně se vyskytuje v půdě a v prachu a kontaminuje i různé materiály odebrané pro mikrobiologické vyšetření. Jeho přítomnost je hodnocena často jako náhodné znečištění. Jako podmíněný patogen se může uplatnit jen u hostitele s výrazně sníženou imunitou, pak může vyvolat pneumonii, i meningitidu. [2, 26]

1.6.1 Morfologie

Jde o grampozitivní tyčku neopouzdrěnou, tvořící endospory. Kultivačně je zcela nenáročný, roste dobře na všech běžných půdách. Na krevním agaru jsou kolonie obklopeny výraznou zónou úplné hemolýzy. [2, 27]



Obr. 6 *Bacillus cereus* [26]

1.6.2 Metabolismus

Bacillus cereus je striktně nebo fakultativně aerobní, katalasa – negativní.

1.6.3 Patogenita

V rozporu s nízkou patogenitou je *B. cereus* producentem celé řady toxinů a enzymů. První skupinu tvoří C fosfolipázy, které štěpí fosfatidylcholin, fosfatidylinositol a sfingomyelin. Hemolysiny jsou dva, první z nich (cereolysin) má vlastnosti oxygenlabilních hemolysinů a je letální pro myš, druhý hemolysin není oxygenlabilní. Cereový enterotoxin vedle své en-

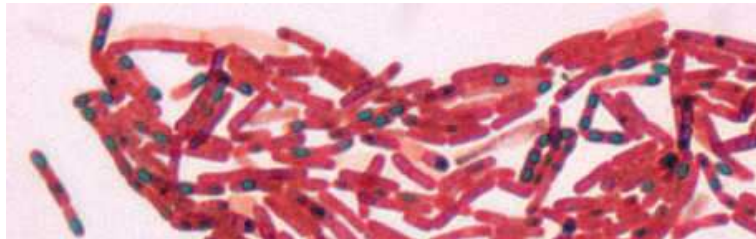
terotoxické aktivity zvyšuje permeabilitu cév, je nekrotizující. Jeho spory jsou velmi termorezistentní. [2, 4]

1.7 *Bacillus subtilis*

V přírodě nejrozšířenější *Bacillus subtilis* je téměř všudypřítomný. Tvoří poměrně malé peritrichální buňky (0,7 x 2 až 3 μm) a produkuje několik polypeptidových antibiotik. [2, 4]

1.7.1 Morfologie

Má totožnou strukturu jako *Bacillus cereus*.



Obr. 7 *Bacillus subtilis* [23]

2 FOSFÁTY

Fosfor je jeden z nejdůležitějších prvků v chemii všech živých organismů. Ačkoliv fosfor představuje pouze 1 % celkové váhy lidského těla, ve srovnání s 65 % kyslíku, 18 % uhlíku a 10 % vodíku, je jedním z esenciálních prvků pro lidský organismus. [6]

Máme řadu chemických procesů, které zahrnují fosfor do svých reakcí. Faktem je, že převážná většina biochemických reakcí probíhá ve vodě nebo vodním médiu, nebo na jeho povrchu. Naproti tomu fosfáty reagují s vodou velmi pomalu, ale jsou dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. [6]

Fosfor hraje velkou roli v mechanismu transportu energie, pomocí které mění chemické vazby v jiné, nebo mění různé formy energie, jako je kinetická energie svalového pohybu, elektrická energie úhoře nebo světelná energie u světlušek. Navíc je hlavní součástí adenosintrifosfátu (ATP) ve svalové kontrakci živých zvířat, a vyskytuje se též během změn, které probíhají v období rigor mortis. [6]

Fosfor se velmi často v biologických systémech vyskytuje ve skupině s bílkovinami. Tyto „konjugované“ bílkoviny zahrnují nukleoproteiny a fosfoproteiny. Třetí skupinou jsou lipoproteiny, které jsou obvykle přidruženy k fosfolipidům. Nejdůležitějšími fosfoproteiny, které se nacházejí v potravinách jsou fosfoproteiny obsažené ve vejcích (fosfovitin, vitelin, vitellenin a ovalbumin) a v mléce (kasein). Z tohoto výčtu, kasein představuje průměrně 2,7 % obsahu v kravském mléce, zatímco ovalbumin, fosfoglykoprotein představuje více než 50 % z celkového množství bílkovin ve vejcích. [6]

Fosfor můžeme také nalézt v potravinách živočišného a rostlinného původu ve spojení s lipidy ve formě mono-, diesterů obecně nazývaných jako fosfolipidy. Glycerolfosfolipidy jsou deriváty kyseliny glykofosforečné, které obsahují O – acyl, O – alkyl, nebo O – alkenyl skupinu vázanou na glycerolový zbytek. Lipidy v chudých částech masa savců a ptáků obsahují pouze 0,5 až 1 % fosfolipidů, mezi něž patří lecitin (fosfatidylcholin), fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin a různé kyselé glycerolfosfatidy jako kardiolipin, které ve velké míře převládají. Fosfolipidy představují 0,2 až 1,0 % z celkového množství kravského mléka. Do této skupiny fosfolipidů patří fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin a sfingomyelin. [6]

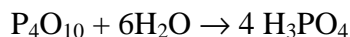
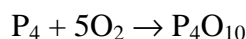
2.1 Chemie fosfátů v jídle

2.1.1 Názvosloví fosfátů

Fosfáty mohou být pojmenovávány podle různého názvosloví. Proto není těžké najít kromě systematického pojmenování fosfátu také pojmenování, které patří do jiné skupiny názvosloví. Nejčastěji je názvosloví fosfátu rozdělováno do tří skupin. První systém staví na vyčíslení počtu aniontů a kationtů. Druhý systém pojmenovává fosfáty podle počtu kationtů a vodíků a dále specifikuje o jakou sůl se jedná. Třetí systém, který je nejčastěji užíván FAO/WHO stojí na základě číselného zhodnocení počtu kationtů, vodíku a samozřejmě i na počtu atomů fosforu, i když je tam pouze jeden. [6]

2.1.2 Chemická struktura

Moderní průmyslová výroba fosfátů termickými procesy začíná dvoustupňovou reakcí provedenou v jednoduchém systému reaktorů.



Tento proces je vysoce exotermický. [6]

2.2 Fosfáty v mléce a mléčných výrobcích

Některé z nejdůležitějších a nejstarších aplikací fosfátu do jídla nalézáme v mléčných výrobcích, kde jsou používány za různým účelem jako je kondenzace, sterilace mléka, úprava textury, tavení a při rozšiřování výroby sýrů. [6]

2.2.1 Fosfáty v mléčných výrobcích

Při určování mléka hrají výraznou roli na složení nejen rozdílné druhy zvířat, ale i rozdílná plemena a samozřejmě závisí i na chovu daných zvířat. Dalším určujícím faktorem jsou genetické dispozice daného druhu, či plemene. [6]

Jednou z nejstarších a nejdůležitějších aplikací fosfátů do jídla, do mléčných výrobků, je výroba sýrů, především proces výroby sýru, sýrové pomazánky a jím příbuzných produktů, ve kterých fosfáty slouží k jejich emulgaci, a při výrobě čerstvých sýrů.

Kaseinová sraženina, která vzniká během výroby sýru, je zapříčiněna vlivem elektrostatických sil a dalších faktorů. Změny náboje na povrchu micel mléčného kaseinu vedou ke snížení pH, toto snížení pH může být též zapříčiněno přímou acidifikací, bakteriální startovací kulturou, nebo oběma metodami, kdy produktem je „kyselý tvaroh“. Pro přímou acidifikaci, kdy se pH snižuje na 4,5 – 4,7, je povolena kyselina fosforečná, která se používá pro výrobu tvarohového sýru a pro dodání příchutě mozzarella je toto pH upravováno na pH 5,4. Na druhou stranu, srážení mléčného kaseinu nemusí být vždy v důsledku změny pH, tuto změnu může vyvolat též přidavek sýřicího enzymu za vzniku tzv. „sladkého tvarohu“ nebo „sýřeného tvarohu“.

Koagulace kravského a ovčího mléka pomocí syřidla byla postupně snižována přidavkem alkalického pyrofosfátu.

Aplikace fosfátů do jídla v procesu výroby sýrů je jednou z nejstudovanějších a nejchráněnějších procesů v historii výroby „moderního“ jídla.

Po chemické stránce se jedná o proces peptizace a částečného rozpouštění kaseinu jako důsledku konverze vápníku na kaseinát sodný. K těmto efektům přispívají emulgující soli, pomocí kterých se mění kaseinový gel na sol. Ačkoliv tavící soli nejsou pravými emulsifikátory, protože nejsou povrchově aktivní látky, přesto byly zařazeny, ač nesprávně, do skupiny „emulgujících solí“. [6]

2.2.2 JOHA HBS

Tavící sůl JOHA HBS, má silné inhibiční vlastnosti na růst gram-pozitivních bakterií, kde se rozmezí koncentrací pohybuje od 0,05 do 0,3 % JOHA HBS. Při těchto koncentracích JOHA HBS zcela brzdí jejich růst. S přibývajícím koncentrací (0,3 %) se objevují bakteriostatické účinky u plísní. Na rozdíl od toho gram-negativní bakterie jsou schopny růst i při koncentracích, které se pohybují kolem 1 % JOHA HBS.

Baktericidní účinky tavící soli JOHA HBS na vybrané kmeny bakterií ukazuje tabulka v příloze I. [30]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 KULTIVACE BAKTERIÍ

Kultivace je nejdůležitější diagnostickou metodou přímého důkazu většiny bakterií. Na kultivačních půdách určených pro diagnostiku bakterií rostou obvykle také kvasinky a plísně.

V diagnostice bakterií užíváme tzv. kultivace statické, kdy bakterie narostou v ohraničeném množství kultivační půdy, např. ve zkumavce nebo Petriho misce. Jejich růst probíhá podle růstové křivky, kterou lze matematicky definovat. Po vyčerpání živin nebo po nahromadění metabolitů, které je obvykle spojeno s posunem pH, se růst zastavuje. Proto bakterie na stejné kultivační půdě vytvoří za stejnou dobu morfologicky stejné nebo podobné kolonie. Podle jejich vzhledu můžeme některé bakterie zařadit do rodu, nebo zúžit široké spektrum metod dalšího určování.

Kontinuální kultivace (nebo též submerzní kultivace) se užívá při výrobě antibiotik nebo v potravinářském průmyslu.

- Kultivace slouží k přímému průkazu bakterií v klinickém materiálu.
- Kultivací zjistíme, zda se jedná o jeden druh či několik druhů bakterií.
- Cílem kultivace je získání tzv. čisté kultury bakterií, složené z bakterií stejného rodu i druhu, čistou kulturu použijeme k bližšímu určení bakterií diagnostickými metodami, např. mikroskopií, biochemickým určením, antigenní analýzou.
- U některých bakterií můžeme podle morfologie kolonií na pevných půdách určit rod nebo alespoň skupinu rodů. [7]

3.1 Podmínky kultivace

Bakterie mají značně různorodý metabolismus, a proto také značně rozdílné nároky na kultivaci. Při volbě půdy a podmínek pro kultivaci se snažíme simulovat podmínky, které mají bakterie u člověka nebo u zvířete.

Obecně lze říci, že saprofytické bakterie mají nároky na kultivaci skromné, zároveň bývají odolné vůči nepříznivým vnějším vlivům a obvykle jsou také rezistentní na řadu antibiotik.

1. Dostatek vhodných živin. Živiny jsou obsaženy v kultivačních půdách. Pro diagnostiku významných bakterií užíváme bohatých půd, které obsahují masový extrakt, peptony, nezbytné ionty a růstové faktory. Některá média obsahují také krev nebo její složky.
2. Vlhkost půd. Dostatečná vlhkost půdy je pro kultivaci nezbytnou podmínkou. Na polosuchých půdách bakterie rostou špatně nebo vůbec ne.
3. Optimální pH půdy. Většina bakterií vyžaduje pro růst pH blízké neutrálnímu. Špatně nastavené pH je nejčastější příčinou neúspěšné kultivace. Některé selektivní půdy mají pH kyselé nebo alkalické, aby se zabránilo růstu běžných bakterií a na půdách vyrostly mikroby, které tato pH snesou.
4. Izotonie média. Izotonie medií pro kultivaci je zajištěna přidáním 0,5 – 1,0 % NaCl. Vyšších koncentrací NaCl se používá pro přípravu selektivních půd, např. krevní agar s 10 % NaCl pro stafylokoky.
5. Kultivační teplota. Optimální kultivační teplota pro lidské patogenní bakterie je 37°C. Na tuto teplotu je nastavena většina termostatů používaných ke kultivaci. Nižší kultivační teploty (28°C) se užívá pro kvasinky a plísně, naopak vyšší teplotu (42°C) vyžaduje *Campylobacter*. Některé bakterie však mohou růst i při teplotě chladničkové, tj. 5 – 10°C.
6. Délka kultivace. Většina aerobních a fakultativně anaerobních bakterií naroste na pevných půdách za 16 – 20 hodin (přes noc).
7. Atmosféra pro kultivaci. Podle vztahu mikrobů ke kyslíku je lze dělit do několika skupin:
 - a) aerobní a fakultativně anaerobní (kterých je většina) bakterie kultivujeme za přístupu vzduchu, bez jakéhokoliv ovlivňování atmosféry.
 - b) Anaerobní bakterie v běžné atmosféře nevyrostou a musíme je proto kultivovat bez přístupu kyslíku. Anaerobní podmínky kultivace můžeme dosáhnout ve speciálních termostatech nebo v anaerostatech. Anaerostat je nádoba s hermeticky uzavřeným víkem, kde vložení přidané chemikálie vytvoří prostředí vhodné pro anaerobní kultivaci.

- c) Mikroaerofilní bakterie. Např. laktobacily nebo kampylobaktery vyžadují atmosféru se sníženou tenzí O_2 . Ke kultivaci mikroaerofilních bakterií užíváme anaerostatu s vhodným vyvíječem plynů, ale bez katalyzátoru. [7]

3.2 Kultivační půdy

1. Rozdělení půd

Půdy užíváme pro kultivaci bakterií a můžeme je dělit podle celé řady kritérií.

- a) Podle původu. Půdy přirozené se používaly před mnoha lety, dnes byly nahrazeny půdami připravovanými uměle. Donedávna si půdy připravovala každá laboratoř, dnes jsou základy půd v suchém stavu distribuovány mnoha firmami ve velkém výběru. Zrychlení dopravy a technické možnosti chlazení umožnily distribuovat půdy již rozlité ve zkumavkách nebo Petriho miskách, čehož využívají především malé laboratoře.
- b) Podle složení. Ve výzkumu se užívá definovaných půd (médií), kde je detailně známo chemické složení. Pro potřeby diagnostiky jsou tyto půdy příliš nákladné.
- c) Podle konzistence dělíme kultivační půdy na tekuté a pevné, případně polotuhé.

Tekuté půdy slouží především pro pomnožení bakterií, což se obvykle projeví zákallem půdy, nedovolují však získat čistou kulturu nutnou pro bližší určení mikroba.

Pevné půdy se užívají při diagnostice častěji. Růst se projeví tvorbou kolonií, podle kterých můžeme aspoň orientačně určit rod bakterií, můžeme i zjistit, zda se jedná o jediný nebo o více druhů bakterií, a konečně můžeme získat čistou kulturu, nezbytnou pro další podrobné určení.

Tuhé půdy se připravují z půd tekutých přidáním agaru, méně často želatiny. Dodává se již rozemletý na prášek. [7]

Polotuhé půdy

- d) Podle funkce.
- 1) Půdy základní. Základní půdou, ze které se připravuje většina ostatních půd, je masopeptonový bujón. Bujón je složen z masového extraktu, peptonu, což je směs peptidů, a z malého množství NaCl. Přidání 1 – 2 % agaru

vznikne z bujónu masopeptonový agar žlutohnědé barvy, nazývaný živný agar. K těmto základním půdám přidáváme složky, které půdu obohacují např. o cukry, růstové faktory, krev, čímž vznikají půdy obohacené, nebo se naopak přidávají složky, které růst některých bakterií potlačují. Tyto pak činí půdy selektivní, např. antibiotika, soli, barviva.

- 2) Půdy diagnostické vzniknou z půd základních přidáním složek, které různě reagují na způsob metabolismu. Výsledkem je pak odlišný růst jednotlivých rodů nebo druhů bakterií.
- 3) Půdy selektivní obsahují látky potlačující růst některých skupin bakterií, ale nebrání růstu těch, které na nich mají být izolovány. Do půd přidáváme vyšší koncentrace solí, antibiotika, barviva, žluč nebo některé další sloučeniny.
- 4) Půdy selektivně diagnostické jsou kombinací obou předchozích skupin.
- 5) Půdy pomnožovací jsou většinou tekuté, slouží k pomnožení bakteriálních patogenů tam, kde jsou přítomny v malém množství.
- 6) Půdy transportní jsou obvykle připraveny ve zkumavkách. Neobsahují žádné živiny a slouží pouze k zajištění přežití bakterií během transportu do laboratoře.
- 7) Půdy se sníženým redox-potenciálem. Půdy pro kultivaci aerobních bakterií a fakultativně anaerobních bakterií se vyznačují kladným oxidoredukčním potenciálem (Eh). Tento se měří v milivoltech. Běžný masopeptonový bujón má hodnotu Eh +300 mV. Naproti tomu anaerobní bakterií potřebují pro růst hodnotu oxidoredukčního potenciálu okolo -200 mV. Toho se dosahuje přidáním redukujících látek do půd. Jedná se zejména o cystein, thiosloučeniny, glukózu a další látky. [7]

3.3 Příprava půd

Většinu půd připravujeme ze sušených základů, komerčně vyráběných firmami. Podle návodu výrobce rozpustíme potřebné množství sušené půdy a rozvaříme při 100°C ve vodní lázni nebo v Arnoldově přístroji a zkontrolujeme pH. Půdy tekuté rozplníme do sterilních zkumavek a zazátkujeme. Zkumavky pak sterilizujeme v autoklávu po dobu 20 - 30 minut

při teplotě 115–21 °C. Tuto teplotu však nesnesou půdy obsahující cukry. Tyto můžeme jen znovu zahřát na 100 °C, např. v Arnoldově přístroji. Arnoldův přístroj se podobá autoklávu, nepracuje však s přetlakem, proto dosahuje teplot blízkých 100 °C.

Agarové půdy obvykle sterilizujeme v menších, asi 1000 ml Erlenmayerových baňkách a za tepla je přísně asepticky rozléváme do připravených sterilních Petriho misek.

Sklo a plasty pro přípravu půd. Zkumavky používáme skleněné, sterilizované v horkovzdušném sterilizátoru při 160 – 180 °C po dobu 60 – 120 minut. U malých zkumavek používáme vatových zátek, k uzavření velkých, dlouhých zkumavek jsou vhodné hliníkové kloboučky.

Skleněné Petriho misky byly dnes nahrazeny miskami plastovými pro jedno použití, které jsou sterilizovány již při výrobě v zatavených balíčcích persterilem. [7]

3.4 Očkování půd

Očkováním rozumíme přenesení malého množství bakterií nebo vzorku vyšetřovaného materiálu do čerstvé tekuté nebo pevné půdy.

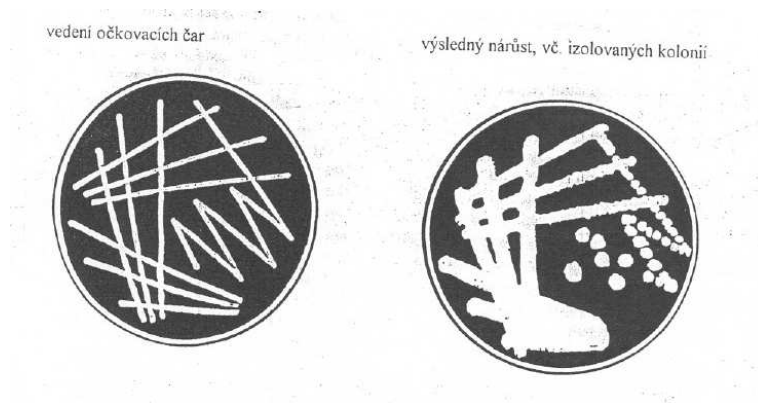
Petriho misky nebo zkumavky popisujeme pozorně vhodnou tužkou na sklo, aby nedošlo k záměně.

Očkovat na půdy je nutno v čistém prostředí bez proudícího vzduchu. V místnosti je nutno zabránit prudšímu pohybu dalších osob a průvanu. Vlastní očkování je nutno provádět asepticky, aby nedošlo ke kontaminaci.

1. Očkování do tekuté půdy. Kličku vyžeháme do červeného žáru a pak asi 2 – 4 vteřiny necháme zchladnout. Kličku namočíme do tekutého vzorku (nebo půdy) a zkumavku ihned uzavřeme. Teprve potom otevřeme druhou zkumavku s čistou půdou, její zátku uchopíme malíkem pravé ruky a ožehněme hrdlo zkumavky plamenem. Kličku zavedeme do zkumavky, aniž bychom se dotkli stěn zkumavky, ponoříme do tekuté půdy a rozetřeme o stěnu zkumavky v místě hladiny bujony. Před uzavřením opět ožehněme zátku i hrdlo zkumavky plamenem kahanu.

2. Očkování na šikmý agar. Používáme pro uchování kultury nebo pro déle trvající kultivaci. Zkumavku otevřeme výše uvedeným způsobem a povrch šikmého agaru naočkujeme kličkou hadovitým pohybem odspodu nahoru. Před uzavřením ožehněme jak zátku, drženou malíkem pravé ruky, tak hrdlo zkumavky. Zátku v žádném případě neodkládáme na stůl.
3. Očkování půd v Petriho misce. Slouží k tomu, aby na misce vyrostly jednotlivé izolované kolonie.
 - a) Nabereme kulturu bakterií z tekuté půdy, jak bylo popsáno výše, a přísně asepticky naočkujeme na povrch půdy 2 – 3 klikaté čáry. Kličku držíme jako pero, v ostrém úhlu s povrchem půdy, abychom neporušili její povrch.
 - b) Aniž nabereme další materiál, vyžiháme kličku a rozočkujeme bakterie dalšími 3 čarami vedenými jedním směrem přes čáry již naočkované. Kličku pak vyžiháme.
 - c) Misku otočíme o 90° a totéž opakujeme znovu.
 - d) Z posledních čar rozočkujeme bakterie po celém zbytku povrchu misky tak, aby se klička nedotkla dříve naočkovaných míst. Po kultivaci by pak měly narůst izolované kolonie, od sebe navzájem oddělené.
 - e) Naočkované Petriho misky ukládáme ke kultivaci do termostatu vždy víčkem dolů, aby se na něm neusazovala kondenzní voda.

[7]



Obr. 8 Vedení očkovacích čar [7]

3.4.1 Růst bakterií na půdách

1. Růst v tekutých půdách. Projeví se obvykle zákalem. Tento zákal bývá přes celý sloupec bujónu u bakterií fakultativně anaerobních, kterých je většina. Později se na dně hromadí sediment. Aerobní bakterie tvoří zákal s povrchovou blankou.
2. Růst na pevných půdách. Na pevných půdách tvoří bakterie charakteristické útvary, zvané kolonie. Po konstantní době kultivace na půdě tvoří bakterie kolonie stejné velikosti a tvaru. Prodlužováním kultivace se kolonie zvětšují, což znesnadňuje jejich reko-gnoskaci. Kolonie vzniká z jediné bakterie. Každá kolonie představuje čistou kulturu složenou z několika desítek až stovek milionů buněk stejného kmene daného druhu bakterie. Podle vzhledu kolonií můžeme v některých případech určit rod bakterií, v ostatních odhadnout alespoň skupinu rodů, což nám umožní zúžit rozsah dalších vyšetřovacích postupů. [7]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje, zařízení a pomůcky

Mikropipety – 10 – 100 μ l

Mikrovlnná trouba – Elektrolux

Parní sterilátor – autokláv

Biologický termostat – 37 °C – Laboratorní přístroje

Horkovzdušná sušárna

Váhy

Chladnička – Elektrolux

Laboratorní sklo

Plynový kahan

4.2 Kultivační půdy

4.2.1 Masopeptonový agar – (MPA)

Složení:

Látka	Množství (g/l)
Masový výtažek	6,0
Pepton	8,0
NaCl	5,0
Agar	15,0
H ₂ O	1000,0 ml

Konečné pH (při 25 °C) 6,8 až 7,2.

Příprava půdy:

Jednotlivé složky bujónu byly naváženy do 1000,0 ml destilované vody a zahřáty do úplného rozpuštění. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut.

4.2.2 Mueller hinton agar – (MHA)

Složení:

Látka	Množství (g/l)
Kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5
Hovězí srdcová infuse	2,0
Škrob, rozpustný	1,5
Agar	17,0
Konečné pH (při 25 °C) 7,3 ±	0,2

Příprava půdy:

38,0 g přípravku bylo naváženo do 1000,0 ml destilované vody a zahřáto do úplného rozpuštění. Sterilizace byla provedena v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut.

4.2.3 Nutrient Broth

Složení:

Látka	Množství (g/l)
Lab-Lemco	10,0
Pepton	10,0
NaCl	5,0

Příprava půdy:

25,0 g přípravku bylo naváženo do 1000,0 ml destilované vody a zahřáto do úplného rozpuštění. Sterilizace byla provedena v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut.

4.3 Roztoky a ostatní chemikálie

Kyselina benzoová

- 10g/ 100 ml

Denaturovaný líh

Pro přípravu všech médií a roztoků byla použita destilovaná voda.

4.4 Použité bakteriální kmeny

Pro stanovení byly použity kultury bakterií, kultivované v laboratorních podmínkách na živném médiu Masopeptonový agar (MPA):

Escherichia coli

Staphylococcus aureus

Micrococcus luteus

Bacillus subtilis

Bacillus cereus

Bakteriální kmeny byly uchovávány na živné půdě MPA na Petriho miskách a ve zkumavkách. Přeočkovány byly 1 krát za týden. Tyto kmeny byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Poté byly všechny bakterie uchovávány v chladničce při teplotě 6 °C.

4.5 Testování tavící soli JOHA HBS

JOHA HBS – výrobek č. 7 7091

JOHA HBS jedná se o tavící sůl s bakteriostatickým účinkem.

Složení : E 452 polyfosforečnan sodný, E 339 fosforečnan sodný

Specifikace: Obsah P ₂ O ₅ v %	69,0 ± 1,0
Hodnota pH roztoku 1 %	6,0 ± 0,5
Těžké kovy celkem	max. 20 ppm
Arsen	max. 1 ppm
Olovo	max. 4 ppm
Fluoridy	max. 10 ppm

Speciální vlastnosti: posun pH 0,0 – 0,1

Schopnost výměny iontů SILNÁ

Krémovací schopnost ŽÁDNÁ

Použití: JOHA HBS inhibuje rozvoj anaerobních sporetvorných bakterií, např. *Clostridium tyrobutyricum*. Dávkování 0,5 –1,2 % na zpracovávanou surovinu nebo 0,3 –1,0 % na finální výrobek. Dávka JOHA HBS se počítá do celkové dávky tavících solí.

Bezpečnost práce a ochrana životního prostředí:

Použití ochranných brýlí, rukavic. Prašnost 6 mg/m³, odstranit vysrážením. Nevypouštět do země a odpadních vod.

Skladování: V chladu a suchu, chránit před zvlhnutím.

4.6 Použité metody stanovení

4.6.1 Kultivace na pevné půdě

Účelem této kultivace bylo zjistit baktericidní účinky kyseliny benzoové a tavicí soli JOHA HBS. Byl sledován úbytek nárůstu daných kmenů bakterií v závislosti na koncentraci soli a kyseliny.

Metodika

Byl připraven 2 % standardní roztok JOHA HBS. Z tohoto standardního roztoku byly připraveny roztoky o koncentraci 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2 %. Následně byl připraven standardní roztok kyseliny benzoové s ethanolem. Tento roztok byl naředěn na koncentrace roztoků 0,1; 0,3; 0,6; 0,9 % a čistý ethanol.

Bylo nachystáno deset Petriho misek s Müeller Hilton agarem. Pomocí kultivační metody přelitím, byly naočkovány kultury bakterií. Po naočkování byly Petriho misky dány do sušárny, kde byly ponechány cca 25 minut. Po vytažení ze sušárny byly na Petriho misky vloženy sterilizované terčíky. Postupně bylo na terčíky pipetovány roztoky JOHA HBS a kyseliny benzoové v množství 10 µl na jeden terč.

Následně bylo vše dáno kultivovat do termostatu o teplotě 37°C po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby byly změřeny poloměry terčů, které se vytvořily v důsledku antimikrobiálních účinků tavicí soli JOHA HBS.

Vyhodnocení:

Tabulka 1 Vyhodnocení JOHA HBS a kyseliny benzoové

	JOHA HBS		Kyselina benzoová	
	Koncentrace [%]	Průměr [mm]	Koncentrace [%]	Průměr [mm]
<i>E. coli</i>	0,1	6	0,1	10
	0,5	7	0,3	11
	1,0	Negativní	0,6	12
	1,5	Negativní	0,9	12
	2,0	Negativní	ethanol	13
<i>B. subtilis</i>	0,1	4	0,1	11
	0,5	5	0,3	12
	1,0	6	0,6	12
	1,5	7	0,9	12
	2,0	7	ethanol	13
<i>B. cereus</i>	0,1	Negativní	0,1	Negativní
	0,5	Negativní	0,3	Negativní
	1,0	Negativní	0,6	Negativní
	1,5	Negativní	0,9	Negativní
	2,0	Negativní	ethanol	Negativní
<i>S. aureus</i>	0,1	6	0,1	11
	0,5	6	0,3	12
	1,0	7	0,6	13

	1,5	8	0,9	13
	2,0	9	ethanol	13
<i>M. luteus</i>	0,1	Negativní	0,1	9
	0,5	Negativní	0,3	13
	1,0	Negativní	0,6	14
	1,5	Negativní	0,9	15
	2,0	Negativní	ethanol	15

Tabulka 2 Vyhodnocení JOHA HBS a kyseliny benzoové - opakování

	JOHA HBS		Kyselina benzoová	
	Koncentrace [%]	Průměr [mm]	Koncentrace [%]	Průměr [mm]
<i>E. coli</i>	0,1	6	0,1	9
	0,5	7	0,3	9
	1,0	7	0,6	10
	1,5	8	0,9	11
	2,0	9	ethanol	11
<i>B. subtilis</i>	0,1	4	0,1	10
	0,5	5	0,3	12
	1,0	6	0,6	12
	1,5	7	0,9	13
	2,0	8	ethanol	13
<i>B. cereus</i>	0,1	Negativní	0,1	Negativní
	0,5	6	0,3	Negativní
	1,0	7	0,6	Negativní
	1,5	8	0,9	Negativní
	2,0	8	ethanol	Negativní
<i>S. aureus</i>	0,1	5	0,1	12
	0,5	6	0,3	12
	1,0	7	0,6	11

	1,5	7	0,9	13
	2,0	9	ethanol	14
<i>M. luteus</i>	0,1	6	0,1	9
	0,5	7	0,3	10
	1,0	8	0,6	11
	1,5	9	0,9	11
	2,0	10	ethanol	11

Závěr:

Projevily se baktericidní účinky, jak tavící soli JOHA HBS, tak i kyseliny benzoové. Kyselina benzoová ve směsi s ethanolem jevila větší baktericidní účinky než JOHA HBS.

4.6.2 Kultivace na pevné půdě s použitím časového odstupu**Metodika**

Bylo připraveno 2 x 600 ml Müeller Hiltonova agaru. Následně byl rozplněn do 100 ml nádob. Byly připraveny roztoky, kam bylo přidáno 0,1; 0,4; 0,8; 1,0; 1,5 g soli JOHA HBS. Vše bylo dáno do autoklávu vysterilovat (20 minut při 121 °C). Po sterilaci byl agar nalit na Petriho misky. Jedna část byla dána do ledničky a ponechána zde 24 hodin. Na druhou část byly očkované příslušné kultury. Následně po uplynutí 24 hodin byly na každou plotnu byly naočkované příslušné kultury pomocí sterilní očkovací kličky. Každá jednotlivá plotna byla rozdělena na šest částí. Jedna část pro každou kulturu a jedna část jako kontrolní. Vše bylo dáno do termostatu kultivovat při 37 °C na 24 hodin.

Závěr:

Se zvyšující se koncentrací soli JOHA HBS v agaru, docházelo k úbytku nárůstu kolonií na plotnách. Potvrzeny baktericidní účinky tavicí soli JOHA HBS při vyšších koncentracích soli v agaru. Viditelnější úbytek mikroorganismů v závislosti na koncentraci byl pozorován u Petriho misek, které byly ponechány 24 hodin v lednici.

4.6.3 Kultivace v tekutém médiu a následná kultivace na pevné půdě

Metodika

Bylo připraveno 1 400 ml Nutrient Broth, který byl dán na 20 minut sterilizovat do autoklávu. Následně byly připraveny roztoky JOHA HBS o koncentracích 0,1; 0,4; 0,8; 1,0; 1,5 %. Tyto roztoky byly rozplněny do příslušných zkumavek, kam bylo přidáno Nutrient Broth. Tyto zkumavky byly opět dány vysterilizovat. Do vychlazených zkumavek byly naočkovány kultury bakterií. Takto připravené zkumavky byly dány kultivovat podobu 12-ti hodin a při teplotě 37°C. Po uplynutí stanovené doby kultivace, byly vzorky rozočkovány na pevnou půdu a dány opět ke kultivaci. To samé se provedlo se zkumavkami, které byly dány kultivovat na dalších 12 hodin. Po této době byly opět rozočkovány na Petriho misky a dány ke kultivaci na 12 hodin při 37 °C.

Následovalo vyhodnocení.

Závěr:

Se zvyšující koncentrací soli JOHA HBS docházelo k viditelnému snižování nárůstu daných kmenů bakterií. Výsledky viz. Příloha II

ZÁVĚR

Tato práce se zabývá sledováním antibakteriálních účinků tavící soli JOHA HBS. Pomocí tří kultivačních metod: kultivace na pevné půdě, kultivace na pevné půdě s časovým odstupem a kultivace v tekutém médiu s následnou kultivací na pevné půdě. Při těchto kultivačních byly použity různé koncentrace roztoků soli v rozmezí od 0,1 do 2 %. Ve všech třech metodách byly pozorovány antibakteriální účinky JOHA HBS, které se zvyšujícími koncentracemi zvětšovaly.

Ve srovnání těchto tří metod, nejvíce průkazná byla metoda kultivace nejdříve v tekutém médiu a následná kultivace na pevné půdě. Při koncentraci 0,1 % byl velký nárůst všech kmenů bakterií. Při koncentracích 0,4; 0,8 % byl nárůst *E.coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*. Při koncentraci 1 % byly již velmi patrné antibakteriální účinky JOHA HBS. Při koncentraci 1,5 % již nedocházelo k nárůstu žádného kmenu bakterií.

U gram-negativních bakterií (*Escherichia coli*) byly k prokázání antibakteriálních účinků nutné koncentrace soli JOHA HBS větší než 1 %. U gram-pozitivních bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lutes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*) na důkaz antibakteriálních účinků stačily koncentrace od 0,4 %, jak ukazuje Příloha II.

V Evropské unii je povolené maximum tavící soli v procesu výroby sýrů a sýrových pomazánek 2 % P_2O_5 . Při studiích bylo dokázáno, že stačí daleko menší koncentrace P_2O_5 , aby došlo k inhibici růstu mikroorganismů. [29]

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Academia, Praha 2002, 363 stran, ISBN 80-200-1024-6
- [2] BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., VÁNA, J. *Lékařská mikrobiologi*. Narvil 1996, 558 stran
- [3] HRUBÝ, Stanislav., TUREK, Bohumil. *Mikrobiologická problematika ve výživě*. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno 1996, 145 stran, ISBN 57-873-96
- [4] BOURGEOIS, C.M., MESCLE, J.F., ZUCCA, J. *Microbiologie alimentaire – Aspect mikrobiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires*. Technique et Documentation (Lavoisier), Paris 1988, ISBN 2-85206-450-2
- [5] ROSYPAL, Stanislav. *Bakteriologie a virologie*. Scientia, 1994, 67 stran, ISBN 80-85827-16-6
- [6] MOLINS, Ricardo A. *Phosphates in food*. CRC Press 1991, ISBN 0-8493-4588-X
- [7] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie II. – Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. Brno 2000, ISBN 80-210-2272-8
- [8] *Escherichia coli* [online]. [cit. 2006-06-25. 16:25 SEČ].
Dostupný z:< <http://www.arrowscientific.com.au/new/mainarticle2.phtml?articleid=449f37f1dd>>
- [9] *Escherichia coli* [online]. [cit. 2006-06-29. 13:48 SEČ].
Dostupný z:< <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap15.html> >
- [10] *Escherichia coli – What does it mean?* [online]. [cit. 2006-07-08. 16:05 SEČ].
Dostupný z:< <http://people.ku.edu/~jbrown/ecoli.html>>
- [11] *Staphylococcus aureus* [online]. [cit. 2006-07-09. 13:25 SEČ].
Dostupný z:< <http://ag.arizona.edu/pubs/health/foodsafety/az1092.html> >
- [12] *Staphylococcus aureus* [online]. [cit. 2006-07-09. 14:15 SEČ].

Dostupný z: < <http://textbookofbacteriology.net/s.aureus.html>>

[13] *Micrococcus luteus* [online]. [cit. 2006-07-09. 15:22 SEČ].

Dostupný z:< <http://www.sunysccc.edu/academic/mst/microbes/09mlute.htm> >

[14] *Micrococcus luteus* [online]. [cit. 2006-07-13. 14:58 SEČ].

Dostupný z: < <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Micrococcus> >

[15] *Mikrooccus luteus* [online]. [cit. 2006-07-13. 14:37 SEČ].

Dostupný z: < <http://www.madsci.org/posts/archives/nov99/943409064.Mi.r.html> >

[16] *Mikrooccus luteus* [online]. [cit. 2006-07-13. 14:49 SEČ].

Dostupný z: < <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/micr.htm>>

[17] *Mikrooccus luteus* [online]. [cit. 2006-07-13. 16:08 SEČ].

Dostupný z:

<<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/images/bakterie/mikro/mlute7h.jpg>>

[18] *Mikrooccus luteus* [online]. [cit. 2006-07-13. 14:37 SEČ].

Dostupný z:<

<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/images/bakterie/kolonie/mluteh.jpg>>

[19] *Escherichia coli* [online]. [cit. 2006-07-19. 14:54 SEČ].

Dostupný z:< http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli >

[20] *Escherichia coli* [online]. [cit. 2006-07-13. 15:37 SEČ].

Dostupný

z:<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/32/EscherichiaColi_NIAID.jpg>

[21] *Escherichia coli* [online]. [cit. 2006-07-13. 14:37 SEČ].

Dostupný z:< http://www.health.state.ny.us/nysdoh/communicable_diseases/en/e_coli.htm>

[22] *Bacillus subtilis* [online]. [cit. 2006-07-13. 14:37 SEČ].

Dostupný z:<

http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/Labs/Microbiology/Prepared_Slides/Bacillus_subtilis_1000_P7090109.JPG >

[23] *Bacillus subtilis* [online]. [cit. 2006-07-13. 14:37 SEČ].

Dostupný z:<

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/7a/Bacillus_subtilis_Spore.jpg/290px-Bacillus_subtilis_Spore.jpg >

[24] *Bacillus subtilis* [online]. [cit. 2006-07-13. 14:37 SEČ].

Dostupný z:<

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12682299&dopt=Abstract >

[25] *Staphylococcus aureus* [online]. [cit. 2006-07-15. 14:08 SEČ].

Dostupný z:<

<http://www.extension.iastate.edu/foodsafety/pathogens/index.cfm?articleID=45&parent=37> >

[26] *Bacillus cereus* [online]. [cit. 2006-07-18. 10:24 SEČ].

Dostupný z:< <http://textbookofbacteriology.net/b.cereus.html>>

[27] *Bacillus* [online]. [cit. 2006-07-18. 10:37 SEČ].

Dostupný z:< <http://textbookofbacteriology.net/bacillus.html> >

[28] JELÍNEK, Jan., ZICHÁČEK, Vladimír. *Biologie pro gymnázia*. Olomouc, 1998, 551 stran, ISBN 80-7182-050-4

[29] LOESSNER, M. J., MAIER, S. K., SCHIWEK, P., SCHERER, S. *Long-chain Polyphosphates Inhibit Growth of Clostridium tyrobutyricum in processed Cheese Spreads*. Journal of Food Protection, Vol. 60, No. 5, 1997, str. 493 – 498

[30] MAURER-ROTHMANN, Andrea. *Wirkungsmechanismus von JOHA HBS*. Seminar Sonthofen 1999

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus.</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Saphylococcus aureus</i>
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
EPEC	Enteropatogenní
ETEC	Enterotoxigenní
EIEC	Enteroinvazivní
EHEC	Enterohemoragické
TL	Termolabilní enterotoxin
TS	Termostabilní enterotoxin
EH	Oxidoredukční potenciál

SEZNAM OBRÁZKŮ

OBR. 1 TVARY BUNĚK BAKTERIÍ [1].....	19
OBR. 2 <i>ESCHERICHIA COLI</i> [8].....	20
OBR. 3 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> [12]	23
OBR. 4 GRAMOVO BARVENÍ – <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> [12].....	24
OBR. 5 <i>MICROCOCCUS LUTEUS</i> [18].....	26
OBR. 6 <i>BACILLUS CEREUS</i> [26].....	27
OBR. 7 <i>BACILLUS SUBTILIS</i> [23]	28
OBR. 8 VEDENÍ OČKOVACÍCH ČAR [7].....	39
OBR. 9 NÁRŮST PŘI KONCENTRACI 0,1 % – <i>ESCHERICHIA COLI</i> , <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ...	62
OBR. 10 NÁRŮST PŘI KONCENTRACI 0,1 % – <i>BACILLUS SUBTILIS</i> , <i>BACILLUS CEREUS</i>	63
OBR. 11 NÁRŮST PŘI KONCENTRACI 0,4 % – NÁRŮST <i>ESCHERICHIA COLI</i> , <i>S. AUREUS</i>	63
OBR. 12 NÁRŮST PŘI KONCENTRACI 0,4 % – <i>B. SUBTILIS</i> , <i>B. CEREUS</i>	64
OBR. 13 NÁRŮST PŘI KONCENTRACI 0,8 % – <i>ESCHERICHIA COLI</i> , <i>S. AUREUS</i>	64
OBR. 14 NÁRŮST PŘI KONCENTRACI 0,8 % – <i>B. SUBTILIS</i> , <i>B. CEREUS</i>	65
OBR. 15 NÁRŮST PŘI KONCENTRACI 1 % – <i>ESCHERICHIA COLI</i>	65
OBR. 16 NÁRŮST PŘI KONCENTRACI 1 % - BEZ NÁRUSTU <i>B. SUBTILIS</i> , <i>B. CEREUS</i>	66
OBR. 17 <i>ESCHERICHIA COLI</i> – PŘI VŠECH KONCENTRACÍCH.....	66
OBR. 18 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> – PŘI VŠECH KONCENTRACÍCH	67
OBR. 19 <i>MICROCOCCUS LUTEUS</i> – PŘI VŠECH KONCENTRACÍCH.....	67
OBR. 20 <i>BACILLUS SUBTILIS</i> – PŘI VŠECH KONCENTRACÍCH.....	68
OBR. 21 <i>BACILLUS CEREUS</i> - PŘI VŠECH KONCENTRACÍCH.....	68
OBR. 22 KONTROLNÍ PETRIHO MISKA	69

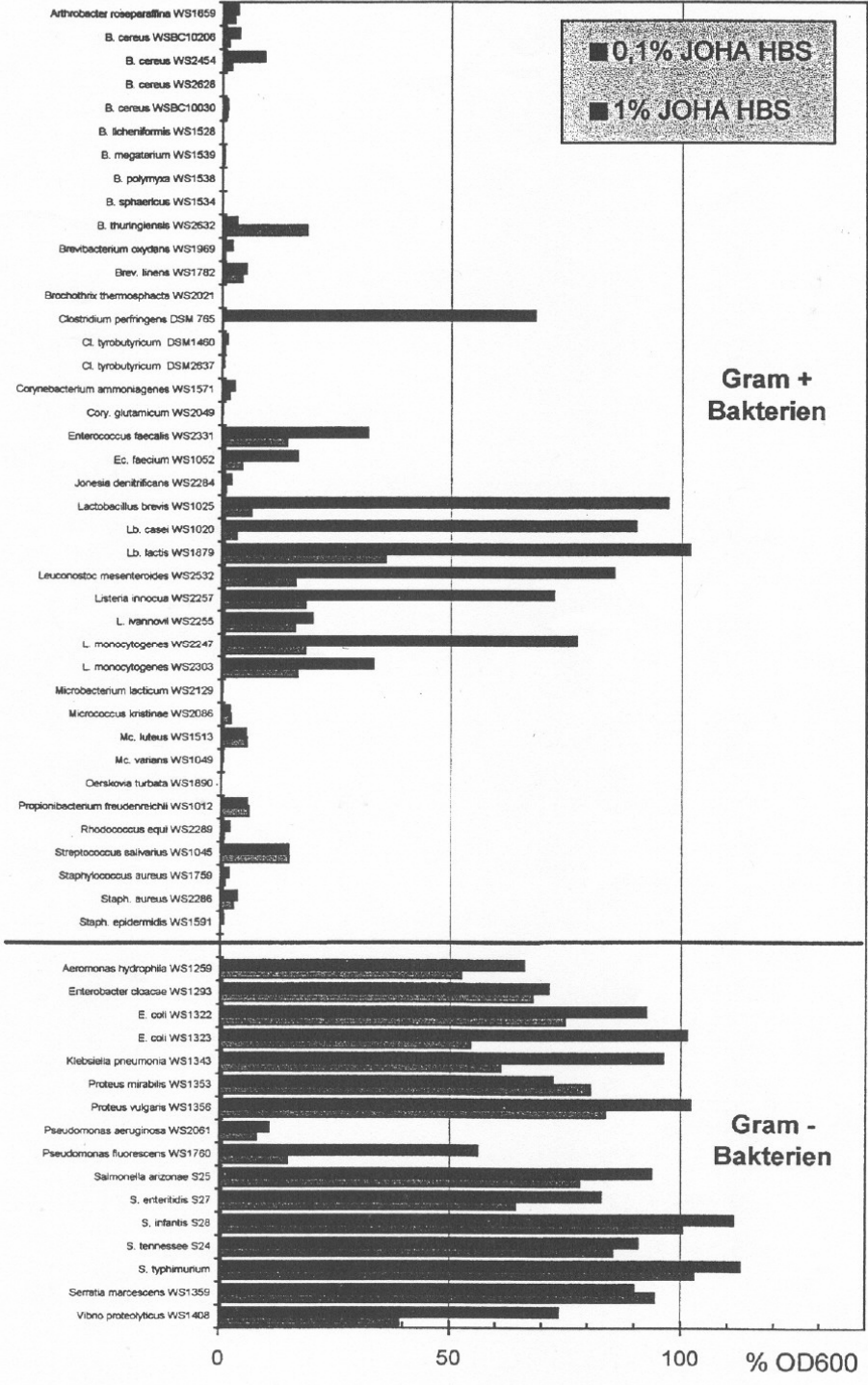
SEZNAM TABULEK

TABULKA 1 VYHODNOCENÍ JOHA HBS A KYSELINY BENZOOVÉ.....	47
TABULKA 2 VYHODNOCENÍ JOHA HBS A KYSELINY BENZOOVÉ - OPAKOVÁNÍ.....	49

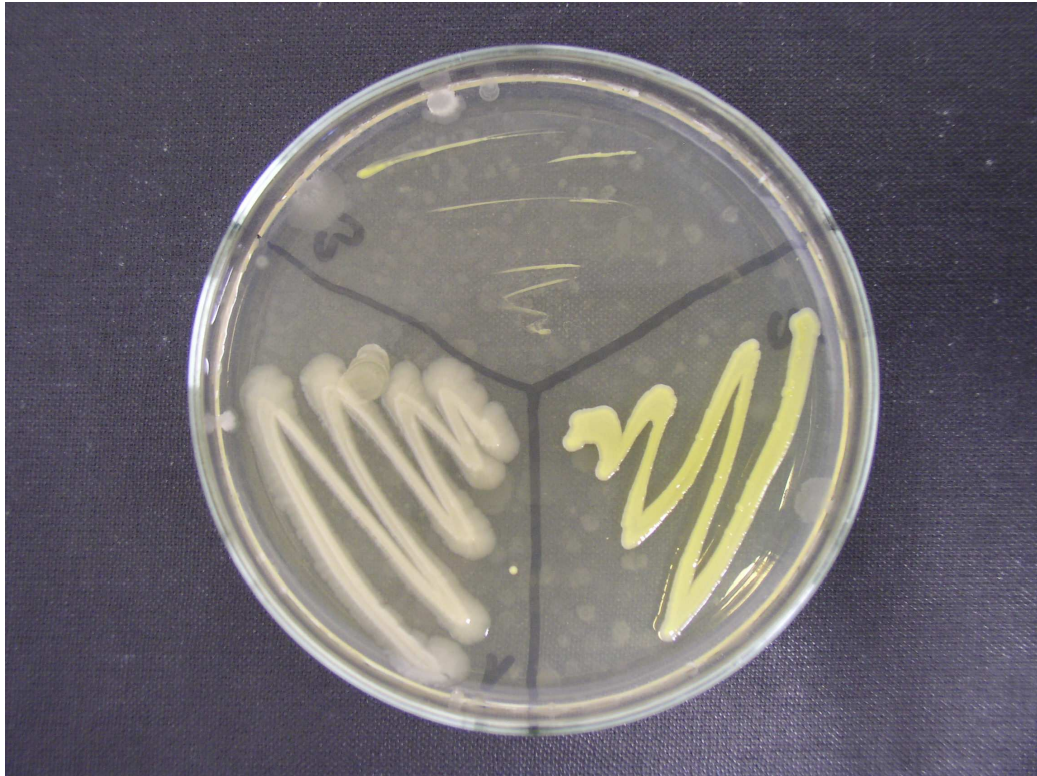
SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA 1 PŮSOBENÍ TAVÍCÍ SOLI JOHA HBS [30]	60
PŘÍLOHA 2 VYHODNOCENÍ KULTIVACE V TEKUTÉ PŮDĚ A NÁSLEDNÁ KULTIVACE NA PEVNÉ PŮDĚ	62

Folie 2



Příloha 2 Vyhodnocení kultivace v tekuté půdě a následná kultivace na pevné půdě



Obr. 9 Nárůst při koncentraci 0,1 %– *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*



Obr. 10 Nárůst při koncentraci 0,1 % – *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*



Obr. 11 Nárůst při koncentraci 0,4 % – nárůst *Escherichia coli*, *S. Aureus*



Obr. 12 Nárůst při koncentraci 0,4 % – *B. subtilis*, *B. cereus*



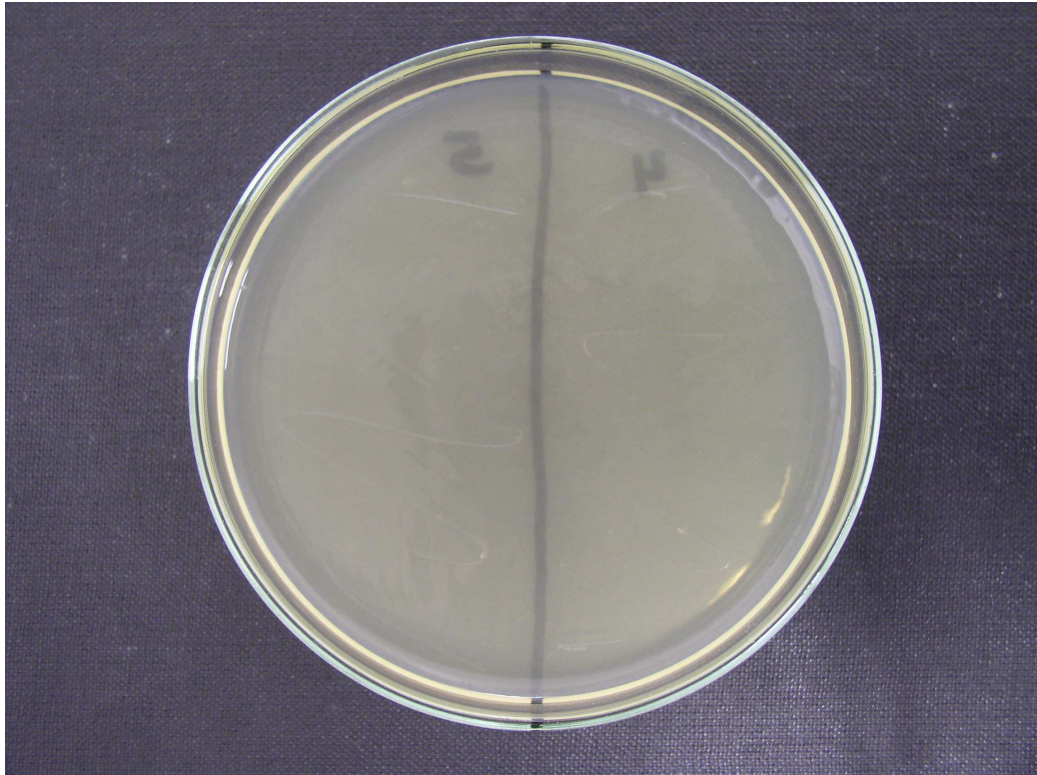
Obr. 13 Nárůst při koncentraci 0,8 % – *Escherichia coli*, *S. aureus*



Obr. 14 Nárůst při koncentraci 0,8 % – *B. subtilis*, *B. cereus*



Obr. 15 Nárůst při koncentraci 1 % – *Escherichia coli*



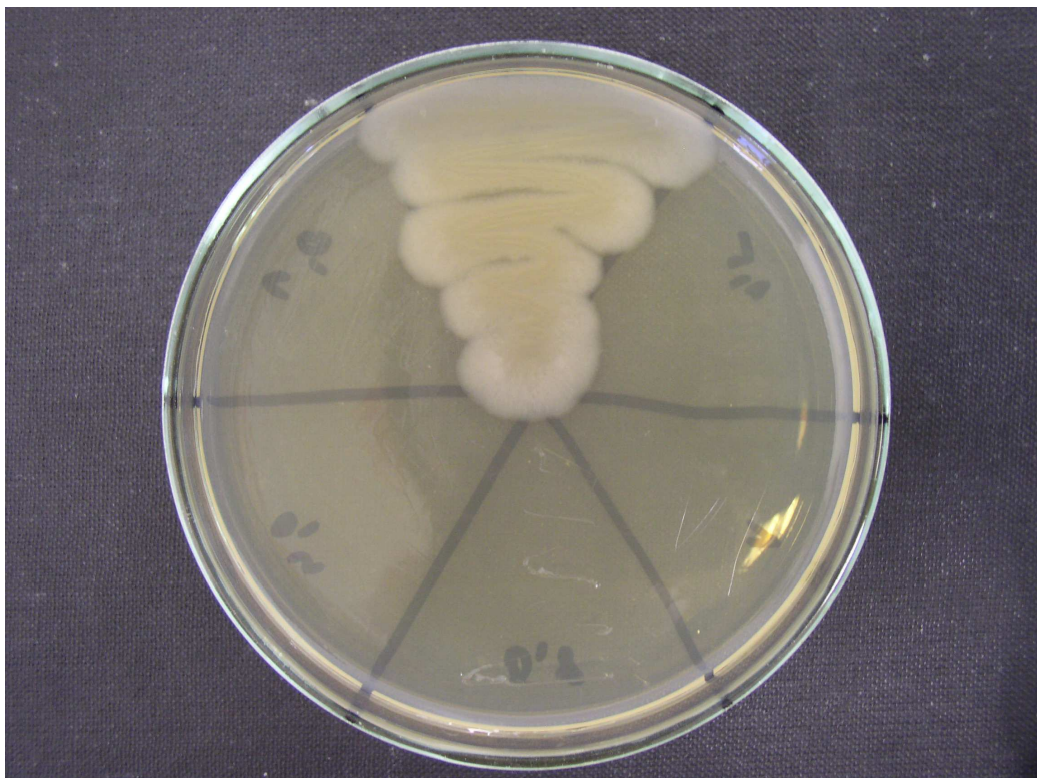
Obr. 16 Nárůst při koncentraci 1 % - bez nárustu *B. subtilis*, *B. cereus*



Obr. 17 *Escherichia coli* – při všech koncentracích



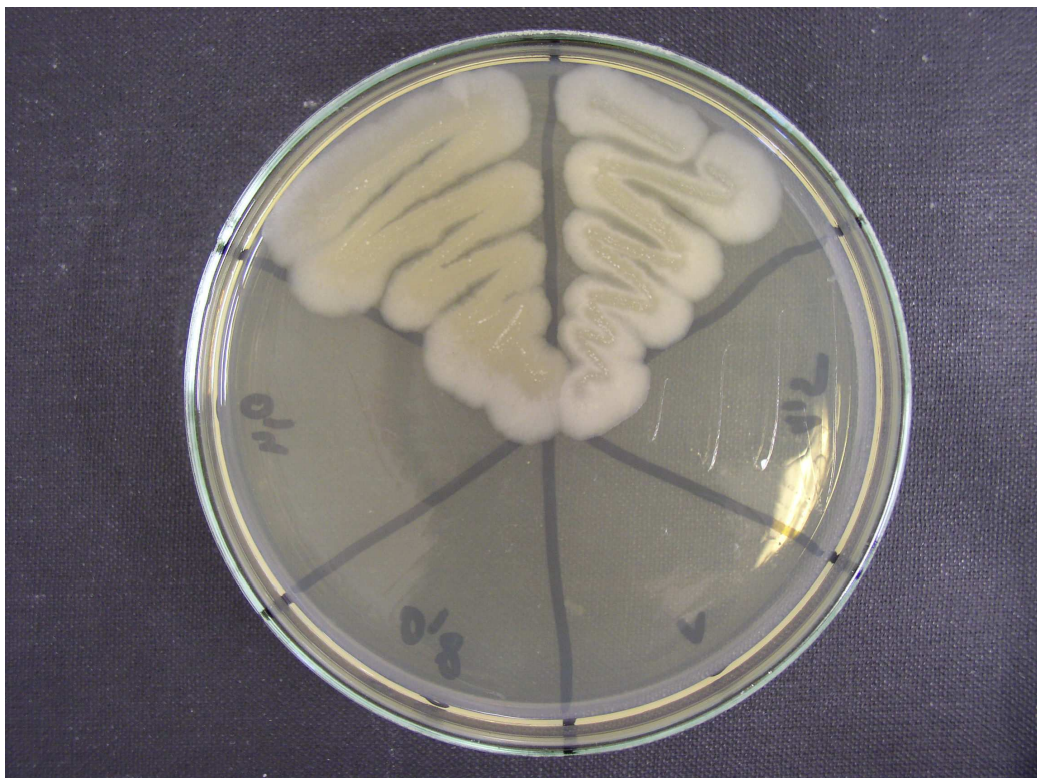
Obr. 18 *Staphylococcus aureus* – při všech koncentracích



Obr. 19 *Micrococcus luteus* – při všech koncentracích



Obr. 20 *Bacillus subtilis* – při všech koncentracích



Obr. 21 *Bacillus cereus* - při všech koncentracích



Obr. 22 Kontrolní Petriho miska