

# **Inhibiční účinky polyfosforečnanů s různě dlouhým řetězcem na vybrané potravinářský významné bakterie**

Bc. Simona Ondruchová

---

Diplomová práce  
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin  
akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Simona Ondruchová**  
Osobní číslo: **T13450**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie potravin**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Inhibiční účinky polyfosforečnanů s různě dlouhým řetězcem na vybrané potravinářsky významné bakterie**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Charakteristika, vlastnosti a význam polyfosforečnanů.
2. Rozdělení a charakteristika významných bakterií vyskytujících se v potravinách.
3. Působení polyfosforečnanových solí na růst mikroorganismů.

### II. Praktická část

1. Stanovení inhibičních účinků komerčně využívaných polyfosforečnanů s různou délkou řetězce a koncentrací na vybrané mikroorganismy
2. Zpracování výsledků.
3. Zhodnocení inhibičního účinku jednotlivých solí na testované mikroorganismy a diskuze výsledků.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] ADAMS, M., MOSS, M., Food microbiology. 3rd ed. Cambridge, UK: RSC Publishing, 2008, 463 p. ISBN 08-540-4284-9.

[2] WILSON, Charles L. Microbial food contamination. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2008, 607 p. ISBN 08-493-9076-1.

[3] FRENZEL, E., LETZEL, T., SCHERER, S., EHLING-SCHULZ, M., Inhibition of Cereulide Toxin Synthesis by Emetic *Bacillus cereus* via Long-Chain Polyphosphates. Applied and Environmental Microbiology. 2011-02-08, vol. 77, issue 4, s. 1475-1482. DOI:

10.1128/AEM.02259-10. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02259-10>

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

Vedoucí diplomové práce:

**doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

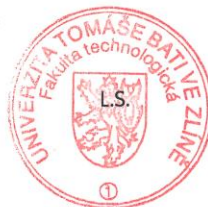
**2. února 2015**

Termín odevzdání diplomové práce:

**22. dubna 2015**

Ve Zlíně dne 2. února 2015

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



  
doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně .....27.4.2015.....

  
.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## ABSTRAKT

Fosforečnany jsou látky, které běžně využívají v potravinářství, za účelem zlepšení výsledné kvality výrobků, úpravy pH a i pro svou antimikrobiální aktivitu. V této diplomové práci byl sledován inhibiční účinek šesti fosforečnanů na vybrané grampozitivní a gramnegativní bakterie. Pro dané účely byly použity fosforečnany (HEXA 62, HEXA 65, HEXA 68, HEXA 70, HEXA PE a  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), které se lišily různou délkou řetězce, a každý z nich byl testován v pěti koncentracích (0,25 %; 0,50 %; 0,75 %; 1,00 % a 2,00 % w/v). Inhibiční působení fosforečnanů bylo hodnoceno pomocí relativní hodnoty růstu. Antimikrobiální aktivita různých fosforečnanů byla porovnávána a bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací solí byl zvyšován inhibiční účinek. Zároveň bylo zjištěno, že gramnegativní bakterie nejsou citlivé na inhibiční působení testovaných fosforečnanů. Nejvíce citlivé na inhibiční působení polyfosforečnanů byly bakterie rodu *Bacillus*, respektive *B. subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062. Výjimku tvořil přídavek sodného fosforečnanu  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , inhibiční účinek hydrogenfosforečnanu sodného byl při srovnání s ostatními fosforečnany zcela minimální.

Klíčová slova: fosforečnany, inhibiční účinek, grampozitivní a gramnegativní bakterie

## ABSTRACT

Phosphates are substances commonly used in food industry for improve the final product quality, pH adjustment even for their antimicrobial activity. In this diploma thesis was observed inhibitory effect of six phosphates on selected Gram-positive and Gram-negative bacteria. For the present purposes are used polyphosphates (HEXA 62, HEXA 65, HEXA 68, HEXA 70, HEXA PE and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), which varied chain lengths, and each phosphate was prepared at five concentrations (0.25 %; 0.50 %, 0.75 %, 1.00 % and 2.00 % w/v). The inhibitory effect of phosphates was evaluated using relative growth rates. Antimicrobial activity of the various phosphates was compared and it was found that with increasing salt concentration was increased inhibitory effect. It was also found that Gram-negative bacteria are not sensitive to the inhibitory effect of phosphates tested. The most sensitive to the inhibitory effect of polyphosphates was *Bacillus* respectively *B. subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062. An exception was the addition of sodium phosphate,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Inhibitory effect of disodium phosphate was compared to other phosphates minimal.

Keywords: phosphates, inhibitory effect, food, Gram-positive and Gram-negative bacteria

Poděkování:

Především bych chtěla poděkovat vedoucí práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi umožnily vypracovat tuto diplomovou práci. Ráda bych také poděkovala mé rodině a všem ostatním, kteří mi jakýmkoli způsobem pomohli při práci.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 FOSFOREČNANY</b> .....	<b>13</b>
1.1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ A VÝROBA FOSFOREČNANŮ.....	14
1.2 VÝSKYT FOSFORU A JEHO FOREM V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	15
1.3 VLASTNOSTI A VYUŽITÍ FOSFOREČNANŮ.....	16
1.3.1 Rozpustnost ve vodě.....	17
1.3.2 Sekvestranty.....	18
1.4 FORMY A UŽITÍ JEDNOTLIVÝCH FOSFOREČNANŮ V POTRAVINÁCH.....	18
1.4.1 Kyselina fosforečná.....	19
1.4.2 Fosforečnan sodný.....	19
1.4.3 Fosforečnan draselný.....	20
1.4.4 Fosforečnan vápenatý.....	21
1.4.5 Trifosforečnan sodný.....	22
1.5 ZDRAVOTNÍ RIZIKA PŘÍJMŮ FOSFOREČNANŮ POTRAVINAMI.....	23
<b>2 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINEK FOSFOREČNANŮ V POTRAVINÁCH</b> .....	<b>24</b>
2.1 ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA FOSFOREČNANŮ.....	24
2.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINEK V MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH.....	25
<b>3 CHARAKTERISTIKA POTRAVINÁŘSKY VÝZNAMNÝCH BAKTERIÍ</b> .....	<b>27</b>
3.1 VÝZNAMNÉ GRAM POZITIVNÍ BAKTERIE V POTRAVINÁCH.....	27
3.1.1 Rod <i>Staphylococcus</i> .....	28
3.1.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	29
3.1.1.2 <i>Staphylococcus xylosus</i> .....	29
3.1.1.3 <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	30
3.1.2 Rod <i>Bacillus</i> .....	30
3.1.2.1 <i>Bacillus cereus</i> .....	31
3.1.2.2 <i>Bacillus subtilis</i> .....	32
3.1.3 Rod <i>Clostridium</i> .....	32
3.1.3.1 <i>Clostridium perfringens</i> .....	33
3.1.4 Rod <i>Lactobacillus</i> .....	33
3.1.4.1 <i>Lactobacillus curvatus</i> .....	34
3.1.4.2 <i>Lactobacillus brevis</i> .....	35
3.1.5 Rod <i>Lactococcus</i> .....	35
3.1.5.1 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> .....	35
3.1.6 Rod <i>Enterococcus</i> .....	36
3.1.6.1 <i>Enterococcus faecium</i> .....	37
3.1.6.2 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	37
3.2 VÝZNAMNÉ GRAM NEGATIVNÍ BAKTERIE V POTRAVINÁCH.....	38
3.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	39
3.2.2 <i>Enterobacter aerogenes</i> .....	39
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>40</b>
<b>4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>41</b>
<b>5 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>42</b>



5.1	PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY.....	42
5.2	KULTIVAČNÍ PŮDY .....	42
5.2.1	Mueller Hinton broth.....	42
5.2.2	Masopeptonový agar (MPA).....	43
5.2.3	Plate Count Agar (PCA).....	43
5.2.4	Reinforced clostridial agar (RCA) .....	43
5.2.5	Brain Heart Infusion Broth (BHI) .....	44
5.2.6	De Man Rogosa Sharpe agar (MRS).....	45
5.2.7	M17 agar .....	45
5.3	ROZTOKY A OSTATNÍ CHEMIKÁLIE .....	46
5.3.1	Fosforečnany .....	46
5.3.2	Fyziologický roztok .....	46
5.4	POUŽITÉ MIKROORGANISMY .....	46
5.4.1	Příprava suspenze bakterií.....	47
5.5	SLEDOVÁNÍ ÚČINKŮ SOLÍ FOSFOREČNANŮ NA VYBRANÉ KMENY BAKTERIÍ .....	48
5.6	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ .....	49
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>50</b>
6.1	INHIBIČNÍ ÚČINEK JEDNOTLIVÝCH FOSFOREČNANŮ .....	50
6.1.1	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010.....	50
6.1.2	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> CCM 4062 .....	52
6.1.3	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Clostridium perfringens</i> CAPM 5744 .....	53
6.1.4	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Clostridium intestinale</i> CAPM 6397 .....	54
6.1.5	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665.....	55
6.1.6	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Enterococcus faecium</i> CCDM 816.....	57
6.1.7	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953 .....	58
6.1.8	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418.....	59
6.1.9	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Staphylococcus xylosus</i> DEPE26.....	60
6.1.10	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Staphylococcus succinus</i> DEPE18.....	61
6.1.11	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Staphylococcus warneri</i> DEPE23 .....	62
6.1.12	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T8.....	63
6.1.13	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T2.....	64
6.1.14	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Lactobacillus curvatus</i> T15 .....	65
6.1.15	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Lactobacillus brevis</i> T24 .....	66
6.1.16	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 670.....	68

6.1.17	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. cremoris CCDM 824 .....	69
6.1.18	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 686.....	70
6.1.19	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 702 .....	71
6.1.20	Vliv hydrogenfosforečnanu sodného na testované grampozitivní bakterie .....	72
6.1.21	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Escherichia coli</i> CCM 3954 .....	77
6.1.22	Vliv fosforečnanových solí na bakterii <i>Enterobacter aerogenes</i> CCM 2531 .....	78
6.2	SOUHRNNÁ DISKUZE .....	80
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>86</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>87</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>94</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>95</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>97</b>

## ÚVOD

Potravinářské suroviny a potraviny jsou ve většině případů materiály, které pozvolna nebo i rychleji podléhají nežádoucím změnám. Vývojem potravinářských technologií je těmto změnám zabránit, docílit jejich údržnosti a uchovatelnosti a také zajistit jejich očekávané vlastnosti – chuť a vůni produktu. Během celého cyklu zpracování surovin a materiálů dochází ke změnám fyziologickým, enzymovým, chemickým a mikrobiologickým. [1]

Mikrobiologické změny jsou z hlediska důsledků (potenciální ohrožení zdraví konzumenta, snížení nutriční a senzorické hodnoty potraviny, znehodnocení potraviny) nejvýznamnějšími změnami, ke kterým v potravinách během zpracování a skladování dochází. [1]

Potravinářské suroviny, polotovary a výrobky obsahují mikroorganismy nebo jejich zárodky, proto součástí každého technologického zpracování je vždy konzervační zákrok, který zastaví nebo zpomalí nežádoucí růst mikroorganismů, případně usmrtí ty formy, které by se za podmínek skladování mohly množit a potravinu kazit. [1]

Tradiční procesy, jako je sušení, fermentace, a chlazení jsou používány k prodloužení trvanlivosti potravinářských výrobků, a jsou často podporovány přidáváním chemických potravinářských konzervantů, jako jsou soli, fosforečnany, dusitany a siřičitany. A právě fosforečnany jsou velmi časté při zpracování potravin. Některé z derivátů kyseliny fosforečné prokázaly variabilní úroveň antimikrobiální aktivity v potravinách. Existuje více než 30 fosforečnanových solí používaných v potravinářských výrobcích a jejich funkce patří pufrovací schopnost a stabilizace pH, acidifikace, alkalizace, odebírání nebo srážení kovů, disperze, peptizace, emulgace a antimikrobiální konzervace. [2]

## I. TEORETICKÁ ČÁST

## 1 FOSFOREČNANY

V potravinářském průmyslu mají fosforečnany velmi důležitou funkci a aplikace široké škály polyfosforečnanových přípravků v různých koncentracích se stala nezbytnou součástí výroby potravin, pro jejich funkční vlastnosti zejména pak v masné a mléčné výrobě. V masném průmyslu se používají ke zvýšení vaznosti vody, zlepšují emulgaci, zpomalují oxidační žluknutí a znehodnocení barvy. Alkalické fosforečnany zvyšují pH masa a také pomáhají při rozrušování svalových proteinů s cílem zvýšit vaznost vody. Kromě zvýšení vaznosti vody fosforečnany zlepšují aroma masných výrobků, prostřednictvím zachování přírodních šťáv a snižují výskyt oxidačního žluknutí. Mnohé studie prokázaly, že inhibiční aktivita fosforečnanů souvisí s chelatací esenciálních kovových iontů. Obecně platí, že gram pozitivní bakterie jsou mnohem citlivější k inhibičnímu působení polyfosforečnanů než gram negativní bakterie. Avšak některé studie prokázaly, že fosforečnan sodný má významný antimikrobiální účinek na gram negativní bakterie, které jsou přirozené kontaminanty v drůbežím mase. [3,4,5]

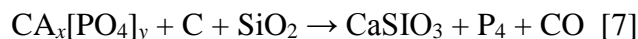
Fosforečnany, které jsou schváleny USDA (United States Department of Agriculture) pro použití v solných roztocích, jsou pyrofosforečnan sodný, fosforečnan monosodný, hexametaposforečnan sodný, hydrogenfosforečnan sodný, tripolyfosforečnan sodný a pyrofosforečnan sodný, jakož i mono- a hydrogenfosforečnan draselný, tripolyfosforečnan draselný a pyrofosforečnan draselný. Tyto fosforečnany mohou být přidávány do láků na šunky, slaninu a do vepřového masa. Při použití kyselých a alkalických fosforečnanů a jejich směsí je omezeno jejich množství na 5,0 % v nálevu a 0,5 % (obvykle se používá 0,3 %), v konečném výrobku. Kromě toho, při použití hydroxidu sodného v kombinaci s dalším fosforečnanem, nesmí být překročen poměr jednoho dílu roztoku hydroxidu sodného na čtyři díly fosforečnanu, tento poměr je schválen pro masnou výrobu USDA, v případech, kde je žádoucí a možná vyšší hodnota pH. [5]

Tripolyfosforečnany a jejich kombinace s hexametaposforečnanem jsou nejvíce využívanou směsí pro masové řezy a plátky, protože poskytují vhodné pH, dobrou rozpustnost, kompatibilitu s vápníkem a vysoký modifikující účinek na proteiny. Při některých výrobcích, je kyselý fosforečnan sodný přidáván do slaniny a šunky v množství 0,05 % kvůli snížení pH a k urychlení vývoje sušení. Nicméně, kyselina fosforečná se obvykle používá v přípravcích jako součást směsí, protože u salámů rychlý pokles pH může způsobit rozpad emulze. [5]

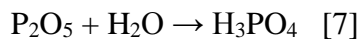
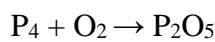
## 1.1 Chemické složení a výroba fosforečnanů

Fosforečnany jsou buď sodné nebo draselné soli fosforečnanových kyselin s lineárním řetězcem a různým stupněm polymerace  $M^{1}_{n+2}P_nO_{3n+1}$  nebo soli cyklických fosforečných kyselin  $(M^1PO_3)_n$ , které jsou vlastně oligomery kyseliny hydrogofosforečné (*meta*-fosforečné)  $HPO_3$ . Nejčastěji se používají fosforečnany sodné a draselné, zejména dihydrogenfosforečnan disodný, difosforečnan tetrasodný, trifosforečnan sodný a tzv. hexametafosforečnan sodný. [6]

Výroba fosforečnanů začíná kyselinou fosforečnou, kde samotná kyselina fosforečná se vyrábí dvěma způsoby. První způsob je působením teploty, kyselina fosforečná se vyrábí spalováním fosforu  $P_4$ , který je sám o sobě připraven tavením rudy (v reakci jako  $CA_x[PO_4]_y$ ) v elektrické peci s použitím koksu jako redukčního činidla a oxidu křemičitého ( $SiO_2$ ), jako tavidla pro snížení teploty tání směsi. [7]



Fosfor se pak spaluje ve speciálně navržených hořácích v nadbytku vzduchu a zaleje se vodou, čímž se získá kyselina fosforečná:



Druhý způsob je čištěním mokrou cestou, tato metoda začíná reakcí přírodního fosforečnanu s kyselinou sírovou a následným čištěním za použití extrakčních rozpouštědel, díky kterým se v podstatě čistá kyselina fosforečná extrahuje do organického rozpouštědla a v následujícím kroku se uvolňuje do vodné fáze. Oba tyto procesy, působením teploty i čištění mokrou cestou vedou k produkci potravinářské kyseliny fosforečné. [7]

K výrobě fosforečnanů z kyseliny fosforečné, je zapotřebí reakce se zásadou. Zásada může být jakákoliv z velkého počtu různých reakčních činidel. Následující seznam podává představu o různých možných zásadách, které mohou při výrobě fosforečnanů použity:  $NaOH$ ,  $Na_2CO_3$ ,  $KOH$ ,  $K_2CO_3$ , chlorid draselný,  $CaO$ ,  $Ca(OH)_2$ ,  $CaCO_3$  a  $NH_3$ . V závislosti na zdroji zásaditých surovin, může dojít k přenosu nečistot a příměsí do fosforečnanů. [7]

Produkt neutralizace kyseliny fosforečné zásadou se pak obvykle suší, čímž se získává ortofosforečnan. I když jsou ortofosforečnany komerčně dostupné, mohou být zároveň použity jako surovina k dalšímu zpracování, a to k tzv. kondenzovaným fosforečnanům. [7]

## 1.2 Výskyt fosforu a jeho forem v potravinářství

Fosfor je obsažen ve většině potravin v množstvích nad 100 mg.kg<sup>-1</sup>. Výjimku představují rafinované tuky a rafinovaný cukr, kde je obsah fosforu jen stopový. Bohatým zdrojem fosforu v dietě jsou ořechy, sýry a ostatní mléčné výrobky. U kravského mléka je poměr Ca / P asi 1,2:1, zatímco u mateřského mléka asi 2:1. Řada potravin rostlinného původu s vysokými koncentracemi fosforu obsahuje značná množství málo využitelné fytové kyseliny a jejich solí fytátů. [6]

Tabulka 1. Obsah fosforu ve významných potravinových surovinách a potravinách [6]

Potravina	Obsah v mg.kg <sup>-1</sup>
Maso kuřecí	1200-2500
Maso vepřové	1300-2200
Maso hovězí	1200-2000
Maso ryb	1900-3900
Mléko plnotučné	870-980
Tvaroh	2000
Sýry	2900-8600
Jogurt	1100-1200
Vejce slepičí	2100-2200
Vaječný bílek	210-330
Vaječný bílek	5000-5900
Hrách	3000-4300
Čočka	2400
Pšenice	3000-4300

Doporučené denní dietární dávky fosforu jsou 300-500 mg pro děti do 1 roku, 800 mg pro děti do 10 let a 1200 mg pro dospělé. Těchto dávek je při běžném složení diety bez problému dosaženo. Důležitější než absolutní množství fosforu ve stravě je zachování vhod-

ného poměru vápníku a fosforu. K tomu je třeba si uvědomit to, že maso, drůbež a ryby (bez kosti) obsahují asi 15 až 20 krát více fosforu než vápníku, vejce, cereálie a luštěniny asi dvakrát až čtyřikrát více. Pouze mléko, sýry, listová zelenina a kosti obsahují více vápníku než fosforu. [6]

Obsah fosforu může být v některých potravinách zvýšen nad přirozenou hladinu používáním potravinářských aditiv na bázi solí polyfosforečnanových kyselin nebo soli kyseliny trihydrogenfosforečné. Seznam povolených fosforečnanů je uveden v tabulce číslo 2. [6]

Tabulka 2. Seznam kyselin a solí používaných v České republice omezeně pro některé druhy potravin [6]

Číslo E	Název
E338	Kyselina fosforečná
E339	Fosforečnany sodné – dihydrogenfosforečnan, hydrogenfosforečnan, fosforečnan sodný
E340	Fosforečnany draselné - dihydrogenfosforečnan, hydrogenfosforečnan, fosforečnan draselný
E341	Fosforečnany vápenaté - dihydrogenfosforečnan, hydrogenfosforečnan, fosforečnan vápenatý
E450	Difosforečnany, dihydrogenfosforečnan disodný, hydrogendifosforečnan trisodný, difosforečnan sodný, difosforečnan draselný
E451	Trifosforečnany – trifosforečnan sodný, trifosforečnan draselný
E452	Polyfosfáty – polyfosfát sodný, polyfosfát draselný, polyfosfát vápenatý

### 1.3 Vlastnosti a využití fosforečnanů

Fosforečnany jsou jednou z nejvíce používaných funkčních složek potravin. V různých variantách fosforečnanových solí jsou aplikovány jako inhibitory ztráty vlhkosti u mraženého a zpracovaného masa, dále jako emulgátor v mléčných výrobcích a pufovací činidla pro různé potravinářské přípravky. Příkladem může být dihydrogenfosforečnan (MCP) a fosforečnan vápenatý působící jako kypřící činidla v pečivu. MCP je také vhodný jako kypřící prášek do těsta a je využíván i k posílení tvorby gelu v pudinkových výrobcích.



Fosforečnan vápenatý je velmi často používán v suchých práškových směsích, k zabránění absorpce vlhkosti a zachovává jejich sypkost. [2,8]

Fosforečnany jsou používány v pasterizovaných sýrových výrobcích, zmrzlině, mražených krémech, ovocných džemech, zavařeninách, zmrazených vejcích, vanilkovém prášku, jakož i v mnoha dalších potravinách. Fosforečnany jsou přidávány do masových výrobků ryb a drůbeže, u kterých přídavek fosforečnanů ovlivňuje hydrataci bílkovin, polysacharidů a jejich koloidní vlastnosti, jeho působením dochází ke zlepšení struktury a také k interakci s dlouhými řetězci polyelektrolytů. Využívají se ke zvýšení vaznosti vody v některých masových výrobcích a zajišťují vhodnou texturu u tavených sýrů. [2,8]

Řada kyselin fosforečných a jejich draselných, sodných a vápenatých solí jsou povoleny používat v potravinách ve formě jednoduchých kyselin fosforečných,  $H_3PO_4$  a komplexních fosforečnanů. Protože však řada z nich způsobuje ztrátu vápníku v potravinách a následně tím způsobuje nedostatek vápníku v kostech, čímž dochází k osteoporóze, je téměř každý druh této kyseliny omezen v používání v potravinářství speciálními limity pro danou kategorii potravin, dále je v některých zemích úplný zákaz používání u ekologických potravin a některých nápojů. Přesto se kyselina fosforečná často používá jako okyselující látka pro nealkoholické nápoje (např. Coca-Colu) a polyfosforečnany jako čířidla piva a vína. U nápojů balených v plechovkách fosforečnany zpomalují korozi obalu. [6]

### 1.3.1 Rozpustnost ve vodě

Rychlost, jakou se fosforečnan rozpouští ve vodě, je důležitá z praktických a obchodních důvodů. Při aplikaci do potravin se obecně vyskytují ve vodných roztocích, zatímco při samotném prodeji jsou ve formě pevných látek. Kontrola rychlosti rozpouštění je užitečná především pro fosforečnany na bázi kyselin, užívaných při chemickém kynutí těsta. Způsob přípravy roztoku fosforečnanů má velký význam při přípravě solných roztoků. Obecně se doporučuje, aby fosforečnan byl první složka, která se rozpouští ve vodě, a následně došlo k přidavku dalších složek. Vzhledem k obtížím se solubilizací, většina výrobců fosforečnanů se zaměřuje na výrobu rychle se rozpouštějících fosforečnanů a jejich směsí pro potravinářské využití. Toho je dosaženo buď zvýšením povrchové aktivity fosforečnanu, nebo tím, že se zvyšuje termodynamická hnací síla rozpouštění, popřípadě obojí. [2]

### 1.3.2 Sekvestranty

Sekvestrace kovových iontů kondenzovanými fosforečnany je důležitou funkcí komplexních fosforečnanů v potravinářských aplikacích. Sekvestrace je odstranění chemických vlivů kovových iontů původně rozpuštěných ve vodném prostředí. Dochází k vytvoření stabilních, ve vodě rozpustných komplexů s ionty kovu, tento komplex zabraňuje účasti iontu v reakcích. Ortofosforečnany snižují účinky tvrdosti iontů ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$ ) vysrážením, což ale není přesná sekvestrace, ta totiž vyžaduje komplexní fosforečnan, který má alespoň dvě oddělená místa upevněná v téže molekule. [2]

Schopnost konkrétního fosforečnanu izolovat určitý iont kovu je závislá na pH, teplotě a dalších vlivech, které jsou přítomny. Citlivost sekvestrace je závislá na pH a klesá s délkou řetězce fosforečnanu. Sekvestrace kationtů v potravinách je pevně spojena s inhibicí některých reakcí zahrnujících kovové ionty, příkladem je katalytická oxidace lipidů či enzymatické hnědnutí. V níže uvedené tabulce 3., je uveden počet gramů kovového iontu, který může být získán pomocí vybraného fosforečnanu použitého v množství 100g. [2]

Tabulka 3. Sekvestrující schopnost vybraných fosforečnanů sodných [2]

Kationty	Fosforečnan (100 g)		
	Tripolyfosforečnan sodný	Pyrofosforečnan sodný	Hexametafosforečnan sodný (Grahamová sůl)
Ca (g)	13,4	4,7	19,5
Mg (g)	6,4	8,3	2,9
Fe (g)	0,2	0,3	0,03

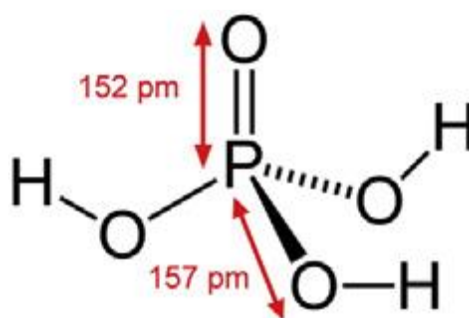
### 1.4 Formy a užití jednotlivých fosforečnanů v potravinách

Potravinářské fosforečnany jsou široce využívány v mnoha potravinách z různých důvodů. Fosforečnany mohou být použity k úpravě pH (buď jako kyseliny nebo zásady), jako pufrы, jsou schopny izolovat minerální látky, popřípadě doplňují minerální látky, mohou působit buď jako podpora nebo inhibitor koagulace, upravují bílkoviny, fungují jako disperzní přísady a také jako inhibitor spékání. [2,13]

Přímým přínosem fosforečnanů je poskytnutí antioxidační aktivity, vliv při zahušťování nebo tvorbu gelu u mléčných výrobků, podporují emulgaci (maso a sýry), ochrana barvy nebo ji upravují, vážou vodu a používají se při chemickém kynutí. Potraviny, ve kterých se používají fosforečnany, jsou nejčastěji maso, drůbež, mořské ryby, mléčné výrobky, pečivo, ovoce, zelenina, cukry, oleje (rafinace), cukrovinky, nápoje, a prostředky pro osobní péči. [2,13]

#### 1.4.1 Kyselina fosforečná

Kyselina fosforečná, jejíž chemický vzorec je  $H_3PO_4$  (Obr. 1), také známá pod označením E338, je látka vyskytující se v přírodě (0,1 - 0,5 %), mléku, masu, drůbeži, rybách a žloutcích. Je široce využívána při výrobě hnojiv, při povrchové úpravě kovů, a jako doplněk stravy. Je dráždivá a korozivní, ale obecně je považována za netoxickou. Kyselina fosforečná je široce využívána v zubním lékařství, jako bělidlo zubů a leptací činidlo k čištění a zdrsnění povrchu zubů. [7]



Obr. 1. Struktura kyseliny fosforečné [7]

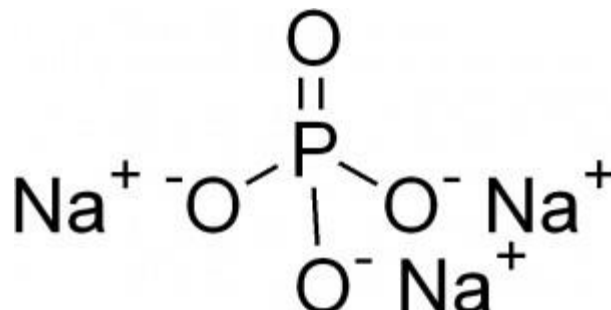
Kyselina fosforečná je získávána v čistém krystalickém stavu a je přidávána do potravin pro posílení antioxidačních účinků sloučenin přítomných v potravine, jako regulátor kyselosti, látka zvýrazňující chuť, čeridlo a také jako konzervační látka. [8]

Typickými výrobky, kam je kyselina fosforečná přidávána, jsou sycené nápoje, zpracované maso, čokolády, tuky a oleje, pivo, džemy a sladkosti. [8]

#### 1.4.2 Fosforečnan sodný

Dihydrogenfosforečnan sodný je sodná sůl kyseliny fosforečné (Obr. 2). Přidává se do potravin, kde působí jako antioxidant, stabilizátor a regulátor. Typickými produkty jsou zpracované masné výrobky a tavené sýry. Také bývá používán u výroby chlebů, rohlíků, hou-

sek, uměle slazeného ovocného želé, konzervovaných brambor, sladké papriky a konzervovaných rajčat. Při používání v potravinách nebyla u dihydrogenfosforečnanu prokázána žádná bezpečnostní a zdravotní rizika, ale vysoký příjem může způsobit narušení rovnováhy mezi vápníkem a fosforem. [8,9]



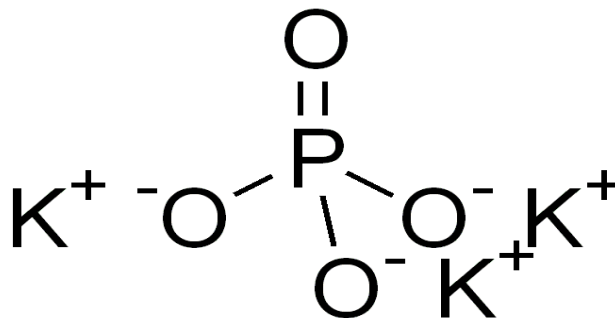
Obr. 2. Struktura fosforečnanu sodného [9]

Hydrogenfosforečnan sodný je využíván jako antioxidant, stabilizátor a pufrovací činidlo v potravinách. Při výrobě taveného sýra je používán jako emulgátor. Hydrogenfosforečnan sodný je přidáván do sušeného mléka, čímž se zabráňuje gelovatění. Typickými výrobky jsou zpracované masné výrobky, tavené sýry a sušené mléko. [8]

I přes aktuální snahu snížit obsah sodíku v potravinách, používání fosforečnanů sodných zůstává časté a neustále se zvyšuje. Při pečení a kynutí těsta se fosforečnany sodné používají pro samotné kynutí, úpravu pH, jako pufrovací činidla, jako růstové faktory pro kvasinky a upravují škrob. V případě přídatku k obilovinám snižují dobu vaření, podporují průtok extrudéry, mění barvu obilovin a také upravují škrob. Fosforečnany sodné se přidávají do masa, drůbeže a mořských plodů, kde ovlivňují především ochranu barvy, snižují ztrátu vody při odkapávání a při rozmrazování, chrání proteiny při mražení a při skladování, inhibují oxidaci lipidů, stabilizují emulze, tvorbu myosinu v solu a gelu při zahřátí a podporují šťavnatost i chuť při vaření, zkracují dobu vaření, podporují mikrobiální inhibici a mnoho dalších. [4]

### 1.4.3 Fosforečnan draselný

Dihydrogenfosforečnan draselný je draselná sůl kyseliny fosforečné (Obr. 3), je využívána v potravinářství jako antioxidant, pufr a emulgátor. Mezi typické produkty s přídatkem dihydrogenfosforečnanu draselného patří omáčky, dezertní směsi a želé produkty. [8]



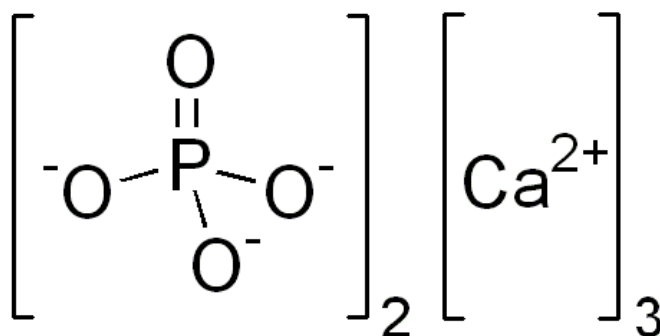
Obr. 3. Struktura fosforečnanu draselného [8]

Hydrogenfosforečnan draselný se používá u potravin, jako jsou vařená a uzená masa, sušené smetany a čokolády. Hydrogenfosforečnan má velmi podobné funkce jako dihydrogenfosforečnan draselný. [8]

Fosforečnany draselné jsou hygroskopické, ale jsou i velmi dobře rozpustné, díky čemuž patří mezi cenově dražší. Přidávají se do masa, drůbeže a mořských plodů. [8]

#### 1.4.4 Fosforečnan vápenatý

Dihydrogenfosforečnan vápenatý je komerčně dostupný v bezvodé formě či ve formě monohydrátu. Obě formy se používají jako kypřicí kyseliny. Typickými výrobky, do nichž je přidáván, je mouka s kypřícím práškem, prášek do pečiva, koláče, pečivo a jiné cukrářské výrobky. Dihydrogenfosforečnan vápenatý, zřídka pak označován jako fosforečnan monovápenatý, je značně využíván v odvětví výroby hnojiv. [8]



Obr. 4. Struktura fosforečnanu vápenatého [10]

Hydrogenfosforečnan vápenatý se používá jako antioxidant v potravinách a zároveň i jako zpevňující činidlo. Je k dispozici ve formě jako bezvodý či dihydrát. Je přidáván do potravin, které jsou uchovávány v konzervách, dále do baleného sušeného ovoce a granulova-

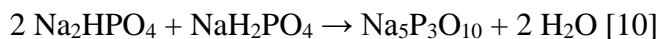
ných potravinářských výrobků. V konzervách zajišťuje přítomnost vápníku a bylo zjištěno že, udržuje pevnost ovoce a zeleniny při konzervaci. [8]

Trifosforečnan vápenatý je přidáván do kuchyňské soli, cukru, prášku do pečiva a hnojiv, u kterých zajišťuje sypkost jednotlivých výrobků. Dále je přidáván do granulovaných potravin, směsí na omáčky, směsí na koláče. [8]

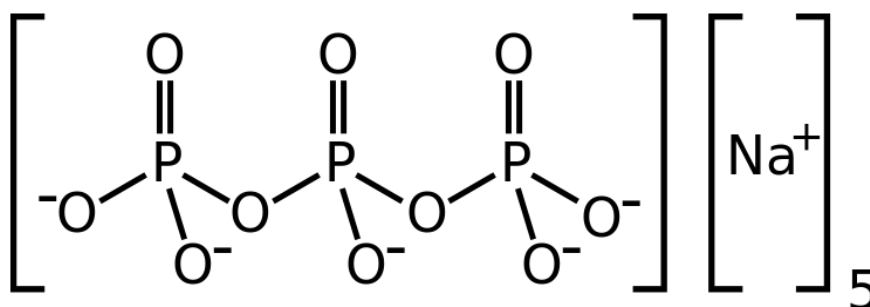
Fosforečnany vápenaté (Obr. 4) a jeho formy se často používají v pekařských aplikacích jako chemická kypřící činidla, jejich použití zahrnuje úpravu pH, pufrovací schopnost, růstové faktory pro kvasinky a modifikaci škrobu. Funkcí těchto fosforečnanů je v chemickém kypření reakce s roztokem hydrogenuhličitanu sodného za vzniku a uvolnění oxidu uhličitého do těsta. Hydrogenuhličitan sodný, nebo obyčejná jedlá soda, je stále nejpoužívanější hydrogenuhličitan, nicméně, rostoucí obavy o zdraví vlivem vyššího množství sodíku ve stravě vede k přechodu na draselné soli nebo hydrogenuhličitan amonný a s důrazem na vápník. [9,10]

#### 1.4.5 Trifosforečnan sodný

Trifosforečnan sodný (Obr. 5) se vyrábí zahříváním stechiometrické směsi hydrogenfosforečnanu sodného  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a fosforečnanu monosodného  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  za řízených podmínek. [10]



Trifosforečnan sodný se používá v potravinářství pro změkčování vody, dále jako emulgační sůl pro výrobu tavených sýrů anebo k přípravě vařených uzenin, surimi a rybích prstů. Trifosforečnan sodný má prokázanou antimikrobiální funkci. [8]



Obr. 5. Chemická rovnice trifosforečnanu sodného [10]

## 1.5 Zdravotní rizika příjmů fosforečnanů potravinami

Příjem fosforečnanů potravinami je důležitou informací a záležitostí, nejen pro osoby s onemocněním ledvin, ale stejně tak i pro širokou veřejnost. Nedávno bylo zjištěno, že fosforečnanová aditiva v potravinách mohou poškodit zdraví osob i s normální funkcí ledvin. Toto rozhodnutí bylo učiněno na základě rozsáhlých studií a je podporován nejnovějšími poznatky základních výzkumů. Výzkumy byly prováděny především u pacientů s onemocněním ledvin, u kterých při vyšším příjmu fosforečnanů docházelo často ke kardiovaskulárním onemocněním a ke zvýšení celkové mortality pacientů. Omezení příjmu fosforečnanů z potravin je standardní doporučení pro pacienty s chronickým selháváním ledvin. Tento přístup je také podporován nálezy pět let trvající studie pacientů podstupujících chronickou hemodialýzu, při které bylo zjištěno, že nízký přísun fosforečnanu v potravě značně přispívá k přežití pacientů. [11,12]

Pacienti, jejichž příjem fosforečnanů v potravě byl nad 99. percentilem, umírali v průměru 2,37 krát více, než ti, jejichž příjem fosforečnanů v potravě byl pod prvním percentilem. Novější studie ukazují, že souvislost mezi vysokými koncentracemi fosforečnanů a vyšší úmrtností není omezena pouze na osoby s onemocněním ledvin, je možné také pozorovat u osob s kardiovaskulárním onemocněním, a dokonce i v běžné populaci. [11,12]

## 2 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINEK FOSFOREČNANŮ V POTRAVINÁCH

V posledních letech jsou fosforečnany přidávané do potravin považovány za účinné antimikrobiální látky. Přestože nové výzkumy pokračují v odhalování příznivých vlastností fosforečnanů, jak bakteriostatických tak i baktericidních, tyto sloučeniny prozatím nebyly klasifikovány ani schváleny jako konzervační prostředky, antimikrobiální látky nebo jakýkoliv rovnocenným pojmem pro tyto vlastnosti. [2,4]

Literaturu o mikrobiologických účincích fosforečnanů užívaných v potravinách, lze rozdělit do dvou skupin:

1. Vliv fosforečnanů na bakterie v laboratorním kultivačním mediu (*in vitro*),
2. Vliv fosforečnanů na mikroorganismy v potravinářství.

Toto rozdělení bylo zavedeno z toho důvodu, protože bylo opakovaně prokázáno, že aktivity různých antimikrobiálních látek v relativně jednoduchém laboratorním kultivačním mediu nemusí nutně odpovídat aktivitě antimikrobiálních látek v komplexních systémech potravin. Přidáním fosforečnanů do potravin může docházet ke snižování pH výrobků, které může být nevhodné pro některé druhy mikroorganismů. [2,4,13]

### 2.1 Antimikrobiální aktivita fosforečnanů

V laboratorních podmínkách je často nemožné oddělit různé faktory, které se mohou projevit při mikrobiální inhibici fosforečnanů. Jedná se zejména o změny pH způsobené samotnými fosforečnany, dále například může hrát důležitou roli vliv fosforečnanů na sloučeniny obsahující nezbytné chelatované kovové ionty, vliv na bakteriální metabolismus a integritu buněk. Odnětí kationtů kovů prostřednictvím chelatace fosforečnanů, může být rozhodujícím faktorem pro aktivitu enzymů, které vyžadují kovové ionty jako kofaktory. [2,13]

V několika studiích bylo prokázáno, že pyrofosforečnan disodný, hexametfosforečnan sodný nebo polyfosforečnany zvyšují účinnost systému dusitan – pH – sůl proti *Clostridium botulinum*. Bylo zjištěno, že ponořením v 10% tetrafosforečnanu sodném došlo k uchování a konzervování třešní proti růstu různých druhů plísní, včetně *Penicillium*, *Rhizopus* a *Botrytis*. Fosforečnany spolu s chloridem sodným ovlivňují aktivitu vody, pH, a obsah kyseliny mléčné, tak aby se zabránilo nežádoucím vlivům *Clostridium botulinum* při pasterizačním procesu výroby sýrů. Kondenzované fosforečnany mají konzervační vliv na



ryby a inhibiční aktivitu proti *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis* v kultivačních médiích. U fosforečnanových solí bylo také prokázáno, že mají různou antimikrobiální aktivitu proti druhům *Bacillus* působícím nežádoucím účinkem v chlebu a u salmonel v pasterovaných vaječných bílcích. V případě fosforečnanu sodného při použití v množství 8-12 %, bylo zjištěno snížení množství patogenů na drůbežím mase, zejména se jednalo o salmonely. [2,13]

Schopnost chelatace kovových iontů polyfosforečnany, hraje důležitou roli v antimikrobiální aktivitě těchto sloučenin. V přítomnosti hořčíku bylo prokázáno, že dochází k inhibici gram pozitivních bakterií. U některých dalších fosforečnanů obsahujících vápník a železo, taktéž docházelo k inhibici gram pozitivních bakterií. [2,4]

Chelatační schopnosti fosforečnanů jsou odpovědné za inhibici růstu *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus* a *Aspergillus flavus*. Fosforečnany inhibují gram pozitivní bakterie a plísně odstraněním základních kationtů z vazebných míst v buněčné stěně těchto mikroorganismů. Dále se předpokládá, že fosforečnany mohou interferovat s funkcí RNA nebo metabolickou aktivitou buněk. [2,4]

## 2.2 Antimikrobiální účinek v mléčných výrobcích

Trvanlivost čerstvého, chlazeného a pasterizovaného mléka je omezeno případným růstem psychrotrofních mikroorganismů, zejména pak rodem *Pseudomonas*, z nichž většina produkuje proteinázy, které způsobují vznik nežádoucích pachů v mléce ještě předtím, než se dosáhne vyššího množství bakterií, které následně způsobují kažení mléka. Inhibice tvorby extracelulární proteinázy *P. fluorescens* v chlazeném mléku je díky působení ortofosforečnanů a fosforečnanů s delším řetězcem. [3,4,13]

Podobná inhibice produkce proteináz startérovými mléčnými kulturami je dosažena díky kultivaci ve vysoko-fosforečnanových médiích (fágových inhibičních médiích) nebo v mléce, které obsahuje 1 nebo 2 % fosforečnanů, a kde by produkce proteináz mohlo být považována za škodlivou pro správný vývoj chuti v sýrech. [3,4,13]

Starterové kultury jsou nezbytné v mlékárenském průmyslu pro výrobu fermentovaných výrobků a sýrů. Důležitým faktorem pro přípravu a údržbu mléčných starterových kultur je inhibice fágů. Tyto viry jsou schopné infikovat bakteriální kultury a vyvolat lyzi bakteriálních buněk, čímž se snižuje aktivita kultur do takové míry, že může dojít k celkovému selhání šarže. I když je známo velmi málo o účincích fosforečnanů na viry v potravinách,

používají se ke zvýšení odolnosti proti fágové infekci mléčných starterových kultur a pro inhibici nebo zachycení fága v mléku a k vývinu komerčních fágových inhibičních médií.  
[4,13]

Fosforečnany jsou také používány k zachování bakteriálních kultur používaných v mlékařenském průmyslu. Přidání fosforečnanů a sorbitolu do kultivačního média vede ke zvýšení přežívání *Bifidobacterium* používaných při výrobě fermentovaných mléčných výrobků.  
[13]

### 3 CHARAKTERISTIKA POTRAVINÁŘSKY VÝZNAMNÝCH BAKTERIÍ

Potraviny jsou jen ve výjimečných případech sterilní, ve většině případů obsahují skupiny mikroorganismů, jejichž složení závisí na tom, jaký měly přístup k potravíně, jakým způsobem rostou, přežívají a ovlivňují potravinu v průběhu času. Mikroorganismy mohou pocházet z přírodní mikroflóry, která se vyskytuje na surovinách a byla získána během sklizně či porážky, dále během zpracování, skladování a distribuce. [14]

Ve většině případů tato mikroflóra nemá významnější vliv na potravinu a jídlo lze konzumovat bez následků. V některých případech se však může projevit působení mikroorganismů několika způsoby:

- mohou způsobit kažení potravin,
- mohou způsobit onemocnění konzumentů,
- mohou se projevovat prospěšným způsobem – fermentací. [14]

Bakteriální znehodnocení začíná, když jsou vegetativní buňky schopny růst díky vhodnému prostředí s dostatkem živin. Bakterie následně způsobují kažení za mnoha podmínek, hlavními limitujícími faktory pro bakteriální růst je množství obsažené vody a pH potravin. [15]

Mikrobiální kažení je detekovatelné v mnoha formách, projevuje se např. tvorbou plynu způsobující bombáže, či tvorbou slizu v důsledku produkce extracelulárních polymerů nebo degradací potravinových matric. Může rovněž docházet k viditelnému nárůstu kolonií a dále i k tvorbě pachutí vznikajících při mikrobiálním metabolismu. Mikroorganismy mohou produkovat enzymy, které mohou zůstat aktivní i po inaktivaci mikroorganismů a mohou způsobit další znehodnocení potravin během skladování. [16]

V následujících částech této kapitoly budou popsány bakterie, které byly v praktické části práce testovány na účinky fosofrečnanů.

#### 3.1 Významné gram pozitivní bakterie v potravinách

Gram pozitivní bakterie v potravinách lze rozdělit do několika kategorií, podle vztahu ke kyslíku na kmeny aerobní, anaerobní či fakultativně anaerobní, dále podle tvaru na tyčinky či koky, a popřípadě tvorbou spor. [15]

Mezi aerobní či fakultativně anaerobní koky jsou řazeny rody *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a *Leuconostoc*.

Rod *Micrococcus* může znehodnocovat solené potraviny, pasterizované mléko i chlazené potraviny, rod *Staphylococcus* a především druh *Staphylococcus aureus* může způsobovat širokou škálu infekcí a intoxikací, včetně otrav jídlem. Dále rod *Streptococcus*, z něhož byl vyčleněn rod *Lactococcus*, včetně *Lactococcus lactis* používaný při výrobě mléčných výrobků, fermentující sacharidy na kyselinu mléčnou, *Enterococcus faecalis* nacházející se v zažívacím traktu zvířat, bývá spojován se znehodnocením syrového masa, čerstvých a pasterizovaných mlékárenských výrobků. Rod *Leuconostoc*, který se vyskytuje v kvašené zelenině, pak také v mléce a mléčných výrobcích. [15]

Anaerobní koky zahrnují rod *Sarcina* rostoucí ve shlucích, který je častým kontaminantem půd a obilí. [15]

Mezi anaerobní a fakultativně anaerobní tyčinky patří rod *Lactobacillus*. Tento rod se často vyskytuje v mléčných výrobcích, odpadních vodách, dále pak na obilí, v masných výrobcích, v pivě, víně, ovoci i v nakládané zelenině. [15]

Mezi grampozitivní tyčinky, tvořící spory, patří aerobní rod *Bacillus*, který se často vyskytuje v prachu a zemině. Většina kmenů *Bacillus* je biochemicky aktivní, mají sacharolytické, proteolytické a lipolytické vlastnosti. Aerobní či mikroaerofilní *Bacillus* znehodnocuje materiál a konzervované potraviny. Mezi grampozitivní tyčinky patří i anaerobní rod *Clostridium*, který se vyskytuje v půdě, organickém materiálu, ve střevech zvířat a výkalech. Má sacharolytickou aktivitu a způsobuje hniloby. Rod *Clostridium* způsobuje kažení potravin skladovaných při vyšších teplotách. Velmi významný je kmen *Clostridium botulinum*, způsobující vady při výrobě konzerv. Některé kmeny působí proteolyticky a hnilobně, příkladem může být *Clostridium histolyticum* či *Clostridium sporogenes*, další kmeny jako *Clostridium butyricum* či *Clostridium perfringens* pak působí sacharolyticky. [15]

### 3.1.1 Rod *Staphylococcus*

*Staphylococcus* je kataláza-pozitivní, oxidáza-negativní rod, skládající se až ze čtyřiceti druhů, kdy pouze některé z těchto druhů způsobují onemocnění, především pak *Staphylococcus aureus*. Většina druhů rodu *Staphylococcus* jsou nepatogenní a obvykle se nacházejí na kůži a sliznici člověka a dalších organismů, popřípadě jako malá součást půdní mikroflóry. [17,14]

Pod mikroskopem se stafylokokové bakterie zobrazují jako koky o přibližném průměru 1  $\mu\text{m}$  a nejčastěji ve formě hroznových uskupení. [17,14]

Kromě *Staphylococcus aureus*, jsou dalšími častými původci onemocnění u lidí *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* a *S. saprophyticus*. Dalšími příležitostnými patogeny jsou *S. hominis*, *S. warneri* a *S. xylosus*. [17,14]

Ačkoliv lze stafylokoky nalézt v životním prostředí, bývají nejčastěji izolovány u savců, v nichž mohou být buď jako přechodná či trvalá mikroflóra. Kolonizace stafylokoky nastává velmi brzy po narození a většinou dochází ke kolonizaci více kmeny v průběhu prvního týdne života, zejména pak nosu a krku. [17,14]

### 3.1.1.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* tvoří kulovité až vejčité buňky o průměru kolem 1  $\mu\text{m}$ , které tvoří nepravidelné shluky podobné hroznům, nemá žádné speciální výživové požadavky na prostředí umožňující jeho růst. [14,18]

*Staphylococcus aureus* je typický mezofilní mikroorganismus, rostoucí v teplotním rozsahu mezi 7 až 48  $^{\circ}\text{C}$ , s optimální teplotou růstu kolem 37  $^{\circ}\text{C}$  za vhodných podmínek. Některé kmeny produkují tepelně stabilní enterotoxin, a to při teplotách 35 až 40  $^{\circ}\text{C}$ , který patří mezi silné gastrointestinální toxiny způsobující často závažná onemocnění. [14,18]

Tento druh patří mezi lidské patogeny způsobující široké spektrum infekcí a je čtvrtým nejčastějším bakteriálním původcem otrav z jídla. Nemoci z potravin způsobené tímto mikroorganismem většinou nebývají extrémně závažné a pouze výjimečně jsou spojeny s úmrtností. [18,19,20]

### 3.1.1.2 *Staphylococcus xylosus*

*S. xylosus* je součástí kožní mikroflóry savců, často bývá izolován z mléka, masa a jiných potravinářských výrobků jako jsou sýry a klobásy. Je převažujícím stafylokokem nacházejícím se u fermentovaných výrobků, zejména suchých klobás vyráběných bez použití startérů a to i v prostředí tradičních výrobních dílen. [21,22]

Tento druh je používán jako startérová kultura v kombinaci s bakteriemi mléčného kvašení pro výrobu sýrů a především fermentovaných salámů, ve kterých ovlivňuje jejich chuť. V klobásách prostřednictvím činnosti nitrát-reduktázy rozvíjí tvorbu barvy, dále přispívá k rozvoji aroma a zabraňuje žluknutí díky antioxidačním enzymům. [21,22]

Některé kmeny *S. xylosus*, produkují inhibiční látky v laboratorních mediích, které brání rozvoji *Listeria monocytogenes*.

*S. xylosus* bývá často izolován z půd a povrchů v potravinářských provozech. Jeho přítomnost je spojena se schopností tvořit biofilm, kdy kolonizuje jak biotické, tak i abiotické povrchy. [21]

### 3.1.1.3 *Staphylococcus epidermidis*

*Staphylococcus epidermidis* je převládajícím mikroorganismem u lidí, jeho výskyt u člověka je při srovnání s jinými stafylokoky 60 až 90 %. Je považován za typického komenzála kůže, bývá izolován ze široké škály anatomických míst, včetně sliznic, vlhkých míst, jako jsou třísla či podpaží, či suchých míst na povrchu kůže, kde jsou bakteriální počty mnohem nižší (10 až  $10^3$  CFU/cm<sup>2</sup>). Výskyt *S. epidermidis* byl zjištěn i ve slinách dospělých lidí. [19]

*S. epidermidis* je častým patogenem intravaskulárních infekcí, je původcem nozokomiální bakteriémie, endokarditid, infekcí močových cest, chirurgických ran, očí či protetických kloubů. [19]

U *S. epidermidis* byla zjištěna schopnost tvorby biofilmu, což je nejdůležitějším faktorem virulence. Tvorba biofilmu umožňuje kolonizaci protetického materiálu, odolnost proti antibiotikům a účinkům imunitního systému. [19]

Další potenciální virulentním faktorem je produkce extracelulárních enzymů a toxinů, jako je metaloproteáza s aktivitou elastázy, cysteinové proteázy a serinové proteázy a lipázy. [19]

### 3.1.2 Rod *Bacillus*

Do rodu *Bacillus* patří sporulující tyčinky, i když příležitostně se zobrazují jako gram negativní nebo s proměnou reakcí. Taxonomie rodu *Bacillus* je v posledních letech předmětem rozsáhlé revize. [14]

Mezi zástupci tohoto rodu můžeme nalézt kmeny, které mají probiotické účinky, ale také kmeny značně virulentní. Nejvíce infekční a potenciálně smrtelná nemoc je antrax, způsobená druhem *Bacillus anthracis*. Nicméně, mnoho jiných druhů v rámci tohoto rodu se ukázalo jako lidské patogeny spojené s nemocemi z potravin, způsobující vážně či dokonce smrtelné infekce. Mezi ně patří *B. cereus*, *B. weihenstephanensis*, *B. pumilus*, *B. mojavensis*.

*sis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, a *B. circulans*. *Bacillus* je všudypřítomný organismus, nejčastěji se vyskytující jako saprofyt v půdě a vodě. [14,23]

*Bacillus anthracis* je nejzávažnější lidský patogen tohoto rodu a je původcem onemocnění antraxu. Tato bakterie tvoří spory o velikosti 1 až 2  $\mu\text{m}$ , které jsou schopny odolávat několika druhům namáhání, příkladem může být ultrafialové či ionizující záření, vyšší teplota, oxidační účinky i různé chemikálie. Obvykle jsou zvířata infikována po požití spor na pastvinách s kontaminovanou půdou nebo krmivy, popřípadě i přes kůži po napadení hmyzem. K přenosu spor na člověka dochází třemi možnými vstupy: [23]

1. přes kůži - přímým stykem s nakaženými zvířaty nebo manipulací s kontaminovanými produkty živočišného původu,
2. přes dýchací cesty - inhalací dostatečného množství spor,
3. přes dutinu ústní - požitím kontaminovaného nedostatečně tepelně opracovaného masa.

Všechny tyto tři formy antraxu mohou být fatální, pokud nejsou okamžitě léčeny, v případě kožní formy v mnoha případech odeznívá po určité době i sama. [23]

*B. cereus* je nejznámější alimentární patogen rodu *Bacillus*, který je spojován s otravou konzumentů po požití potravin a dalších druhů klinických infekcí. [23]

*B. thuringiensis* je patogen hmyzu, má velmi užitečný dopad na lidskou činnost a proto je široce používán v oblasti zemědělství při likvidaci hmyzu a škůdců. [23]

*B. weihenstephanensis* je psychrotolerantní schopný růst při teplotách kolem 4 až 6  $^{\circ}\text{C}$  a podílí se na kontaminaci potravin. [23]

Některé kmeny rodu *Bacillus* jsou zapojeny do fermentačních procesů při výrobě potravin. Tyto kmeny jsou schopny produkovat proteázy s vysokým potenciálem, a jejich hlavní činností při fermentaci je enzymatická proteolýza. Proteázy způsobují odbourávání bílkovin na menší jednotky, čímž tedy tyto kmeny zajišťují produkty s vysokou dostupností živin. [24]

### 3.1.2.1 *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* je typický velkými vegetativními buňkami o rozměrech od 1,0 po 3,0-5,0  $\mu\text{m}$  vyskytujících se v řetízcích. Roste v teplotním rozmezí 8 až 55  $^{\circ}\text{C}$ , optimálně mezi 28 až 35  $^{\circ}\text{C}$ . Podobně jako ostatní příslušníci rodu *Bacillus*, tvoří endospory. Běžně

se vyskytují v půdě a bývá izolován z vody i vegetace. Přechnodně se může vyskytovat ve střevní mikroflóře lidí. [14]

Příznaky požití *Bacillus cereus* v potravinách se projevují průjmovým onemocněním, nástup onemocnění bývá přibližně 8 až 16 hodin po konzumaci potravin, symptomy přetrvávají 12 až 14 hodin a jsou charakterizovány bolestí břicha, nevolnost a zvracení jsou v tomto případě méně časté. Onemocnění může být způsobeno hemolytickým enterotoxinem HBL, skládajícím se ze tří proteinů B, L1 a L2 a nehemolytickým enterotoxinem NHE. Některé kmeny *Bacillus cereus* produkují buď pouze jeden enterotoxin nebo oba současně. Toxin se váže na epitelové buňky a narušuje membránu epitelu. Toxiny *Bacillus cereus* mohou být produkovány již v potravinách, ale díky poměrně dlouhé inkubační době spojené s nemocí, dochází k produkci toxinu až ve střevě konzumenta. [14]

### 3.1.2.2 *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* je mezofilní bakterie, kataláza pozitivní běžně se vyskytující v půdě, tvořící endospory, které jsou velmi odolné i v extrémních podmínkách. Spory *B. subtilis* mohou přežívat působení vysokých teplot během varu. [14,24,25]

Tato bakterie může být kontaminantem potravin, ale jen zřídka způsobuje otravy. *B. subtilis* produkuje proteolytický enzym subtilisin a tato bakterie je příčinou nitkovitosti v kontaminovaném chlebě. [14,24,25]

### 3.1.3 Rod *Clostridium*

Rod *Clostridium* patří mezi převažující mikroorganismy v životním prostředí, gastrointestinálním traktu zvířat i lidí, také se často vyskytuje v potravinářských surovinách. Klostridie produkují velmi odolné spory, které přežívají v nepříznivých podmínkách prostředí i potravinovém řetězci. Mnoho druhů klostridií vytváří toxiny, které způsobují onemocnění lidí a zvířat. [26]

Mezi významná klostridia z hlediska bezpečnosti potravin patří především *Clostridium botulinum*, produkující vysoce účinný neurotoxin, který způsobuje po požití potenciálně smrtelnou paralýzu a *Clostridium perfringens* produkující enterotoxin, způsobující nejčastější onemocnění gastrointestinálního traktu po celém světě. A ačkoliv u *Clostridium difficile* nebyl prokázán přenos potravinami, jeho častá přítomnost u hospodářských zvířat a potravin vnesla otázku, zda by neměl být zařazen mezi patogeny potravin. [26]



### 3.1.3.1 *Clostridium perfringens*

Tento mikroorganismus je spojen se specifickými střevními infekcemi různých živočišných druhů. Podle tvorby různých toxinů se rozeznávají typy *Clostridium perfringens* A až E, zatímco všechny typy jsou zaznamenány jako virulentní, pouze typy A a C jsou spojeny s onemocněním člověka. Typ A může způsobit infekce ran a otravy potravinami, typ C nekrotizující enteritidu. Otravy potravinami jsou způsobeny jen tím kmenem *Cl. perfringens* typu A, který tvoří polypeptidový enterotoxin s molekulovou hmotností 3,5 KDa. Identické exotoxiny produkují i určité kmeny typů C a D. [17,26,27]

Pokud se nachází vegetativní buňky *Cl. perfringens* v potravinách s dostatečným obsahem proteinů, rostou v teplotním intervalu 15 až 50 °C a přičemž optimální teplota se pohybuje kolem 43 až 46 °C. [17,26,27]

Počátečním článkem je lidský, popřípadě zvířecí trakt, *Cl. perfringens* se pravidelně nachází ve fekáliích i zdravých lidí a zvířat, přičemž ve fekáliích zvířat se kmeny tvořící enterotoxin vyskytují ve velkém měřítku, zatímco u člověka v menším množství. U zdravého člověka obsahují fekálie koncentraci  $10^2$  až  $10^4$  KTJ.g<sup>-1</sup>. Přímou či nepřímou kontaminací půdy i vody fekáliemi, se dostává mikroorganismus do potravin, dále může docházet ke kontaminaci během porážky, uzeniny mohou být kontaminovány nedostatečně ošetřenými přírodními střevy. Záhřev potravin není ve většině případů dostačující k devitalizaci spor, teplotní šok dokonce může způsobit urychlení klíčení spor. [17,26,27]

### 3.1.4 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* se podle fermentace hexóz, pentóz a glukonátu dělí na tři skupiny. [17]

První skupinou jsou obligátně homofermentativní laktobacily, které hexózy fermentují skoro výlučně (až 90 %) na kyselinu mléčnou, pentózy a glukonát nefermentují. Do této skupiny patří *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus* a *L. salivarius*. Teploty růstu těchto druhů se pohybují mezi 15 až 45 °C, optimální teplota je kolem 30 až 45 °C. Vyskytují se v mléku a v mléčných výrobcích, v rostlinném materiálu fermentovaném při vyšších teplotách (40 až 53 °C), v ústní dutině i intestinálním traktu lidí i zvířat. Dále pak i v nevařených masných výrobcích, v pekařském kvásku, jablečném moštu i vínu. Některé druhy se používají ve formě čistých zákysových kultur při výrobě jogurtů, acidofilního mléka, tvarohů, sýrů, kvašení octa a při fermentaci zápar. [17,28,30]

Druhou skupinou jsou fakultativně heterofermentativní laktobacily, které hexózy fermentují skoro výlučně (až 90 %) na kyselinu mléčnou, při nedostatku glukózy produkují některé druhy kyselinu octovou, etanol a kyselinu mravenčí, pentózy fermentují pomocí indukované fosfoketolázy. Do této skupiny patří *L. casei* ssp. *casei*, *L. casei* ssp. *pseudoplantarum*, *L. casei* ssp. *rhannosus*, *L. casei* ssp. *tolerans*, *L. plantarum*, *L. alimentarius*. Bakterie této skupiny rostou při 15 °C, výjimečně pak při 45 °C, optimální teplota růstu je při 28 až 32 °C. Vyskytují se v mléku, sýru a masných produktech, pekařském kvásku, kvašeném zelí i jiné zelenině a plodech, ústní dutině, intestinálním traktu. *L. alimentarius* roste i při 10 % NaCl a *L. casei* ssp. *tolerans* přežívá pasterizaci při 72 °C po dobu 40 sekund. Některé druhy této skupiny se používají v mlékárenském a v konzervářenském průmyslu ve formě čistých kultur. [17,28,30]

Druhy třetí skupiny jsou obligátně heterofermentativní, což znamená, že hexózy fermentují heterofermentativně na kyselinu mléčnou a kyselinu octovou, etanol a CO<sub>2</sub>. Pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a kyselinu octovou. Skupina obsahuje plynotvorné laktobacily, a patří zde *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. bifermatas*, *L. reuteri*. Optimální teplota růstu se pohybuje mezi 28 až 32 °C, jsou však schopny růstu i při 15 °C. Vyskytují se v mléku a mléčných výrobcích, masných výrobcích vakuově balených, fermentované zelenině a plodech, pekařském kvásku, kvasnicích, ústní dutině i intestinálním traktu. Účastní se kažení potravin, některé kmeny produkují bakteriociny. [17,28]

#### 3.1.4.1 *Lactobacillus curvatus*

*Lactobacillus curvatus* patří mezi bakterie mléčného kvašení často spojené s masnými výrobky, představuje jednu z hlavních bakterií podílejících se na fermentaci masných výrobků. Dále se vyskytuje u vakuově baleného chlazeného masa, v menší míře pak na mase čerstvém, rybích a drůbežích výrobcích určených k přímé spotřebě. *L. curvatus* se používá jako součást startérových kultur pro fermentaci klobás a konzervačních kultur čerstvého a zpracovaného masa i ryb. [31,33]

Fylogeneticky úzce souvisí s *L. sakei*, *L. fuchuensis* a *L. graminis*, tedy druhy, které jsou také úzce spojeny s masnou výrobou. [31]

Po přidání startérové kultury dochází u fermentovaných masných výrobků k rychlému poklesu pH a rychlému vývoji požadované konzistence. Hlavní úlohou *L. curvatus* je vznik kyseliny mléčné v důsledku spotřeby sacharidů přidávaných na počátku výroby. Snížení pH způsobené vznikem kyseliny mléčné je klíčovým krokem, který má vliv na pevnost,

barvu, vůni a chuť. Aplikace *L. curvatus* ve startérových kulturách je i nástrojem pro zvýšení konkurence schopnosti těchto kultur při výskytu náhodné mikroflóry a zabránění růstu patogenních mikroorganismů. [32]

#### 3.1.4.2 *Lactobacillus brevis*

*L. brevis* patří mezi bakterie mléčného kvašení, hraje hlavní úlohu při kvašení některých potravin, jako je zelí a okurky, a také bývá jednou z nejčastějších příčin kažení piva. [34,35]

*L. brevis* se vyskytuje hlavně v potravinách, především v syrovém mléce, víně, salámech, sýrech, kynutém pečivu, jogurtech, kakau i kávě. Po požití *L. brevis* dochází k interakci se střevní mikroflórou, kdy působí probiotickými účinky a zlepšuje imunitní systém. [34,35,36]

V současné době, probíhají studie a výzkum *L. brevis* a jiných bakterií mléčného kvašení pro přimíchávání do biopaliv a ekologicky šetrným materiálům. [34,36]

#### 3.1.5 Rod *Lactococcus*

Rod *Lactococcus*, dříve serologická skupina N streptokoků, se skládá ze sedmi druhů, *Lactococcus lactis* (včetně poddruhů *cremoris*, *lactis* a *hordniae*), *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. chungangensis* a nedávno charakterizován *L. fujiensis*. [17, 29]

Druhy rodu *Lactococcus* jsou podobně jako druhy rodů *Streptococcus* a *Enterococcus* kataláza negativní, tvoří ovoidní buňky izolované v párech či řetízích. Z potravinářského hlediska jsou v rodu *Lactococcus* významné druhy a poddruhy *L. lactis* subsp. *lactis* a *L. lactis* subsp. *cremoris*. V přírodě jsou velmi rozšířené, konkrétně všude, kde probíhá spontánní kvašení biologického materiálu. V potravinářství, kromě mlékárenského průmyslu se využívají jako čisté mezofilní zákysové kultury při výrobě kyselých mlék, smetan, másla, tvarohů a sýrů. [17,29]

##### 3.1.5.1 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

V mlékárenství je jedním z nejrozšířenějších mikroorganismů, v čerstvém, za hygienických podmínek nadojeném a pouze tekoucí studenou vodou ochlazeném mléce se velmi dobře rozmnožuje a způsobuje kysnutí. *L. lactis* subsp. *lactis* je neodmyslitelnou součástí používaných čistých mlékárenských kultur na výrobu některých kysaných mlék, smetan a na

výrobu všech druhů sýrů jako jediná kultura, popřípadě spolu s jinou specifickou kulturou. [17,29]

Buňky mají vejčitý tvar s průměrem 0,5 až 1  $\mu\text{m}$ , vyskytují se v párech či krátkých řetíz-  
cích. Roste při 10 °C a optimální teplota se pohybuje kolem 30 °C. Od bakterií rodu *Ente-  
rococcus*, které taktéž tvoří kyselinu mléčnou, se odlišuje tím, že neroste v bujonech s  
6,5 % NaCl, ale roste při 4 % NaCl. Fermentuje glukózu, laktózu, a maltózu homofermen-  
tativně na kyselinu mléčnou. [17,29]

### 3.1.6 Rod *Enterococcus*

Význam a úlohy zástupců rodu *Enterococcus* jsou v potravinářské mikrobiologii na první  
pohled protichůdné. Využívají se jejich pozitivní biochemické vlastnosti z původní příbuz-  
nosti k rodu *Streptococcus*. Intenzivně fermentují sacharidy a někdy se zúčastňují při tvor-  
bě aroma a chuti potravin. Připisují se jim i toxinogenní vlastnosti, tvorba biogenních aminů  
(tyraminu, tryptaminu, histaminu a dalších) a využívají se v mikrobiologii pitné vody jako  
indikátor nedávného fekálního znečištění. [17,37]

Tento rod se skládá z více než 40 druhů, ale více než 90 % enterokokových infekcí je způ-  
sobeno dvěma druhy *E. faecalis* a *E. faecium*, jejichž původním stanovištěm je gastrointes-  
tinální trakt lidí i zvířat. Dalšími původci onemocnění mohou být *E. avium* a *E. gallinarum*  
nacházející se ve střevech drůbeže, *E. casseliflavus*, *E. durans* a *E. hirae*. [17,37]

Enterokoky rostou v bujonech při pH 9,6, s obsahem 6,5 % NaCl, při teplotě 10 až 45 °C a  
přežívají i teploty kolem 60 °C po dobu 30 minut. Z potravinářského hlediska je významná  
odolnost vůči zvýšené koncentraci soli v potravinách a skutečnost, že mohou přežívat i  
nižší pasterizační a termizační teploty. Potravinu živočišného i rostlinného původu po mi-  
krobiální fermentaci obsahují často značné množství enterokoků, které se v nich považují  
za zkoušku přírodní mikrobiální čistoty. [17,38]

Původním stanovištěm enterokoků je gastrointestinální trakt lidí i zvířat. Sekundárně se  
nachází v mléku a v mléčných produktech, jako i v potravinách s vyšším obsahem soli (sýr  
a uzeniny). Některé se využívají ve formě bakteriálních kultur při výrobě jakostních siláží  
(*E. faecium*). A v sušeném mléce jsou pro jejich teplotní odolnost indikátorem sanitace.  
[17,38]

### 3.1.6.1 *Enterococcus faecium*

*Enterococcus faecium* je potenciální lidský patogen, který způsobuje nozokomiální bakteriémie, infekce v operačních ranách, endokarditidy a infekce močových cest. Běžným místem výskytu této bakterie je gastrointestinální trakt celé řady živočichů, ale může být též nalezen i v dutině ústní. Přežívá po dlouhou dobu v půdě, odpadech a ve vnitřních prostorech nemocnic na různých plochách a materiálech. Roste při teplotách od 10 do 45°C, v zásaditém i kyselém prostředí, dále pak i v prostředí izotonickém i hypertonickém. [38,39,40]

*E. faecium* může být odolný vůči antibiotikům a vytvářet si vůči nim rezistenci. Některé kmeny se staly rezistentní na vankomycin, penicilin, gentamycin, tetracyklin i erytromycin. K šíření onemocnění nejčastěji dochází mezi pacienty v nemocnicích přenosem patogenu rukama či lékařskými přístroji. [39,40]

### 3.1.6.2 *Enterococcus faecalis*

*Enterococcus faecalis* tvoří vejčité buňky prodloužené ve směru dělení s průměrem 0,5 až 1 µm, uspořádané v párech či krátkých řetízcích, jeho optimální teplota se pohybuje kolem 37 °C. Jedná se o velmi rozmanitý druh enterokoků, který interaguje s dalšími organismy a má vliv na životní prostředí. Vysoce virulentní kmeny *E. faecalis* tvoří toxin cytolysin, který způsobuje lýzu jak bakteriálních, tak i eukaryotických buněk. [37,38,41,42]

*E. faecalis* je považován za nejběžnější druh enterokoků v lidských výkalech, dále je zástupcem komenzální střevní mikroflóry celé řady organismů. Vyskytuje se dále v půdě, na rostlinách i ve vodě. Výskyt ve vodě je nejčastěji způsoben kontaminací výkaly. K přenosu z prostředí dochází nejčastěji hmyzem, který se vyvíjí v tlejících organických materiálech, které byly kontaminovány vodou a následně přenáší tyto bakterie na zařízení a do prostor. Dále je častý jeho výskyt u sýrů vyráběných tradičním řemeslným způsobem. Tento druh je často rezistentní vůči léčbě antibiotikům. [41,42]

Enterokoky jsou studovány pro své možné využití ve formě probiotických látek, tedy látek příznivě ovlivňující složení střevní mikroflóry. Podáváním *E. faecalis* bylo prokázáno snížení průjmu u zvířat, jako probiotika jsou často používány u drůbeže, prasat i dobytku. [41, 42]

### 3.2 Významné gram negativní bakterie v potravinách

Významné gram negativní bakterie v potravinách lze rozdělit na aerobní nesporulující tyčinky a fakultativně anaerobní tyčinky.

Mezi aerobní nesporulující tyčinky patří rody *Pseudomonas*, *Halobacterium*, *Acetobacter*, *Alcaligenes* a *Flavobacterium*. [15,17]

Rod *Pseudomonas* je široce rozšířený biochemicky aktivní rod. Pseudomonády se vyskytují v půdě, vodě a v rozkládajícím se organickém materiálu. Mnohé druhy rodu *Pseudomonas* jsou psychrotrofní, ačkoliv se optimální teplota růstu pohybuje mezi 15 až 40 °C. Způsobují znehodnocení masa ryb, drůbeže a vajec. Rod *Halobacterium* způsobuje kažení potravin s vysokým obsahem soli a rod *Acetobacter* způsobuje oxidaci etanolu na kyselinu octovou, čímž dochází ke kažení nealkoholických nápojů. Rod *Alcaligenes* se vyskytuje v půdě, vodě i prachu. Způsobuje svou přítomností v některých potravinách alkalické reakce a tvorbu slizu. Rod *Flavobacterium* je původcem kažení másla, vajec a mléka. [15,17,47]

Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky zahrnují čeleď *Enterobacteriaceae*, která zahrnuje řadu rodů, z nichž jsou v potravinářství nejvýznamnější rody *Escherichia*, *Erwinia*, *Serratia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus* a *Enterobacter*. [15,17,46,47]

Rod *Escherichia* se přirozeně vyskytuje v trávicím traktu lidí i zvířat, sekundárně se pak vyskytuje v půdě a vodě. Jeho přítomnost v potravinách indikuje fekální znečištění. Rod *Erwinia* je rostlinný patogen způsobující hnilobu. Rod *Serratia* způsobuje barevné změny potravin. *Shigella* je původcem onemocnění bakteriální dyzenterie, což je onemocnění lidí způsobené znečištěnými předměty, potravinami a vodou. Rod *Salmonella* je původcem těžkých tyfových onemocnění, přenášejících se z nemocných lidí a bacilonosičů na zdravé lidi buď přímým kontaktem, nejčastěji však bacilonosiči kontaminovanou pitnou vodou a potravinami. *Proteus* se vyskytuje v půdě, vodě a intestinálním traktu. Způsobuje kažení bílkovinných potravin a jejich hnití. *Enterobacter* se vyskytuje v intestinálním traktu, ale i na rostlinách a sekundárně se vyskytuje i v mléku. Způsobuje kažení potravin a je zařazen mezi koliformní bakterie. [15,17,43,44,47]

### 3.2.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* je mikroorganismus, který fermentuje laktózu za tvorby kyseliny mléčné, kyseliny octové a plynů CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>. Méně často se pak vyskytují kmeny (asi 5 %), které štěpí laktózu pomalu nebo vůbec. [17]

V potravinářství a vodárenství je široce využívána jako indikátorový mikroorganismus sanitace a zachování hygienických a technických požadavků při získávání, opracování, zpracování, skladování, distribuci i při spotřebě. Vyšší obsah v potravinách způsobuje jejich kažení. Při výrobě sýrů způsobuje jejich tzv. včasné duření (fermentace laktózy na CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>). [17,43]

*E. coli* je fakultativní patogen, při oslabení lidského organismu a poklesu jeho přirozené odolnosti, u dětí a starých lidí může nastat onemocnění způsobené invazivními sérovary *E. coli*. Mezi tyto kmeny, či sérovary se řadí skupiny: enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), enteropatogéní (EPEC), enterotoxické (ETEC) a enterohemoragické (EHEC). [17,43,44,46]

### 3.2.2 *Enterobacter aerogenes*

Rod *Enterobacter* patří mezi nozokomiální oportunní patogeny, spolu s *E. coli* je častou příčinou extraintestinálních infekcí. Infekce, které jsou připisovány *E. aerogenes* jsou respirační, gastrointestinální, dále infekce močových cest, i centrálního nervového systému. [45,46]

Většina infekcí je způsobena neúmyslným přenosem bakterií v průběhu chirurgického zákroku nebo při dlouhodobém léčení pacientů v nemocnicích, kteří užívají žilní katetry. [46]

*E. aerogenes* se nachází v půdě, ve vodě, v mléčných výrobcích a střevech lidí i zvířat. [17,47]

## II. PRAKTICKÁ ČÁST



## 4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo sledování inhibičních účinků fosforečnanů na vybrané potravinářsky významné mikroorganismy. Za účelem splnění cílů práce byly fosforečnany, použity v několika koncentracích.

Pro dosažení cílů práce bylo třeba:

- vypracovat literární rešerši charakterizující fosforečnany, jejich význam v potravinářském průmyslu a jejich využití jako antimikrobiálních činidel,
- popsat účinky fosforečnanů a jejich vliv konkrétní kmeny mikroorganismů,
- stručně uvést charakteristiku potravinářsky významných mikroorganismů.
- stanovit inhibiční účinky fosforečnanů v různých koncentracích na vybrané gram pozitivní a gram negativní bakterie,
- na základě teoretické části a výsledků praktické části formulovat závěry o účinku fosforečnanových solí na růst mikroorganismů.

## 5 MATERIÁL A METODY

### 5.1 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)
- Špičky pro automatické pipety
- Vortex Heidolph, Reax top
- Ostatní běžné laboratorní pomůcky a vybavení

### 5.2 Kultivační půdy

#### Příprava dané půdy:

Do 1000 ml destilované vody byla navážena příslušná navážka složek a rozpuštěna. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Poté byla půda rozlita na Petriho misky. Jednotlivé misky byly skladovány v chladničce.

#### 5.2.1 Mueller Hinton broth

Médium použité ke kultivaci kmenů *Bacillus*, *St. aureus* a *E. coli*.

#### Složení:

<u>Látka</u>	<u>Množství (g/l)</u>
Hovězí masová infuse	300,00 g
Kyselý hydrolyzát kaseinu	17,50 g
Škrob	1,50 g
Agar	17,00 g
Destilovaná voda	1000 ml
Konečné pH (při 25°C)	7,3 ± 0,2

### 5.2.2 Masopeptonový agar (MPA)

Neselektivní médium sloužící ke stanovení celkového počtu mikroorganismů.

#### Složení:

<u>Látka</u>	<u>Množství (g/l)</u>
Beef extrakt (HiMedia)	3,0
Pepton (HiMedia)	5,0
NaCl (Lach-Ner)	5,0
Agar	15,0
Destilovaná voda	1000 ml
Konečné pH (při 25 °C)	6,8 ± 0,2

### 5.2.3 Plate Count Agar (PCA)

Neselektivní médium určené ke stanovení celkového počtu mikroorganismů ve stanovených vzorcích.

#### Složení:

<u>Složka</u>	<u>Množství (g/l)</u>
Agar	15 g
Hydrolyzát kaseinu	5,0 g
Kvasničný extrakt	2,5 g
Glukóza bezvodá	1,0 g
Destilovaná voda	1000 ml
Konečné pH (při 25 °C)	7± 0,2

### 5.2.4 Reinforced clostridial agar (RCA)

Médium vhodné ke kultivaci kmenů rodů *Clostridium*.

**Složení:**

<u>Složka</u>	<u>Množství (g/l)</u>
Agar	15 g
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	10 g
Hovězí extrakt	10 g
Kvasničný extrakt	3 g
Dextróza	5 g
Chlorid sodný	5 g
Octan sodný	3 g
Škrob	1 g
L – cystein hydrochlorid	0,5 g
Destilovaná voda	1000 ml

**5.2.5 Brain Heart Infusion Broth (BHI)**

Pro pomnožení a kultivaci patogenních koků a ostatních nutričně náročných mikroorganismů.

**Složení:**

<u>Složka</u>	<u>Množství (g/l)</u>
Telecí mozková infuse	200g
Infuse z hovězího srdce	250g
Proteosový pepton	10g
Chlorid sodný	5g
Hydrogenfosforečnan (di)sodný	2,50g
Dextrosa	2g
Destilovaná voda	1000 ml
Konečné pH (při 25°C)	7,4 ± 0,2

**5.2.6 De Man Rogosa Sharpe agar (MRS)**

Půda vhodná k izolaci, stanovení počtu a kultivaci druhů rodu *Lactobacillus*.

**Složení:**

<u>Složka</u>	<u>Množství (g/l)</u>
Proteosový pepton	10g
Síran manganatý	0,05g
Síran hořečnatý	0,10g
Octan sodný	5,00g
Citran amonný	2,00g
Polysorbát 80	1,00g
Dextrosa	20,00g
Kvasničný extrakt	5,00g
Hovězí extrakt	10,00g
Hydrogenfosforečnan (di)draselný	2,00g
Destilovaná voda	1000 ml
Konečné pH (při 25°C)	6,5 ± 0,2

**5.2.7 M17 agar**

Médium určené ke kultivaci a stanovení mléčných koků, jako jsou streptokoky, laktokoky a leukonostoky.

**Složení:**

<u>Složka</u>	<u>Množství (g/l)</u>
Trypton	5,0 g
Sojový pepton	5,0 g
Masový pepton	5,0 g
Síran hořečnatý	0,25 g
Di-sodium-glycerofosfát	19 g

Složka	Množství (g/l)
Laktóza	5,0 g
Agar	15,0 g
Destilovaná voda	1000 ml

### 5.3 Roztoky a ostatní chemikálie

#### 5.3.1 Fosforečnany

Inhibiční účinky pěti polyfosforečnanových solí s různou délkou řetězce ( $n \approx 5, 9, 13, 20$  a  $28$ ) byly zjišťovány u polyfosforečnanů značených jako HEXA 62, HEXA 65, HEXA PE HEXA 68, HEXA 70, a hydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Byly připraveny jejich 10% roztoky rozpuštěním daného množství v destilované vodě, které byly vysterilizovány filtrací (filtr o porozitě  $0,22 \mu\text{m}$ ) a uchovávány v uzavřených nádobách v chladničce při teplotě  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pro sledování účinku jednotlivých bakteriálních kmenů bylo využito pěti koncentrací každé soli (0,25 %; 0,50 %; 0,75 %; 1,00 % a 2,00 % w/v).

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

#### 5.3.2 Fyziologický roztok

Příprava fyziologického roztoku z důvodu ředění bakteriálních suspenzí.

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

### 5.4 Použité mikroorganismy

Ke sledování inhibičních účinku polyfosforečnanů bylo použito celkem 21 kmenů mikroorganismů, z čehož 19 kmenů byly grampozitivní bakterie a 2 kmeny gramnegativní. Bakterie byly získány ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora<sup>®</sup> Výzkumného ústavu mlékárenského v Praze (Cultures Collection of Dairy Microorganisms; CCDM). Dále z České sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity Brno (Czech Collection of Microorganisms; CCM), ze sbírky zoopatogenních mikroorganismů Výzkumného ústavu veterinárního lékařství Brno (Collection of Animal Pathogenic Microorganisms; CAPM). Kmeny označené písmenem T byly získány z Výzkumného ús-

tavu mlékárenského, pobočky v Táboře a jedná se o izoláty z přírodních sýrů. Kmeny označené DEPE jsou ze sbírky ÚIOŽP a vše jsou izoláty z potravin.

Jmenovitě se jednalo o následující kmeny grampozitivních bakterií:

1. *Bacillus cereus* CCM 2010
2. *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062
3. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953
4. *Staphylococcus xylosus* DEPE26
5. *Staphylococcus succinus* DEPE18
6. *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418
7. *Staphylococcus warneri* DEPE23
8. *Clostridium perfringens* CAPM 5744
9. *Clostridium intestinale* CAPM 6397
10. *Enterococcus faecium* CCDM 816
11. *Enterococcus faecalis* CCM 2665
12. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824
13. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 670
14. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686
15. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 702
16. *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T8
17. *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T2
18. *Lactobacillus brevis* T24
19. *Lactobacillus curvatus* T15

Kmeny gramnegativních bakterií:

1. *Enterobacter aerogenes* CCM 2531
2. *Escherichia coli* CCM 3954

#### 5.4.1 Příprava suspenze bakterií

Suspenze bakterií byla připravena zaočkováním 5 ml kultivačního média (Mueller Hinton Broth, MRS, M17) a 10 ml kultivačního média RCA jednodenním neředěným inokulem o objemu 20 µl. Kultury byly inkubovány v termostatu po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C. Klostridia byla inkubována v anaerobním termostatu po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C.

## 5.5 Sledování účinků solí fosforečnanů na vybrané kmeny bakterií

Ke sledování účinků polyfosforečnanů na růst vybraných mikroorganismů byly použité fosforečnany přidávány přímo do zkumavek s 5 či 10 ml sterilního kultivačního média. Větší objem byl použit pro anaerobní bakterie tak, aby bylo dosaženo tzv. „vysokého sloupce“ a tím i prostředí bez kyslíku. Takto připravená média byla zaočkována 20 µl dané bakteriální suspenze. Každý kmen bakterie byl takto zaočkován paralelně do tří zkumavek při dané koncentraci fosforečnanu. Jako kontrolní vzorky byly zaočkovány zkumavky 20 µl dané bakteriální suspenze bez přídavku fosforečnanů. Takto připravené vzorky byly inkubovány při teplotě  $30 \pm 1$  °C a to po dobu 24 hodin.

Po 24 hodinách bylo z každé zkumavky odpipetováno 100 µl a asepticky hokejkou rozetřeno na Petriho misky s pevnou půdou vhodnou pro danou bakterii. V případě silného nárůstu bakterií bylo provedeno desítkové ředění, kdy z každé zkumavky bylo odebráno 500 µl suspenze a přeneseno do 4,5 ml sterilního fyziologického roztoku. Na Petriho misky byla následně naočkována vždy tři nejvyšší po sobě jdoucí ředění pro danou koncentraci soli. Takto připravené Petriho misky byly kultivovány 24 hodin při teplotě  $30 \pm 1$  °C.

Z každé Petriho misky byl odečten počet kolonií a přepočten na KTJ/ml.

Pokud byly pro výpočet použity dvě (případně více) Petriho misky stejného ředění, výsledný počet

mikroorganismů byl vypočítán podle vztahu:

$$N = \frac{\Sigma c/n}{d \cdot V}$$

Kde:

N – počet mikroorganismů [KTJ/ml]

$\Sigma c$  – počet všech kolonie tvořících jednotek (příslušné skupiny mikroorganismů) na plotnách použitých pro výpočet

n – počet ploten použitých pro výpočet

d – příslušní použité ředění

V – objem inokula očkovaného na plotnu [ml]

Jestliže byly pro výpočet použity dvě misky po sobě jdoucího ředění, výsledný počet mikroorganismů byl vypočítán podle vzorce:



$$N = \frac{\Sigma c}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

Kde:

N – počet mikroorganismů [KTJ/ml]

$\Sigma c$  – počet všech kolonie tvořících jednotek (příslušné skupiny mikroorganismů) na plotnách použitých pro výpočet

$n_1$  – počet ploten prvního ředění použitého pro výpočet

$n_2$  – počet ploten druhého ředění použitého pro výpočet

d – ředící faktor odpovídající prvnímu pro výpočet použitému ředění

V – objem inokula očkovaného na plotnu [ml]

Inhibiční účinky fosforečnanových solí byly hodnoceny prostřednictvím indexu růstu (relativní hodnoty růstu). Pro výpočet relativní hodnoty růstu byl použit vzorec:

$$N = \frac{\text{počet bakterií při dané koncentraci soli}}{\text{počet bakterií v kontrolním vzorku}} \cdot 100$$

N – počet mikroorganismů [%]

## 5.6 Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky analýzy inhibičního působení jednotlivých fosforečnanových solí v daných koncentracích na testované bakterie byly statisticky vyhodnoceny pomocí neparametrických testů, konkrétně Kruskal-Wallisova testu a Wilcoxonova testu na hladině významnosti 5 % ( $P < 0,05$ ). K statistickému vyhodnocení výsledků byl použit software UNISTAT<sup>®</sup>, verze 6.5.04 (Unistat, Ltd., Londýn, Velká Británie).

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Inhibiční účinek jednotlivých fosforečnanů

Vliv inhibičního účinku polyfosforečnanových solí s různou střední hodnotou délky řetězce (Hexa 62  $\approx$  5, Hexa 65  $\approx$  9, Hexa PE  $\approx$  13, Hexa 68  $\approx$  20, Hexa 70  $\approx$  28, a hydrogenfosforečnan sodný) při použití 5 koncentrací (0,25 %; 0,50 %; 0,75 %; 1,00 % a 2,00 % w/v) byl zjišťován u 19 grampozitivních bakterií (*Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953, *Staphylococcus xylosum* DEPE26, *Staphylococcus succinus* DEPE18, *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418, *Staphylococcus warneri* DEPE23, *Clostridium perfringens* CAPM 5744, *Clostridium intestinale* CAPM 6397, *Enterococcus faecium* CCDM 816, *Enterococcus faecalis* CCM 2665, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 670, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 702, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T8, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T2, *Lactobacillus brevis* T24, *Lactobacillus curvatus* T15) a dvou gramnegativních bakterií (*Enterobacter aerogenes* CCM 2531, *Escherichia coli* CCM 3954).

Z naměřených hodnot počtu bakteriálních kolonií a vypočtených relativních hodnot růstu byly sestaveny grafy pro jednotlivé bakterie s účinkem testovaného fosforečnanu při dané koncentraci.

Z důvodu slabých inhibičních účinků hydrogenfosforečnanu sodného není v jednotlivých grafech uveden. Účinek hydrogenfosforečnanu sodného u jednotlivých bakterií je proto uveden v samostatném souhrnném grafu.

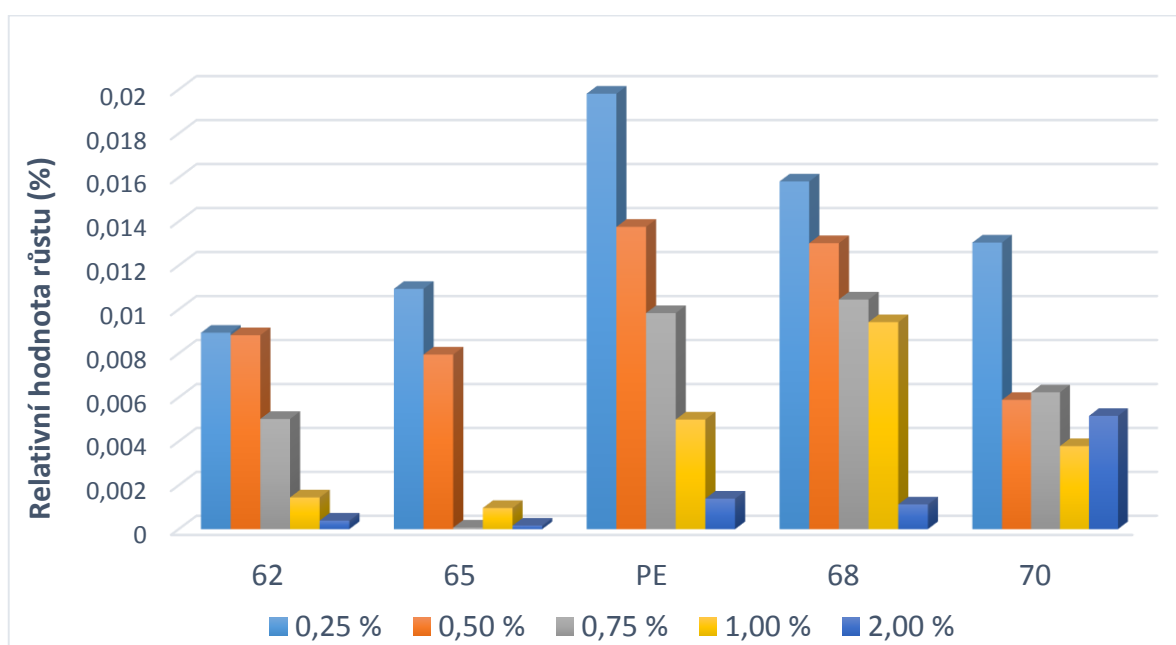
#### 6.1.1 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Bacillus cereus* CCM 2010

Růst *Bacillus cereus* CCM 2010 byl výrazně inhibován testovanými fosforečnany ( $P < 0,05$ ), jak je patrné z grafu (Obr. 6). Nejnižší hodnota relativního růstu, a tedy největší inhibice, byla u testovaných solí stanovena na hodnotu 0,00016 % u Hexa 65 v koncentraci 2 % (w/v), u ostatních zmíněných solí nebyla přesáhnutá hodnota relativního růstu 0,0014 %.

Působení Hexa 62 v koncentraci 0,25 % a 0,50 % (w/v) na *B. cereus* CCM 2010 se pohybovala ve velmi podobných hodnotách pod 0,09 % relativní hodnoty růstu. Srovnáme-li

působení jednotlivých koncentrací solí se střední délkou řetězce 5 (Hexa 62), tak z výsledků je patrné, že mezi působením této soli ve třech nejnižších koncentracích nebyl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P \geq 0,05$ ), na rozdíl od inhibičního účinku v testovaných koncentracích 1,00 a 2,00 % (w/v) ( $P < 0,05$ ). Podobné výsledky byly zjištěny i u soli Hexa 65. V případě ostatních solí v koncentraci 0,25 % (w/v) byl zaznamenán růst nad hodnoty 0,01 %, v případě Hexa PE byla tato hodnota o ještě vyšší. Hexa PE v této koncentraci (0,25 % w/v) působila nejnižším inhibičním účinkem na *B. cereus* CCM 2010 ze všech uvedených fosforečnanů, relativní hodnota růstu se pohybovala na hranici 0,02 %. Tyto rozdíly nebyly statisticky významné ( $P \geq 0,05$ ).

V případě Hexa PE i druhá koncentrace (0,50 % w/v) měla jednu z nejnižších inhibičních účinností, relativní hodnota růstu byla těsně pod hranicí 0,014 %.



Obr. 6. Inhibiční účinek fosforečnanů na bakterii *Bacillus cereus* CCM 2010

Inhibiční působení fosforečnanu Hexa 68 bylo nejúčinnější v nejvyšší použité koncentraci ( $P < 0,05$ ), u ostatních koncentrací se inhibiční účinek na *B. cereus* CCM 2010 postupně zvyšoval od koncentrace 0,25 % po 1,00 % (w/v).

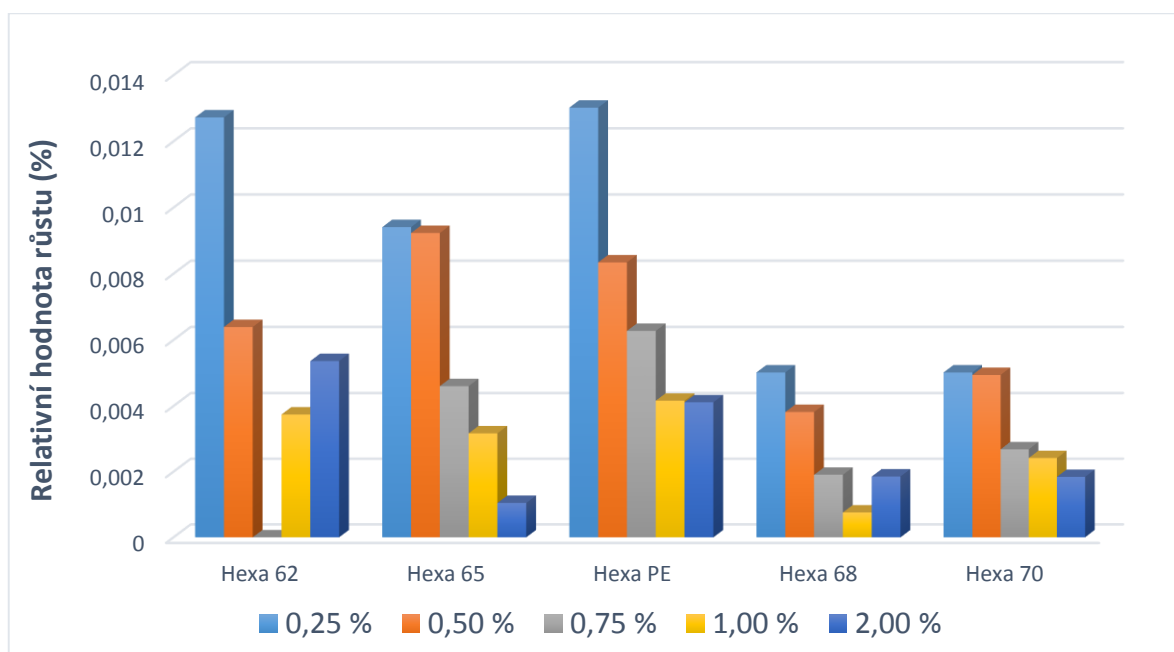
Inhibiční účinek Hexa 70 ve 2,00 % (w/v) koncentraci byl nejnižší, ze všech uvedených solí, relativní hodnota růstu přesahovala 0,005 %. Inhibiční působení koncentrace 0,50 % a 0,75 % (w/v) se výrazně nelišilo ( $P \geq 0,05$ ), na rozdíl od koncentrace 0,25% (w/v), která měla nejnižší inhibiční účinek ze všech koncentrací Hexa 70.

### 6.1.2 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062

Na Obr. 7 je prezentována kultivace bakterie *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062, v přítomnosti fosforečnanových solí, u které vykazovaly největší inhibiční účinky soli Hexa 68 a Hexa 70, tedy soli s největší střední hodnotou délky řetězce. S výjimkou hydrogenfosforečnanu sodného bylo inhibiční působení všech solí na růst testované bakterie ve srovnání s kontrolou signifikantní ( $P < 0,05$ ).

U Hexa 62 v 0,75 % (w/v) koncentraci byla relativní hodnota růstu 0 %, v této koncentraci byl nárůst kolonií *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062 na plotnách nulový, z toho důvodu usuzují, že pravděpodobně došlo k chybě při přípravě, odběru a zaočkování inokula, či při samotném ředění bakteriální suspenze.

Největší inhibiční účinek (při vyloučení Hexa 62 v 0,75 % (w/v) koncentraci) byl zaznamenán u Hexa 68 v 1,00% (w/v) koncentraci, tato relativní hodnota růstu se pohybovala pod 0,0008 %.



Obr. 7. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062

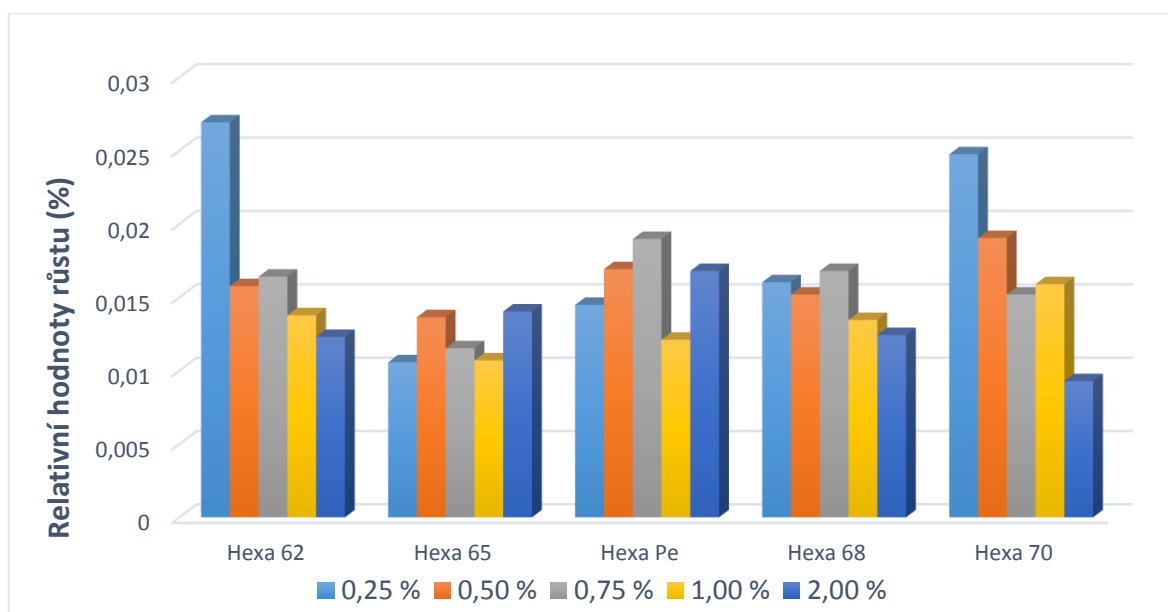
V případě Hexa 65 i Hexa 70 je patrné zvyšování inhibice při použití vyšší koncentrace fosforečnanových solí. I přesto je účinek Hexa 70 při koncentraci 0,25 % a 0,50 % (w/v) o téměř 50 % větší ( $P \geq 0,05$ ) než při použití stejných koncentrací u fosforečnanu Hexa 65.

Nejmenší inhibiční účinky byly zjištěny při koncentraci 0,25 % (w/v) u všech uvedených solí, přičemž při aplikaci této koncentrace nebyly u solí Hexa 62, Hexa 65 a Hexa PE zjištěny významnější rozdíly ( $P \geq 0,05$ ). U Hexa PE a Hexa 62 tato hodnota přesahovala 0,012 % relativní hodnoty růstu.

### 6.1.3 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Clostridium perfringens* CAPM 5744

Další sledovanou bakterií bylo *Clostridium perfringens* CAPM 5744, které bylo nejvýrazněji inhibováno ( $P < 0,05$ ) solí Hexa 70 v koncentraci 2,00 % (w/v), jak je patrné z grafu (Obr. 8). Nejnižší inhibiční účinek byl zjištěn u koncentrace 0,25 % (w/v) u fosforečnanu Hexa 62 a 70.

Vzrůstající koncentrace solí pozitivně působila na zvyšující se inhibiční účinek soli u Hexa 62, 68 i 70. Srovnáme-li působení jednotlivých koncentrací solí tak z výsledků je patrné, že mezi působením této soli ve třech nejnižších koncentracích nebyl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P \geq 0,05$ ), na rozdíl od inhibičního účinku v testovaných koncentracích 2,00 % (w/v) především u soli Hexa 70 ( $P < 0,05$ ).



Obr. 8. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Clostridium perfringens* CAPM 5744

U fosforečnanu Hexa PE byla nejméně účinnou koncentrací 0,75 % (w/v), následované koncentracemi 0,50 % a 2,00 % (w/v), kdy u všech těchto koncentrací byla překročena relativní hodnota růstu 0,015 %. Při srovnání působení Hexa 68 a Hexa PE, tedy solí se střední délkou řetězce 13 a 20 a s podobnou relativní hodnotou růstu, bylo zjištěno, že me-

zi působením ve třech nejnižších koncentracích nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl ( $P \geq 0,05$ ).

Ze sledovaných fosforečnanů se celkově antimikrobiálně projevil fosforečnan Hexa 65, jehož relativní hodnoty růstu u všech použitých koncentrací nepřesáhly hodnotu 0,015 %. Nejúčinněji se u této soli jeví koncentrace 0,25 a 0,75 % (w/v), jejichž hodnoty byly těsně nad hranicí 0,01 % relativní hodnoty růstu, došlo tedy výrazné inhibici ( $P < 0,05$ ).

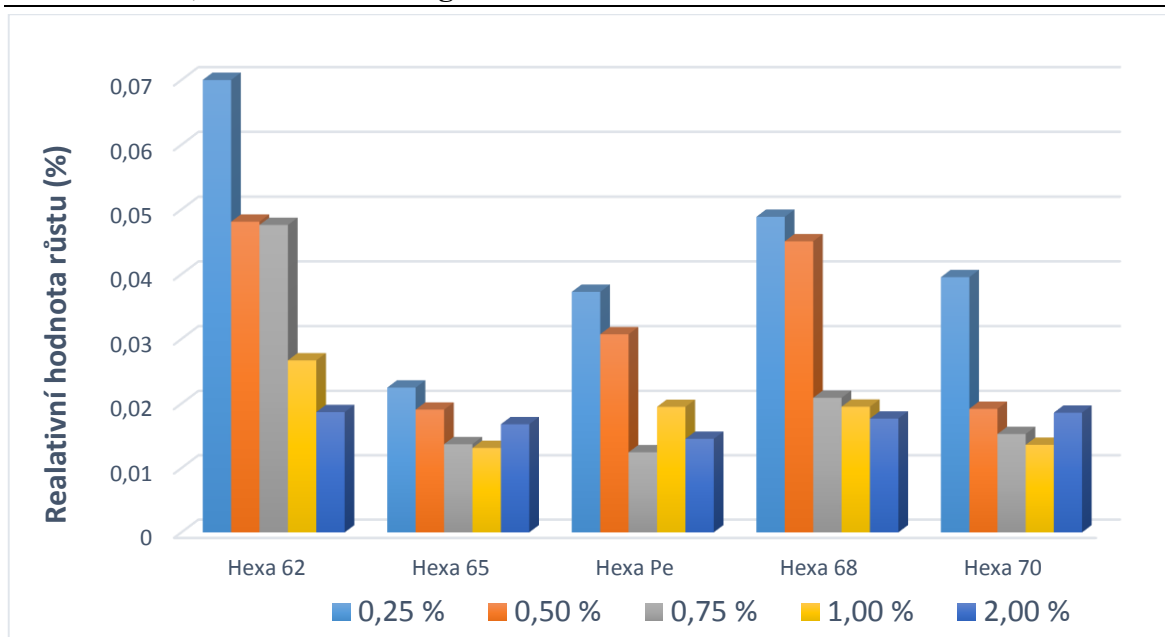
#### 6.1.4 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Clostridium intestinale* CAPM 6397

Z rodu *Clostridium* byla dále sledována bakterie *Clostridium intestinale* CAPM 6397. U této bakterie byla zjištěna nejvyšší inhibice růstu, jejíž hodnota byla signifikantní ( $P < 0,05$ ), při aplikaci fosforečnanu Hexa PE v koncentraci 0,75 % (w/v), kdy se relativní hodnota růstu pohybovala kolem 0,012 %, jak je patrné z grafu (Obr. 9.).

U všech sledovaných solí je patrný zvyšující se inhibiční účinek a tím pádem i klesající relativní hodnoty růstu se stoupající koncentrací dané soli (od 0,25 % po 2,00 % w/v), tyto hodnoty byly ve všech případech statisticky významné ( $P < 0,05$ ). Tento trend je patrný především u soli Hexa 62 a 68. Při srovnání působení těchto dvou solí (Hexa 62 a Hexa 68), bylo zjištěno, že mezi působením ve třech nejnižších koncentracích nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl ( $P \geq 0,05$ ). Podobně se chovají i fosforečnany Hexa 65 a 70, u kterých však docházelo ke snížení inhibiční účinnosti ve 2,00% (w/v) koncentraci. Srovnání Hexa 65 a 70, bylo z výsledků patrné, že nedocházelo k výraznému signifikantnímu rozdílu ( $P \geq 0,05$ ) v koncentracích 0,50 %, 0,75 % a 2,00 % (w/v).

Nejnižší inhibiční působení bylo zaznamenáno u koncentrace 0,25 % (w/v) a to u všech sledovaných fosforečnanů, výrazně nejslabší inhibice byla zjištěna u Hexa 62 jejichž relativní hodnota dosahovala hranice 0,07 %, tato hodnota byla o více než 50 % vyšší než v případě nejúčinnější soli Hexa 65 při použití stejné koncentrace (0,25 % w/v). Srovnáním nejnižší koncentrace Hexa 62 s ostatními solemi, bylo zjištěno, že u Hexa PE, 68 i 70 nebyly výrazné statistické rozdíly ( $P \geq 0,05$ ), ke statisticky významnému rozdílu ( $P < 0,05$ ) došlo pouze u Hexa 65 (u koncentrace 0,25 % w/v).

Druhou nejméně účinnou solí při použití stejné koncentrace (0,25 % w/v) byla Hexa 68. Koncentrace soli 0,50 % (w/v) byla druhá nejméně účinná u všech použitých fosforečnanů, a to především u Hexa 62 a 68 jejichž relativní hodnoty růstu se pohybovaly mezi 0,045 % až 0,049 % a jejichž rozdíl nebyl signifikantní ( $P \geq 0,05$ ).



Obr. 9. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Clostridium intestinale* CAPM 6397

Nejvýraznější antimikrobiální účinek je v grafu (Obr. 9.) nejvíce patrný u fosforečnanu Hexa 65. Relativní hodnoty růstu se u všech použitých koncentrací (0,25 % až 2,00 % w/v) pohybovaly v rozmezí 0,022 % po 0,13 %. Při srovnání výsledků soli se střední délkou řetězce 9 (Hexa 65) s ostatními fosforečnany, bylo z výsledků patrné, že u Hexa PE, 68 i 70 nebyly výrazné statistické rozdíly ( $P \geq 0,05$ ) u koncentrací 0,50 %, 0,75 % a 2,00 % (w/v), v případě soli Hexa 62 nebyl sledován signifikantní rozdíl ( $P \geq 0,05$ ) u koncentrace 0,50 % a 0,75 % (w/v).

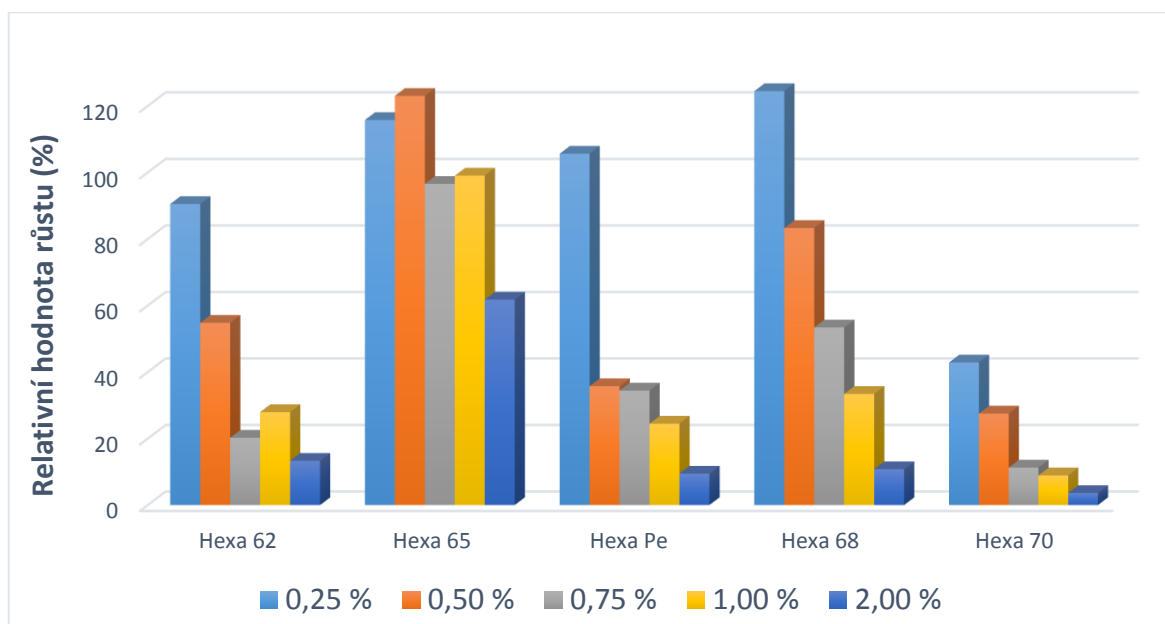
### 6.1.5 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Enterococcus faecalis* CCM 2665

U bakterie *Enterococcus faecalis* CCM 2665 bylo po 24 hodinové kultivaci zjištěno, že největší vliv na relativní hodnotu růstu má nejvyšší použitá koncentrace (2,00 % w/v), kdy toto působení bylo prokázáno u všech sledovaných fosforečnanů (Hexa 62, 65, PE, 68 i 70). K statisticky významnému rozdílu ( $P < 0,05$ ) došlo u koncentrace 2,00 % (w/v) u soli Hexa 65, 68 a 70. Nejsilnější inhibiční účinek byl zjištěn u Hexa 70, kdy relativní hodnota růstu se pohybovala okolo 3,6 %, další silný účinek byl zjištěn u solí Hexa PE a Hexa 68, jejichž relativní hodnoty růstu nepřesáhly 11 %. Nejmenší účinek v nejvyšší testované 2,00% (w/v) koncentraci byl zaznamenán u soli Hexa 65, v tomto případě dosahovala relativní hodnota růstu 61,76 %, což je při srovnání s Hexa 70 ve stejné koncentraci nárůst téměř o 95 %, jak je patrné z grafu (Obr. 10).

Naopak nejmenší vliv na růst bakterie *Enterococcus faecalis* CCM 2665 byl zjištěn při použití nízkých koncentrací, nejčastěji u koncentrace 0,25 % a 0,50 % (w/v). Tuto nízkou inhibici růstu bylo možné pozorovat u všech použitých solí. V tomto případě, z výsledku nebyl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P \geq 0,05$ ) u fosforečnanů Hexa PE (u 2,00% w/v koncentrace) a Hexa 62 (u koncentrace 0,50 % w/v).

Nejmenší inhibiční působení a tedy nejvyšší relativní hodnota růstu byla zaznamenána u soli Hexa 68 v koncentraci 0,25 % (w/v), která přesahovala hodnotu 120 %. Překročení hodnoty 120 % bylo zjištěno i u další soli, Hexa 65 při použití koncentrace 0,50 % (w/v). Při srovnání těchto dvou solí (Hexa 65 a 68) hodnoty nebyly statisticky významné ( $P \geq 0,05$ ).

Z grafu (Obr. 10.) je patrné, že nejméně účinnou solí z hlediska inhibice byl fosforečnan Hexa 65, u kterého všechny koncentrace přesahovaly hodnotu 60 % relativního růstu a čtyři použité koncentrace (0,25 %, 0,50 %, 0,75 % a 1,00 % w/v) překročily, či se blížily hranici 100 % relativního růstu. U této soli (Hexa 65) bylo z výsledků zjištěno, že je statisticky významná ( $P < 0,05$ ).



Obr. 10. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Enterococcus faecalis* CCM 2665

Nejúčinnějším fosforečnanem v případě inhibičního působení na bakterii *Enterococcus faecalis* CCM 2665 byl polyfosforečnan Hexa 70, v jehož případě bylo dosaženo nejnižších relativních hodnot, u všech sledovaných koncentrací (0,25 %, 0,50 %, 0,75 %, 1,00 %

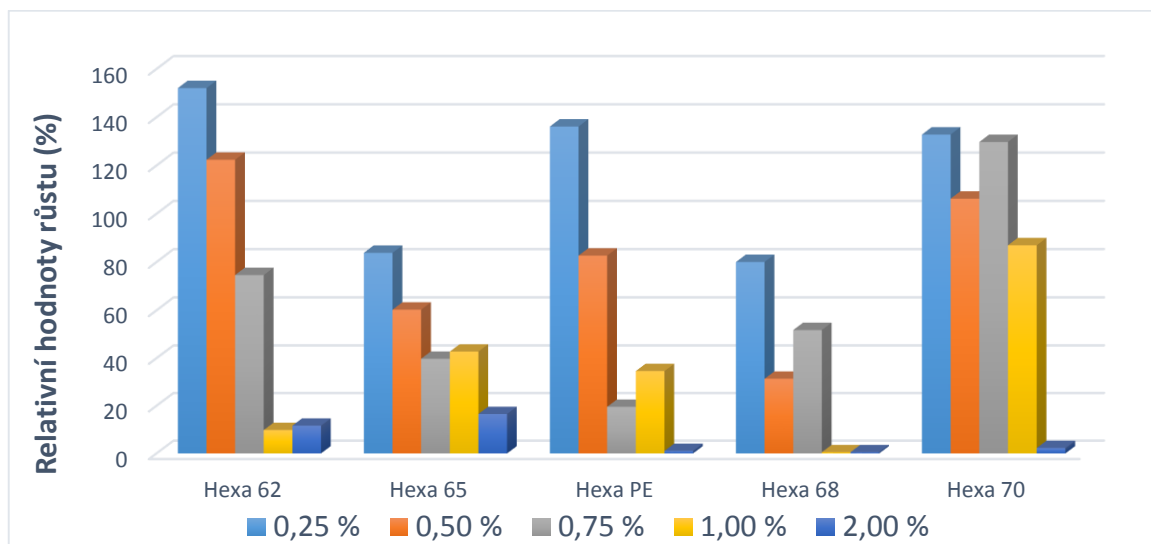


a 2,00 % w/v) při srovnání s dalšími fosforečnanů v daných koncentracích. Srovnání výsledků bylo zjištěno, že hodnoty nebyly statisticky významné ( $P \geq 0,05$ ) u fosforečnanů Hexa 62 v koncentraci 1,00 % a 2,00 % (w/v), u Hexa 65 v koncentraci (0,50 % w/v), u Hexa PE (koncentrace 0,25%, 0,50% a 2,00%) a u Hexa 68 v 0,25% a 0,75% (w/v) koncentraci.

U fosforečnanů Hexa PE, 68 i 70 bylo možné sledovat klesající relativní hodnotu růstu se zvyšující se užitou koncentrací, v případě Hexa 62 a 65 je trend velmi podobný, až na koncentraci 1,00 % (w/v) a hodnoty byly statisticky významné ( $P < 0,05$ ), respektive 0,50 % (w/v), která měla nepatrně menší inhibiční účinky než koncentrace předchozí (0,75 % w/v, respektive 0,25 % w/v).

### 6.1.6 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Enterococcus faecium* CCDM 816

Další sledovanou bakterií rodu *Enterococcus* byl *Enterococcus faecium* CCDM 816, u nějž byl zjištěn největší antimikrobiální účinek u nejvyšší použité koncentrace (2,00 % w/v), a to u tří sledovaných fosforečnanů, jmenovitě u Hexa PE, 68 a 70. Relativní hodnoty růstu v těchto případech nepřesáhly hodnotu 2,5 %, z nichž jsou hodnoty signifikantní ( $P < 0,05$ ) u Hexa PE a Hexa 68.



Obr. 11. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Enterococcus faecium* CCDM 816

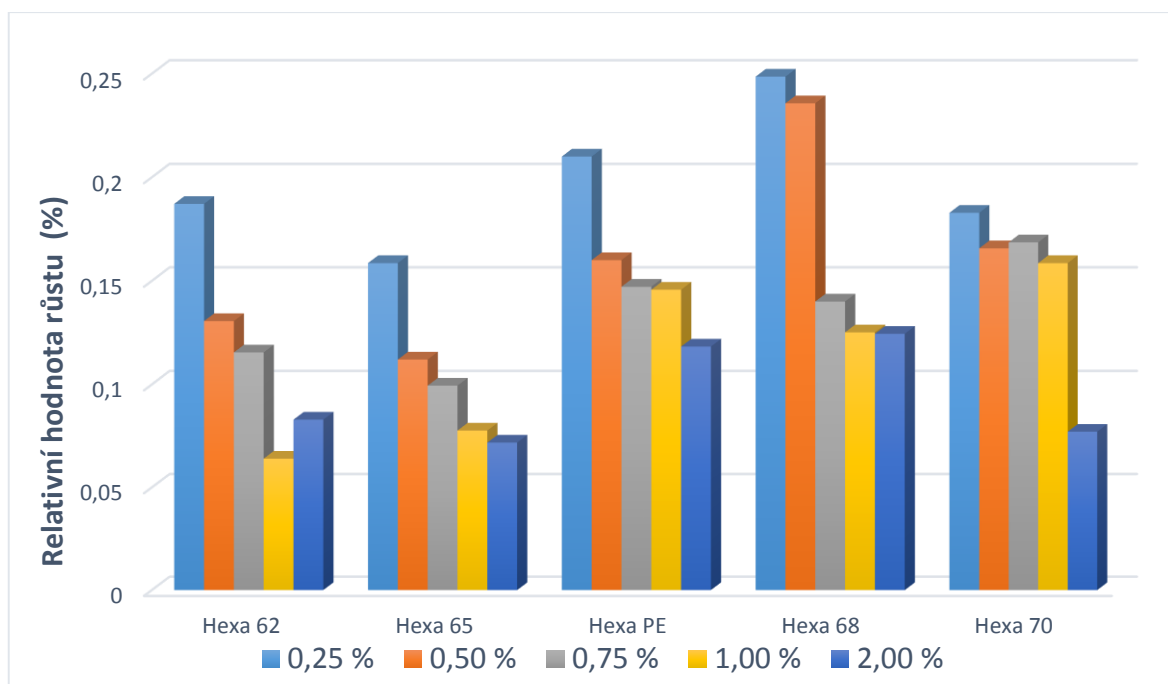
Z grafu (Obr. 11) je patrné, že nejsilnější inhibiční působení bylo zjištěno u soli Hexa 68, jejichž relativní hodnoty růstu při srovnání s ostatními použitými fosforečnanů (Hexa 62, 65, PE a 70) jsou nejnižší u čtyřech použitých koncentrací 0,25%, 0,50 %, 1,00 % a 2,00 %

(w/v). Při srovnání jednotlivých fosforečnanů, bylo patrné, že hodnoty nebyly statisticky významné ( $P \geq 0,05$ ) u fosforečnanů Hexa 62 (v 1,00% a 2,00% w/v koncentraci), u Hexa 65 a 70 (v koncentraci 0,50 % a 2,00 % w/v) a u Hexa PE v 0,50% (w/v) koncentraci.

Naopak nejnižší antimikrobiální účinek vykazovaly dvě nejnižší koncentrace (0,25 % a 0,50 % w/v). V případě fosforečnanu Hexa 62, 65 i PE byly relativní hodnoty růstu výrazně vyšší a u nichž byly zjištěny statisticky významné hodnoty ( $P < 0,05$ ) v případě obou koncentrací 0,25 % i 0,50 % (w/v) solí Hexa 62 a PE, než při použití dalších koncentrací (0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v). Nejvyšší relativní hodnota růstu přesahující 150 % byla pozorována u soli Hexa 62 u koncentrace 0,25 % w/v, následovaná solí Hexa PE při stejné koncentraci (0,25 % w/v) přesahující hodnotu 135 %, při srovnání hodnot těchto dvou solí při koncentraci 0,25 % (w/v) byl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ).

### 6.1.7 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

Další z testovaných bakterií byl *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 v případě této bakterie byla výrazná inhibice ( $P < 0,05$ ) zjištěna po 24 hodinách, jak je patrné z grafu (Obr. 12.), u fosforečnanů užitých ve vyšších koncentracích, jedná se především o koncentrace 1,00 % a 2,00 % (w/v). Největší inhibice, tedy 0,064 % relativní hodnoty růstu se projevila u Hexa 62 v koncentraci 1,00 % (w/v).



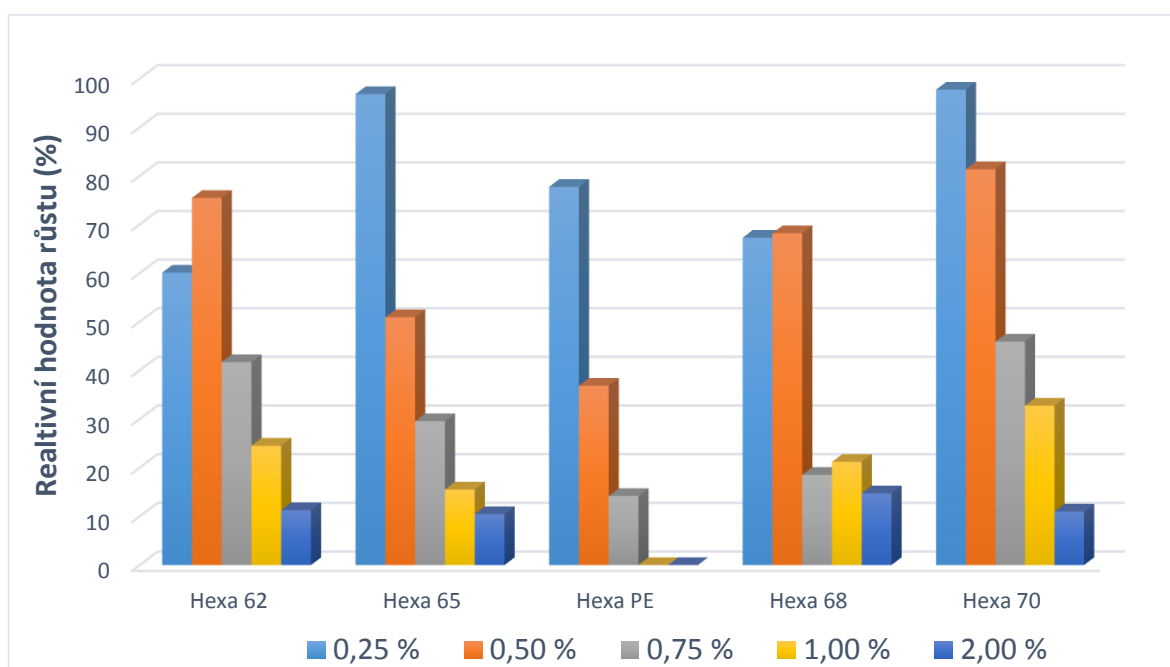
Obr. 12. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

Naopak nejmenší inhibice růstu se vyskytovala v nejmenších dvou koncentracích, tedy v koncentraci 0,25 % a 0,50 % (w/v), tyto hodnoty nebyly statisticky významné ( $P \geq 0,05$ ). U všech sledovaných fosforečnanů hodnota relativního růstu přesáhla 0,15 %. Nejnižší účinek byl zaznamenán u soli Hexa 68 a to v obou nejnižších koncentracích, jejichž hodnoty se pohybovaly nad 0,23 % relativní hodnoty růstu.

Fosforečnan Hexa 70 v koncentracích 0,25 % až 1,00 % (w/v) měl menší inhibiční účinky, oproti dalším solím ve stejné koncentraci ( $P \geq 0,05$ ), kdy se relativní hodnoty růstu pohybovaly v hodnotách od 0,155 % po 0,165 %.

### 6.1.8 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418

Druhou sledovanou bakterií z rodu *Staphylococcus* byl *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418, v případě této bakterie bylo minimální antimikrobiální účinek zaznamenán při užití nízkých koncentrací fosforečnanů, jak je patrné z grafu (Obr. 13.). A to především při použití prvních dvou koncentrací (0,25 % a 0,50 % w/v), u všech sledovaných fosforečnanů (Hexa 62, 65, PE, 68 i 70), tyto hodnoty při srovnání s kontrolou nebyly statisticky významné ( $P \geq 0,05$ ). Při použití koncentrace 0,25% (w/v) se relativní hodnoty růstu pohybovaly od 60 % do téměř 97 %, a u 0,50% (w/v) koncentrace tato hodnota byla v rozmezí 36 % až 81 %.



Obr. 13. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418

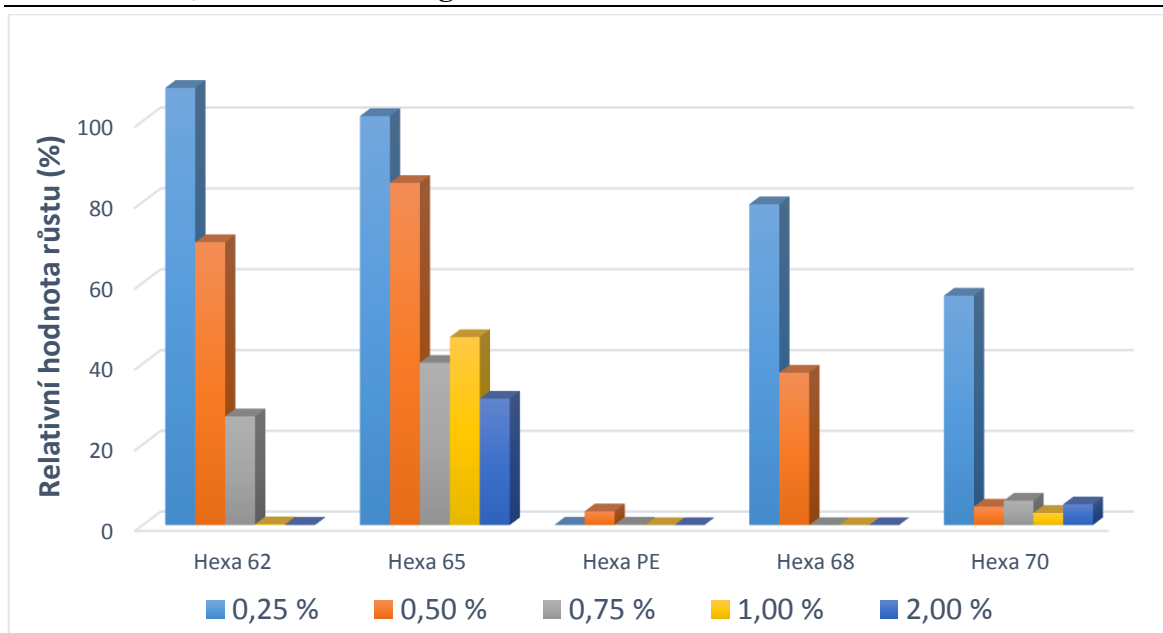
Při srovnání s vyššími koncentracemi (0,75 %, 1,00 % i 2,00 % w/v) u všech sledovaných fosforečnanů byla relativní hodnota růstu výrazně nižší a tedy byl zjištěn výraznější anti-mikrobiální účinek. Nejvýraznější inhibiční účinek byl zaznamenán v případě soli Hexa PE u koncentrací 1,00 % a 2,00 % (w/v), a při srovnání s kontrolou byl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ).

U třech sledovaných fosforečnanů je patrný zvyšující se inhibiční účinek při zvýšení koncentrace jednotlivých fosforečnanů, tento trend je patrný u Hexa 65, PE i 70. Výjimku tvoří soli Hexa 62 a 68, u těchto dvou solí došlo k nárůstu relativní hodnoty růstu u koncentrace 0,50 % (w/v), která byla inhibičně méně účinná než koncentrace 0,25 % w/v. Srovnáním fosforečnanů Hexa 62 a 68 v koncentracích 0,25 % a 0,50 % (w/v) nebyly hodnoty statisticky významné ( $P \geq 0,05$ ).

### 6.1.9 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Staphylococcus xylosus* DEPE26

U sledované bakterie *Staphylococcus xylosus* DEPE26 byla po 24 hodinové kultivaci (Obr. 14) zjištěna výrazná inhibice růstu u soli Hexa PE, která při srovnání s dalšími použitými solemi působila nejvíce na relativní hodnotu růstu, a její hodnoty nepřesáhly 3,5 % u žádné z použitých koncentrací (0,25 %, 0,50 %, 0,75 %, 1,00 % i 2,00 % w/v). U čtyřech použitých koncentrací (0,25 %, 0,50 %, 1,00 % a 2,00 % w/v) fosforečnanu Hexa PE byly hodnoty relativního růstu nejnižší ze všech použitých koncentrací i solí. Při srovnání tohoto fosforečnanu s kontrolou, bylo zjištěno, že většina hodnot byla statisticky významná ( $P < 0,05$ ), až na koncentraci 0,50 % (w/v), u které nebyl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P \geq 0,05$ ).

Další výrazná inhibice růstu byla pozorována, jak je patrné z grafu na Obr. 14, u fosforečnanů Hexa 62 (koncentrací 1,00 % a 2,00 % w/v), u Hexa 68 (koncentrací 0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v) a Hexa 70 (koncentrací 0,50 %, 0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v), kdy se jednotlivé hodnoty pohybovaly maximálně do 6 % relativní hodnoty růstu. Při srovnání jednotlivých koncentrací s kontrolou se došlo k závěru, že v případě soli Hexa 70 nebyl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P \geq 0,05$ ) u všech uvedených koncentrací s výjimkou nejnižší testované koncentrace. Naopak u Hexa 68 (koncentrací 0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v) byl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) daných hodnot oproti nižším aplikovaným koncentracím, stejný výsledek byl zjištěn i v případě Hexa 62 (1,00% w/v koncentrace).



Obr. 14. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Staphylococcus xylosus* DEPE26

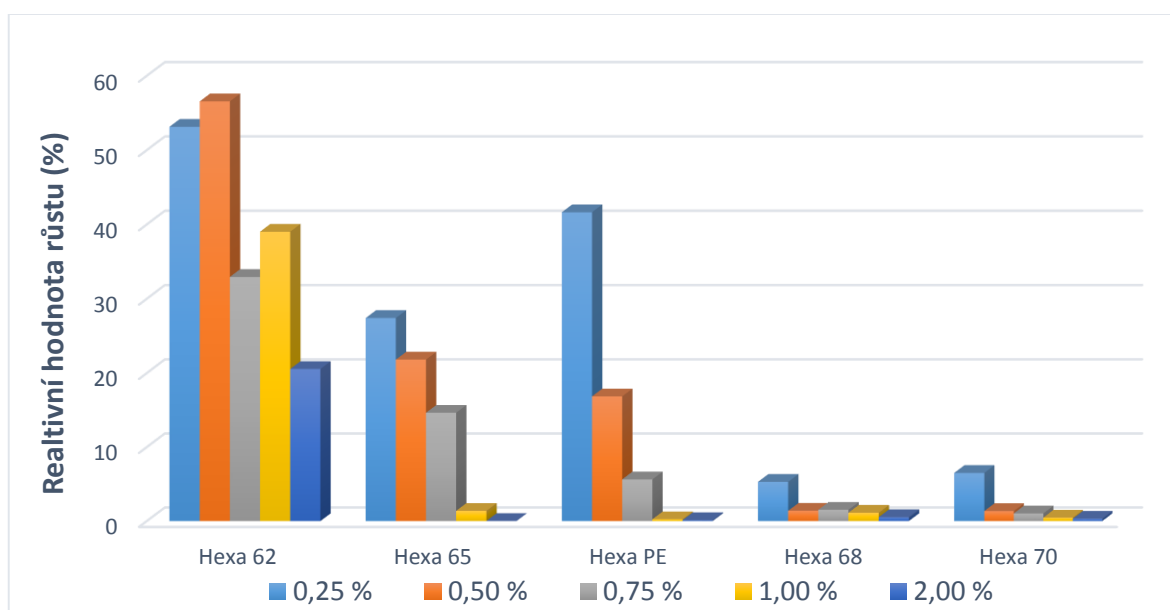
Nejmenší inhibice růstu bakterie *Staphylococcus xylosus* DEPE26 byla pozorována u koncentrací s nižší hodnotou, nejčastěji pak u 0,25 % 0,50 % (w/v). Při srovnání těchto koncentrací testovaných fosforečnanů s kontrolou, bylo zjištěno, že v případě koncentrace 0,25 % (w/v) nebyl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P \geq 0,05$ ) u fosforečnanů Hexa 62, 65, 68 a PE. V případě aplikace 0,25 % (w/v) koncentrace byl zjištěn signifikantní rozdíl hodnot ( $P < 0,05$ ) u solí Hexa 62 a 65 ve srovnání s ostatními testovanými fosforečnany. Tyto koncentrace výrazně převyšovaly svou relativní hodnotou růstu ostatní, nejvýrazněji se projevily soli Hexa 62 a 65 s koncentracemi 0,25 % (w/v) jejíž hodnota dosahoval 100 % a 0,50 % (w/v) s relativní hodnotou růstu v rozmezí 70 % až 85 %.

#### 6.1.10 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Staphylococcus succinus* DEPE18

Další sledovanou bakterií z rodu *Staphylococcus* byl *Staphylococcus succinus* DEPE18, největší antimikrobiální působení ( $P < 0,05$ ) bylo pozorováno u Hexa 68 a 70 a to v případě všech použitých koncentrací (0,25 %, 0,50 %, 0,75 %, 1,00 % i 2,00 % w/v) jednotlivých solí, jak je patrné z grafu (Obr. 15). Oba tyto fosforečnany působily na *Staphylococcus succinus* téměř totožně a jednotlivé relativní hodnoty růstu se téměř nelišily a jejich hodnoty dosahovaly v obou případech 6,5 %.

Přesto byl však zaznamenán nejvyšší inhibiční účinek ( $P < 0,05$ ) u fosforečnanu Hexa 65 při použití koncentrace 2,00 % (w/v), v tomto případě se relativní hodnota růstu pohybovala na hranici 0,009 %.

Nejméně účinné koncentrace působící inhibičně na *Staphylococcus succinus* DEPE18 byly především 0,25 % a 0,50 % (w/v) u fosforečnanů Hexa 62, 65 a PE, jejichž účinek byl výrazně nižší. Při srovnání výsledků s kontrolou byl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) u fosforečnanů Hexa 62 a 65. U Hexa 62 se koncentrace 0,25 % a 0,50 % (w/v) pohybovaly nad hranicí 50 % relativní hodnoty růstu.



Obr. 15. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Staphylococcus succinus* DEPE18

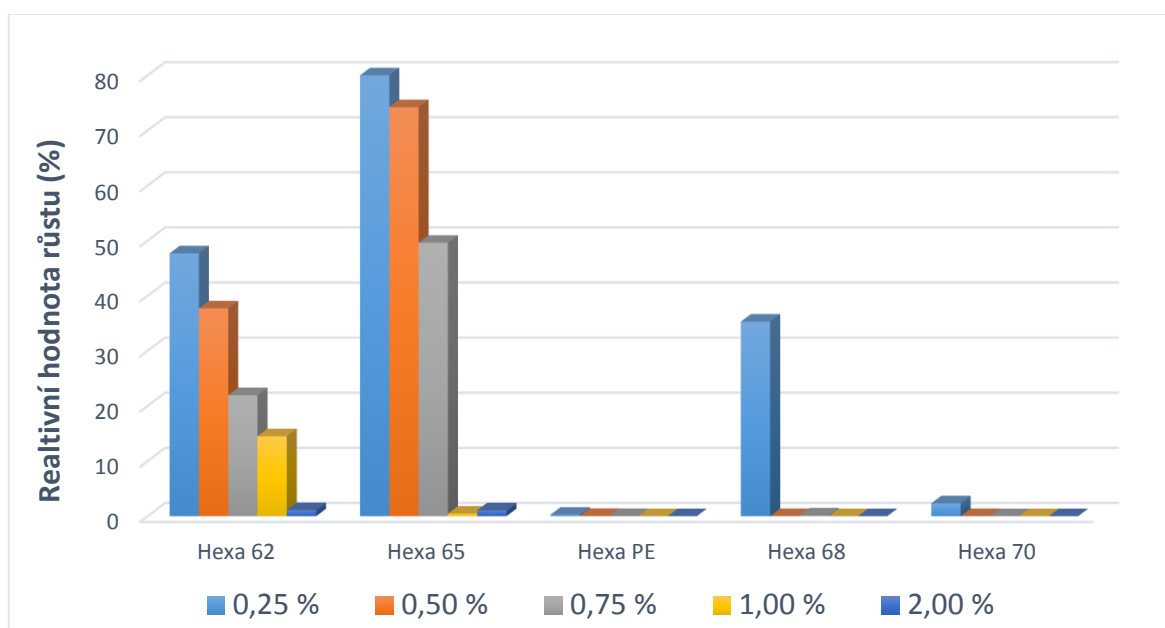
U použitých fosforečnanů je patrný zvyšující se inhibiční účinek ( $P < 0,05$ ) při použití vyšších koncentrací solí především pak u fosforečnanů Hexa 65, PE, 68 a 70, jak je patrné z grafu (Obr. 15) na rozdíl od Hexa 62, kde došlo ke snížení antimikrobiální aktivity u koncentrací 0,50 % a 1,00 %.

#### 6.1.11 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Staphylococcus warneri* DEPE23

V grafu (Obr. 16.) je uvedena poslední sledovaná bakterie rodu *Staphylococcus*, *Staphylococcus warneri* DEPE23. V případě této bakterie byla poměrně vysoká antimikrobiální aktivita hned u tří sledovaných fosforečnanů, jmenovitě se jednalo o fosforečnany Hexa PE, 68 a 70, tedy fosforečnany s vyšší střední délkou řetězce. Nejvyšší inhibice byla zjištěna u Hexa 70, jejichž relativní hodnoty růstu dosáhly pouze 2,33 % a při srovnání výsledků

s kontrolou byl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ). Následovaná solí Hexa PE s relativní hodnotou růstu kolem 2,54 %. Výjimku tvořil fosforečnan Hexa 68 při použití koncentrace 0,25 % (w/v) s relativní hodnotou růstu kolem 35 %, v této koncentraci zjištěná hodnota nebyla statisticky významná ( $P \geq 0,05$ ) ve srovnání s kontrolou.

Naopak nejnižší inhibice růstu a tedy nejvyšší relativní hodnoty růstu byly zaznamenány, jak je patrné z grafu na Obr. 16 při použití nižších koncentrací solí, nejčastěji pak 0,25 %, 0,50 % a 0,75 % (w/v). V případě těchto tří koncentrací bylo zjištěno, že u fosforečnanů Hexa 62 a 65 nebyl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P \geq 0,05$ ).



Obr. 16. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Staphylococcus warneri* DEPE23

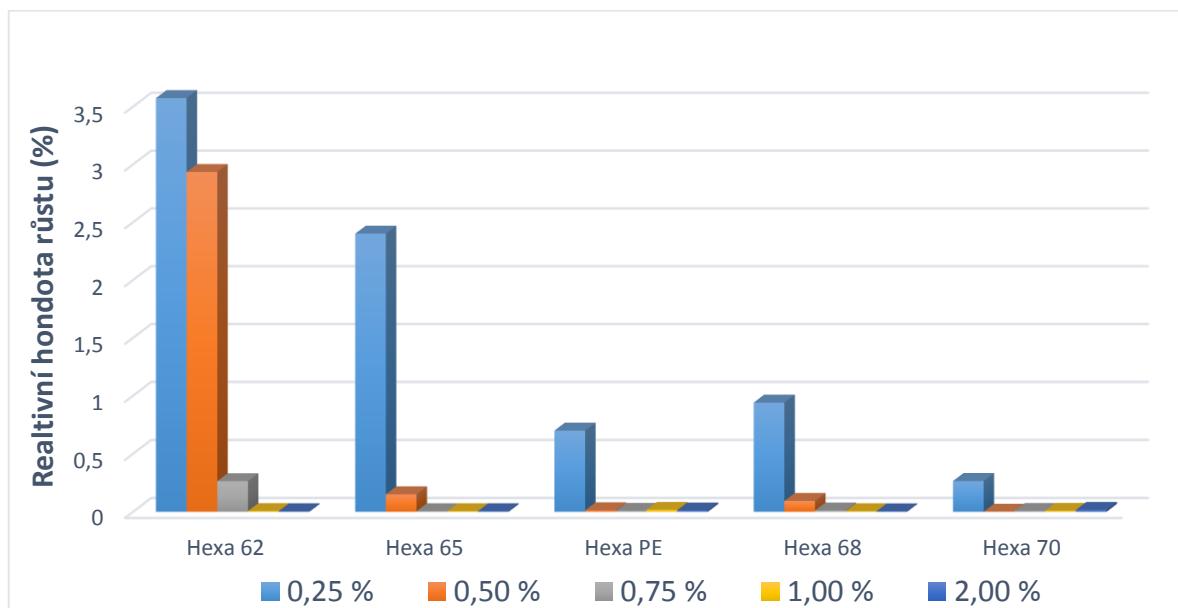
Nejméně účinnou pak byla sůl Hexa 65, u které hned tři koncentrace dosahovaly nejvýraznějších relativních hodnot růstu, a u kterých při srovnání výsledků s kontrolou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl hodnot ( $P \geq 0,05$ ). Nejmenší antimikrobiální vliv byl zjištěn u koncentrace 0,25 % (w/v), která přesáhla hodnotu 80 % relativního růstu, následovaná koncentrací 0,50 % (w/v) s hodnotou kolem 74 %.

### 6.1.12 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*

#### T8

Další sledovanou grampozitivní bakterií byl *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T8. U této bakterie je z grafu na Obr. 17 patrný silný antimikrobiální účinek ( $P < 0,05$ ) při použití

vyšších koncentrací testovaných fosforečnanů (0,50 %, 0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v) a také zvyšující se účinek solí s delší střední délkou řetězce (Hexa PE, 68 a 70).



Obr. 17. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T8

Nejmenší inhibiční účinek byl zjištěn u nejnižší používané koncentrace (0,25 % w/v), která se tímto způsobem projevila u všech sledovaných fosforečnanů (Hexa 62, 65, PE, 68 i 70). Ve srovnání s kontrolou byl u všech testovaných fosforečnanů v koncentraci 0,25 % (w/v) zjištěn signifikantní rozdíl oproti kontrolním vzorkům bez polyfosforečnanů ( $P < 0,05$ ). Nejvyšší relativní hodnota růstu byla zjištěna u fosforečnanu Hexa 62, při použití koncentrací 0,25 % a 0,50 % (w/v). U fosforečnanu Hexa 62 při použití koncentrace 0,25 % (w/v) byl inhibiční účinek o 92 % nižší než při použití stejné koncentrace (0,25 % w/v) fosforečnanu Hexa 70. Při srovnání hodnot solí Hexa 62 a 70 bylo z výsledků patrný statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) u koncentrací 0,25 % a 0,50 % (w/v). Na rozdíl od koncentrací (1,00 % a 2,00 % w/v), u kterých rozdíly nebyly statisticky významné ( $P \geq 0,05$ ).

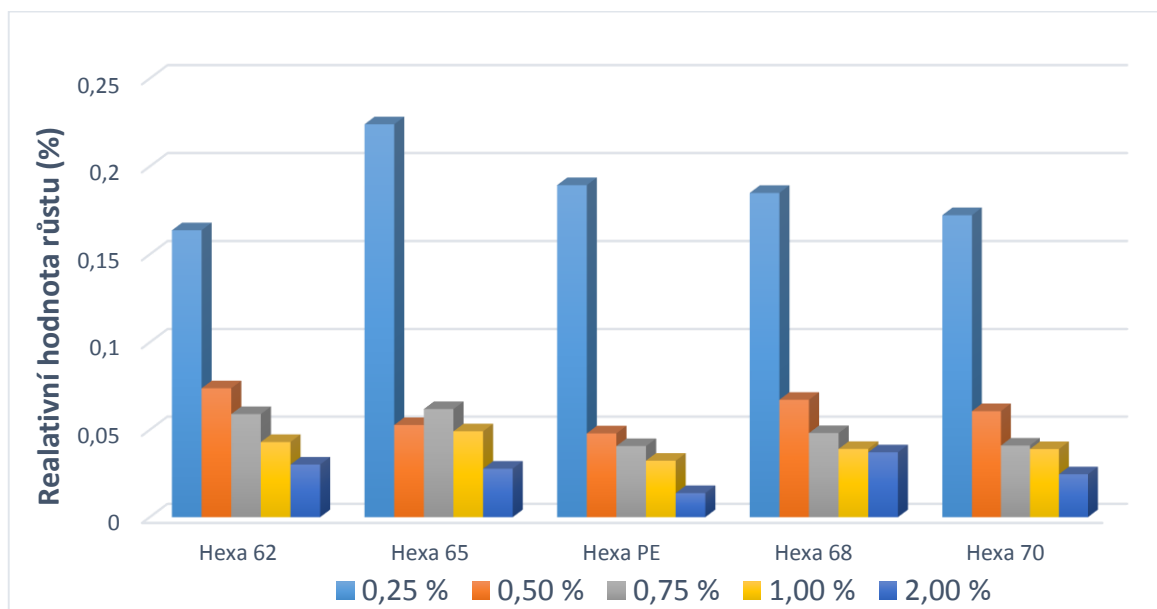
### 6.1.13 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*

#### T2

Na Obr. 18 je možné sledovat inhibiční působení fosforečnanů na bakterie *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T2, které bylo velmi podobné předchozí bakterii (Obr. 17) a u které došlo k silnému antimikrobiálnímu působení ( $P < 0,05$ ) při použití vyšších koncentrací fosforečnanů. V tomto případě se jednalo o koncentrace 0,50 %, 0,75 %, 1,00 % a



2,00 % (w/v) u všech testovaných fosforečnanů (Hexa 62, 65, PE, 68 i 70). Pokud byly tyto polyfosforečnany aplikovány do MRS média, tak se relativní hodnoty růstu pohybovaly mezi 0,013 % až 0,073 %. U všech fosforečnanů při použití vyšších koncentrací (v tomto případě 0,50 %, 0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v) bylo při srovnání s kontrolou zjištěny významné statistické rozdíly ( $P < 0,05$ ).



Obr. 18. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* T2

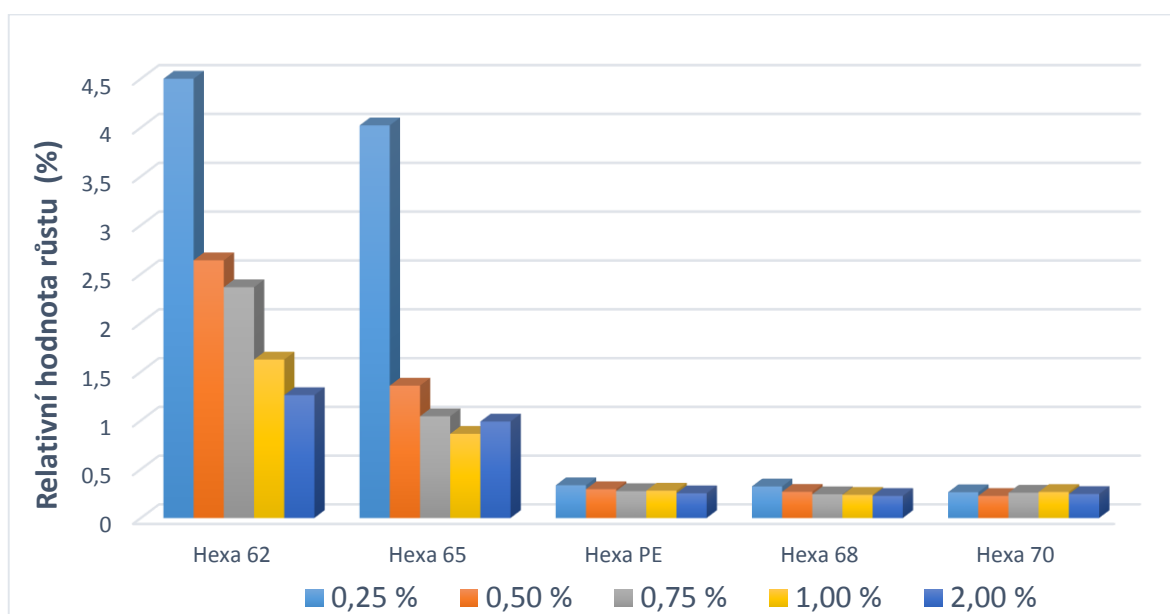
Naopak nejnižší inhibice růstu nastala při použití nejnižší používané koncentrace (0,25 % w/v) a to u všech použitých fosforečnanů (Hexa 62, 65, PE, 68 i 70). Nejméně účinnou byla sůl Hexa 65 s relativní hodnotou růstu překračující 0,22 %, u této koncentrace, avšak při srovnání s kontrolou byl i v tomto případě zjištěn signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) v růstu. Průměrně byl antimikrobiální účinek koncentrace 0,25 % (w/v) při srovnání s 0,50 % (w/v) o 65 % nižší.

#### 6.1.14 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Lactobacillus curvatus* T15

V případě bakterie *Lactobacillus curvatus* T15 (Obr. 19.) byl zjištěn výrazný inhibiční účinek ( $P < 0,05$ ) fosforečnanů s delší střední délkou řetězce (Hexa PE, 68 a 70) u všech použitých koncentrací (0,25 %, 0,50 %, 0,75 %, 1,00 % i 2,00 % w/v). Relativní hodnota růstu se u těchto solí (Hexa PE, 68 i 70) v rozmezí od 0,22 % po 0,34 %. S výjimkou Hexa 62 bylo inhibiční působení všech solí na růst testované bakterie ve srovnání s kontrolou signifikantní ( $P < 0,05$ ).

Vyšší inhibiční účinek ( $P < 0,05$ ) byl zaznamenán i u dalších fosforečnanů (Hexa 62, 65) při použití vyšších koncentrací. V případě Hexa 62 byla nejúčinnější koncentrací 2,00 % (w/v), u Hexa 65 se pak jednalo o koncentraci 1,00 % (w/v), její relativní hodnota růstu se pohybovala pod 0,90 %. Při srovnání hodnot fosforečnanů Hexa 62 a 65 ve všech používaných koncentracích nebyly zjištěny významnější rozdíly ( $P \geq 0,05$ ) v růstu bakterie *L. curvatus* T15.

Nejméně účinnou koncentrací ( $P < 0,05$ ) byla 0,25 % (w/v) a to u většiny sledovaných fosforečnanů (Hexa 62, 65, PE, 68). Nejmenší antimikrobiální účinek byl zjištěn u Hexa 62 a 65, jak je patrné z grafu (Obr. 19.). Relativní hodnoty růstu se pohybovaly v obou případech nad hodnotou 4%.



Obr. 19. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Lactobacillus curvatus* T15

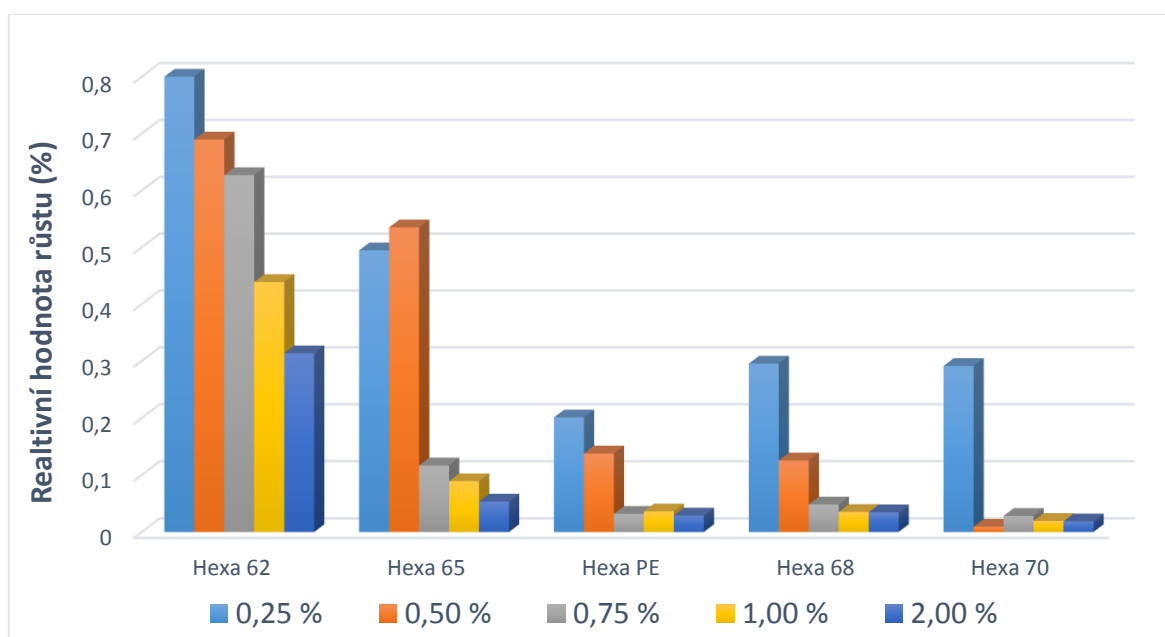
Zvyšující se inhibiční účinek při použití vyšší koncentrace byl zjištěn u Hexa 62 a 68. U Hexa 65 došlo ke snížení účinnosti koncentrace 2,00 % (w/v). U dalších fosforečnanů (Hexa PE a 70) došlo k nepatrnému odchýlení od tohoto trendu, avšak relativní hodnoty růstu se v těchto případech lišily pouze minimálně. Při srovnání hodnot růstu v přítomnosti fosforečnanů Hexa PE a Hexa 70 nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ( $P \geq 0,05$ ).

#### 6.1.15 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Lactobacillus brevis* T24

V grafu na Obr. 20 je uveden růst další bakterie z rodu *Lactobacillus*, na kterou byla aplikována série fosforečnanových solí, a to *Lactobacillus brevis* T24. Antimikrobiální půso-

bení fosforečnanů na tento kmen bylo velmi podobné, jako u předešlých sledovaných bakterií rodu *Lactobacillus*. Silný inhibiční účinek ( $P < 0,05$ ) byl zjištěn především u solí Hexa PE, 68 a 70 při použití vyšších koncentrací solí.

Nejsilnější inhibiční působení bylo u všech sledovaných fosforečnanů (Hexa 62, 65, PE, 68 i 70) při použití koncentrace 2,00 % (w/v), nejvyšší působení bylo zaznamenáno u Hexa 70, jehož relativní hodnota růstu se pohybovala pod hranicí 0,02 %. U všech fosforečnanů při srovnání s kontrolou byl zjištěn signifikantní rozdíl v růstu testované bakterie ( $P < 0,05$ ).



Obr. 20. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Lactobacillus brevis* T24

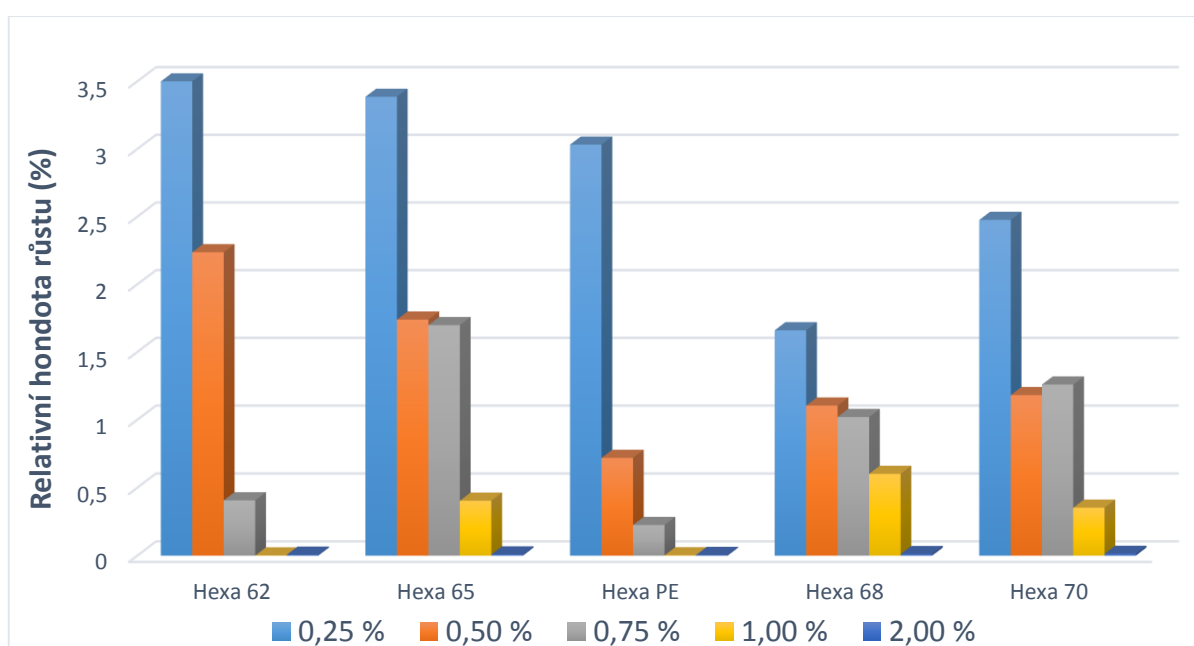
Nejúčinnější koncentrace 0,25 % (w/v) byla zjištěna u fosforečnanu Hexa PE, jehož antimikrobiální účinek byl o 75 % silnější než v případě nejslabšího působení u soli Hexa 62, při použití stejné koncentrace (0,25 % w/v). Srovnáním hodnot fosforečnanů Hexa PE a 62 nebyl však zjištěn signifikantní rozdíl v inhibici růstu ( $P \geq 0,05$ ).

Naopak nejslabší antimikrobiální vliv byl u nejnižší použité koncentrace (0,25 % w/v) všech fosforečnanů. Nejmenší inhibiční účinek byl zjištěn u soli Hexa 62 v případě tří nejnižších použitých koncentrací (0,25 %, 0,50 % a 0,75 % w/v). Relativní hodnoty růstu se v tomto případě pohybovaly od 0,62 % po 0,82 %. Signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) byl zjištěn při srovnání jednotlivých koncentrací (0,25 %, 0,50 % a 0,75 % w/v) testovaných solí s fosforečnanem Hexa 62 u fosforečnanů Hexa 70 (0,50% w/v koncentrace) a u Hexa 68 a

PE (u koncentrací 0,75 % w/v), u ostatních koncentrací nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ( $P \geq 0,05$ ).

#### 6.1.16 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 670

První sledovanou bakterií rodu *Lactococcus* byl *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 670. U této bakterie byl silný antimikrobiální účinek ( $P < 0,05$ ) při použití vyšších koncentrací testovaných fosforečnanových solí, jmenovitě se jednalo o koncentrace 1,00 % a 2,00 % (w/v), a to u všech použitých fosforečnanů, jak je patrné z grafu na Obr. 21.



Obr. 21. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 670

Nejmenší antimikrobiální účinek byl zjištěn u koncentrace 0,25 % (w/v) u všech testovaných fosforečnanů. Relativní hodnoty růstu se pohybovaly nad hodnotou 1,65 % a dosahovaly hodnot 3,60 %. Nejnižší inhibiční účinek této koncentrace byl zjištěn u solí Hexa 62, 65 a PE, kde se relativní hodnoty růstu pohybovaly nad hranicí 3,00 %. Při srovnání jednotlivých fosforečnanů (Hexa 62, 65 a PE) s kontrolou byl zjištěn signifikantní rozdíl v rozdílu růstu testovaného kmene bakterie v přítomnosti aplikovaných fosforečnanů a bez nich ( $P < 0,05$ ).

Nejvyšší inhibiční účinek byl zjištěn především u fosforečnanu Hexa PE při použití dvou nejvyšších koncentrací (1,00 % a 2,00 % w/v, ( $P < 0,05$ )), relativní hodnoty růstu se v tomto případě pohybovaly pod hranicí 0,005 %. Při použití této soli (Hexa PE), byl silný inhibiční účinek i u koncentrace 0,75 % (w/v), která s relativní hodnotu růstu 0,22 % byla neúčinnější při srovnání se stejnou koncentrací (0,75 % w/v) ostatních testovaných fosforečnanů (Hexa 62, 65, 68 i 70). Podobné výsledky byly zjištěny i při použití další koncentrace (0,50 % w/v) této soli, která byla také vůči ostatním fosforečnanům neúčinnější. Srovnáním hodnot fosforečnanu Hexa PE (jmenovitě koncentrací 0,50 % a 0,75 % w/v) s ostatními testovanými fosforečnany bylo z výsledků patrné, že nebyly zjištěny významnější rozdíly ( $P \geq 0,05$ ) u všech testovaných polyfosforečnanů při aplikaci daných koncentrací (0,50 % a 0,75 % w/v, Obr. 21).

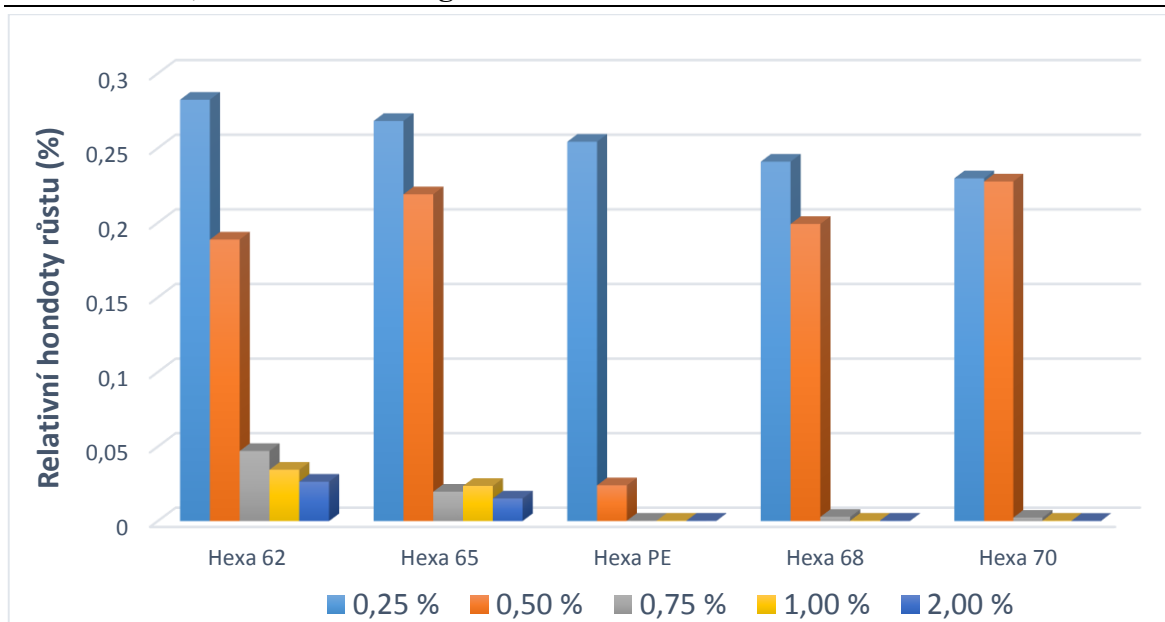
#### 6.1.17 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

##### CCDM 824

U bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 po 24 hodinové kultivaci byl zjištěn silný antimikrobiální účinek ( $P < 0,05$ ) při použití vyšších koncentrací (0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v) všech použitých polyfosforečnanů (Hexa 62, 65, PE, 68 i 70), jak je možné vidět v grafu na Obr. 22.

Nejnižší antimikrobiální účinek byl v případě použití nižších koncentrací (0,25 % a 0,50 % w/v) u všech sledovaných fosforečnanů (Hexa 62, 65, PE, 68 i 70), rozdíl inhibičního účinku byl mezi kontrolní kultivací bez testované fosforečnanové soli a s testovanou solí v jakékoliv koncentrací více než 99 % ( $P < 0,05$ ).

Největší antimikrobiální účinek byl dosažen u soli Hexa 70 při použití koncentrace 2,00 % (w/v), kdy se relativní hodnota růstu pohybovala pod hranicí 0,0002 %. Podobných hodnot bylo dosaženo i u dalších koncentrací (0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v) fosforečnanů Hexa PE, 68 i 70. Nižší inhibiční účinek byl zjištěn u soli Hexa 62 a 65. Při použití stejných koncentrací (0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v) se relativní hodnota růstu pohybovala v rozmezí od 0,015 % po 0,047 %. Při srovnání testovaných fosforečnanů v daných koncentracích (0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v) s kontrolou byl u všech hodnot zjištěn signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ).



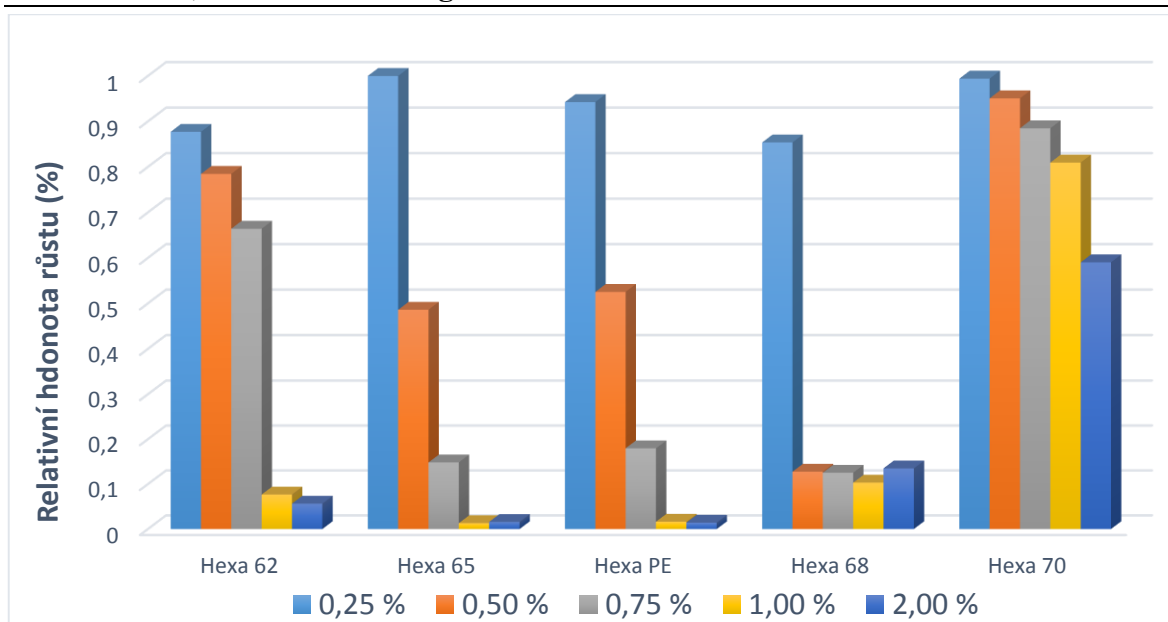
Obr. 22. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

Nejméně účinnou byla sůl Hexa 62 při použití koncentrace 0,25 % (w/v), s relativní hodnotou růstu nad 0,28 %. Podobných hodnot bylo dosaženo i při použití koncentrace 0,50 % (w/v), která byla nejméně účinná u fosforečnanu Hexa 70 (ve srovnání s ostatními polyfosforečnany). Srovnáním hodnot relativní hodnoty růstu testovaného fosforečnanu Hexa 62 s Hexa 70 byl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) při aplikaci vyšších koncentrací (1,00 a 2,00 % w/v) uvedených fosforečnanů.

#### 6.1.18 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686

Na Obr. 23 je uveden růst další sledovaná bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 v přítomnosti testovaných polyfosforečnanů. Tato bakterie se výrazně inhibičně lišila od předešlých bakterií rodu *Lactococcus* účinkem fosforečnanu Hexa 70.

U Hexa 62, 65, PE i 68 byly koncentrace 1,00 % a 2,00 % (w/v) nejméně účinnými ( $P < 0,05$ ) co se týká inhibice růstu testovaného kmene. Vysoký inhibiční účinek byl dosažen i při použití koncentrace 0,75 % (w/v), a to především u fosforečnanu Hexa 65, PE a 70. U soli Hexa 62 působila tato koncentrace (0,75 % w/v) méně inhibičně než stejná koncentrace solí Hexa 65, PE a 68 a její relativní hodnota růstu dosahovala hodnoty 0,66.



Obr. 23. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686

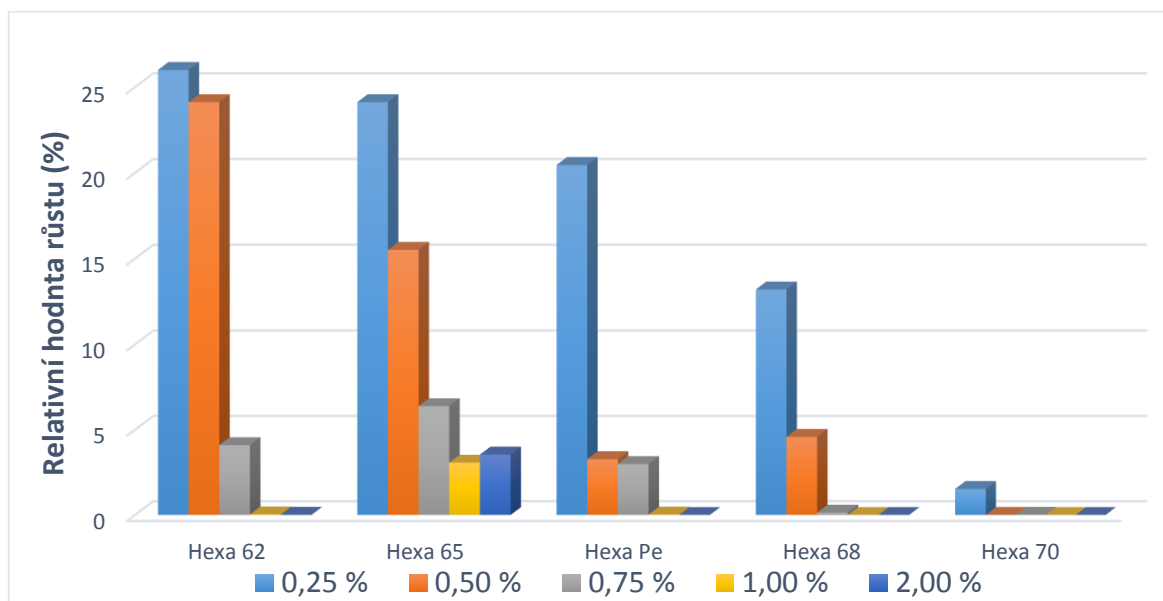
Účinek fosforečnanu Hexa 70 byl nižší ve srovnání s dalšími testovanými polyfosforečnanými především při použití vyšších koncentrací (0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v) ve srovnání s ostatními fosforečnanými při daných koncentracích. Srovnáním fosforečnanu Hexa 70 s kontrolou, byl u nejvyšších tří koncentrací (0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v) zjištěn signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) oproti kontrolním vzorkům, na rozdíl od nižších koncentrací (0,25 % a 0,50 % w/v). Relativní hodnoty růstu se u těchto tří koncentrací (0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v) pohybovaly mezi hodnotami od 0,59 % do 0,88 %.

#### 6.1.19 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 702

Poslední sledovanou grampozitivní bakterií, na kterou byly aplikovány polyfosforečnanové soli, byl *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 702 (Obr. 24). Inhibiční účinek sledovaných fosforečnanů na tuto bakterii byl velmi podobný jako u předešlých bakterií rodu *Lactococcus*.

Nejnižší antimikrobiální účinek oproti kontrole byl zjištěn u nejnižších testovaných koncentrací solí, především u koncentrací 0,25 % a 0,50 % (w/v) ( $P \geq 0,05$ ), jak je patrné z grafu (Obr. 24). Nejslabší inhibiční účinek byl pozorován u soli Hexa 62, hodnoty relativního růstu se u obou koncentrací (0,25 % i 0,50 % w/v) pohybovaly nad 24 %. Inhibiční

účinek dvou nejnižších koncentrací se postupně zvyšoval s délkou řetězce jednotlivých solí, nejvyšší účinek byl zaznamenán u soli Hexa 70, relativní hodnota růstu se v tomto případě pohybovala pod hranicí 1,55 %. Srovnáním dvou nejvyšších aplikovaných koncentrací všech testovaných fosforečnanů s kontrolou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl růstu bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 702 ( $P \geq 0,05$ ). Výjimku tvořil fosforečnan Hexa 70 u jehož hodnot v koncentraci 0,50% (w/v) byl zaznamenán signifikantní rozdíl v růstu bez testovaných fosforečnanů a v jejich přítomnosti ( $P < 0,05$ ).



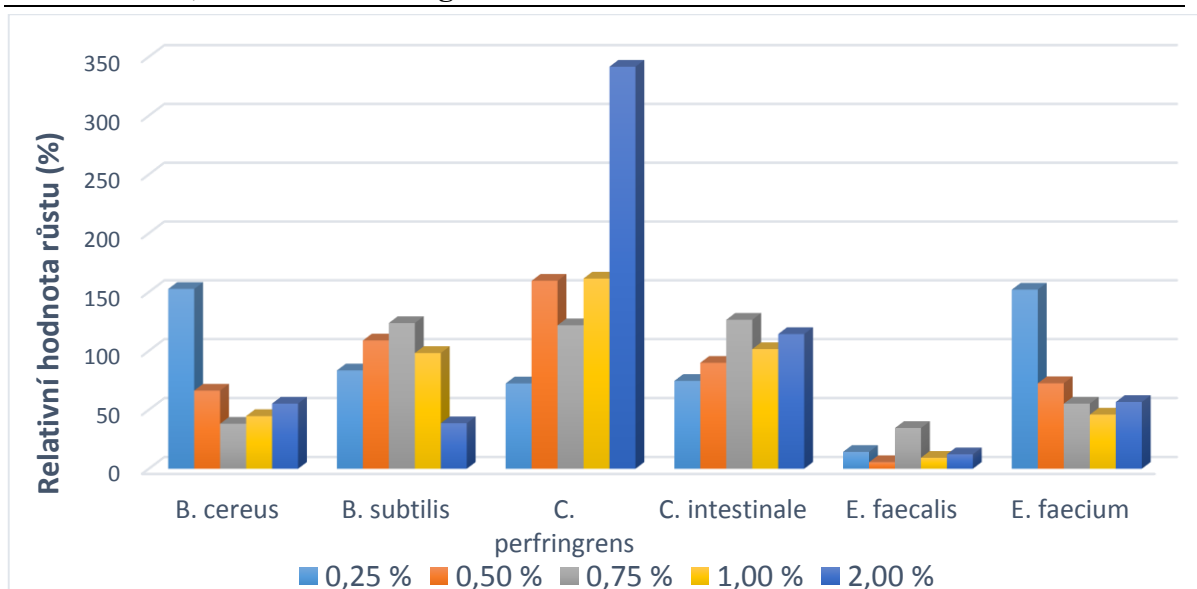
Obr. 24. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 702

Silné inhibiční působení nastalo při použití vyšších koncentrací, především 1,00 % a 2,00 % (w/v) u Hexa 62, PE, 68 i 70. U zmiňovaných fosforečnanů (Hexa 62, PE, 68 i 70) v koncentracích (1,00 % a 2,00 % w/v) byly rozdíly statisticky významné ( $P < 0,05$ ). V případě fosforečnanu Hexa 70 nastala výraznější inhibice ve srovnání s ostatními testovanými látkami ( $P \geq 0,05$ ) i u koncentrací 0,50 % a 0,75 % (w/v).

#### 6.1.20 Vliv hydrogenfosforečnanu sodného na testované grampozitivní bakterie

V grafu na Obr. 25 je uveden účinek hydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) na bakterie rodů *Bacillus*, *Clostridium* a *Enterococcus*. U všech sledovaných bakterií došlo pouze k mírnému inhibičnímu působení, inhibiční účinek se u většiny zkoumaných bakterií pohybuje kolem 100 % relativní hodnoty růstu a nebyl rozdílný oproti kontrole ( $P \geq 0,05$ ).





Obr. 25. Inhibiční účinek hydrogenfosforečnanu sodného na bakterie rodu *Bacillus*, *Clostridium* a *Enterococcus*

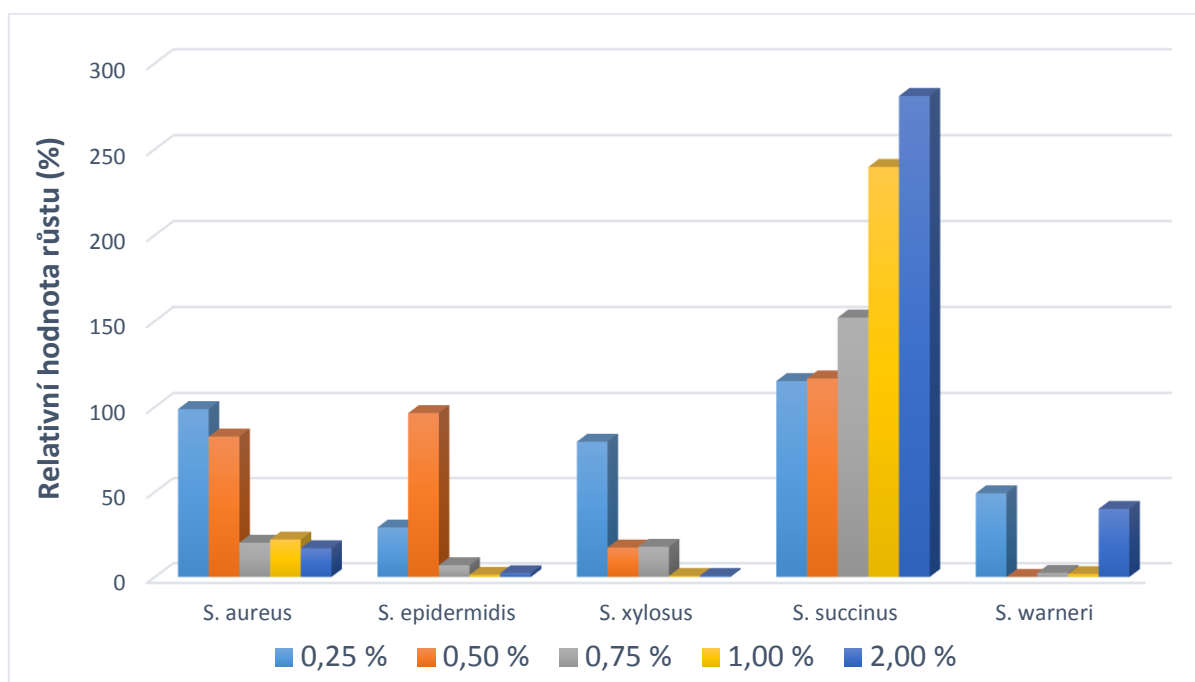
Výjimkou tvořil inhibiční na účinek bakterii *E. faecalis* CCM 2665, který byl nejsilnější při srovnání s ostatními bakteriemi uvedenými v grafu (Obr. 25). V tomto případě se relativní hodnota růstu pohybovala pod 35 % a to u všech použitých koncentrací (0,25 %, 0,50 %, 0,75 %, 1,00 % i 2,00% w/v). Nejvyšší antimikrobiální účinek byl zjištěn při aplikaci koncentrací 0,50 % a 1,00 % (w/v), u kterých se relativní hodnota růstu v obou případech pohybovala pod hranicí 10 %. Při srovnání relativních hodnot růstu bakterie *E. faecalis* CCM 2665 s kontrolou byl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) mezi kontrolou a čtyřmi testovanými koncentracemi (0,25 %, 0,50 %, 1,00 % a 2,00 % w/v).

Naopak minimální antimikrobiální působení bylo při aplikaci 2,00% (w/v) koncentrace této soli u bakterie *C. perfringens* CAPM 5744, kdy se relativní hodnota růstu pohybovala nad hodnotou 340 %. Celkově hydrogenfosforečnan sodný byl u bakterie *C. perfringens* CAPM 5744 nejméně účinný ve třech koncentracích (0,50 %, 0,75 % a 2,00 % w/v). Srovnáním bakterie *C. perfringens* CAPM 5744 s kontrolou nebyly zjištěny významnější statistické rozdíly ( $P \geq 0,05$ ) u všech testovaných koncentrací.

V případě soli hydrogenfosforečnanu sodného nelze říct, že by se zvyšoval inhibiční účinek při použití vyšších koncentrací u bakterií rodů *Bacillus*, *Clostridium* a *Enterococcus*.

V grafu na Obr. 26 byl zaznamenán účinek hydrogenfosforečnanu sodného na testované kmeny rodu *Staphylococcus*. Inhibiční účinek byl mírně větší ( $P < 0,05$ ) než v případě bakterií rodů *Bacillus*, *Clostridium* a *Enterococcus* (Obr. 25). Relativní hodnoty růstu se ve většině případů (*S. aureus* subsp. *aureus* CCM 3953, *S. epidermidis* CCM 4418 a *S. xylo-*  
*sus* DEPE26) pohybovaly pod hranicí 100 %. V případě *S. warneri* DEPE23 nebyla překročena relativní hodnota růstu 50 %. Při srovnání hodnot růstu bakterie *S. warneri* DEPE23 s kontrolou byl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) u koncentrací (0,50 %, 0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v).

Výjimku tvořila bakterie *S. succinus* DEPE18, u které byl zjištěn nejslabší antimikrobiální účinek. U této bakterie se relativní hodnota růstu u všech testovaných koncentrací (0,25 %, 0,50 %, 0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v) soli hydrogenfosforečnanu sodného pohybovaly nad 100% hodnotou relativního růstu. U koncentrace 1,00 % a 2,00 % (w/v) byl inhibiční účinek nižší než u ostatních testovaných bakterií rodu *Staphylococcus*, relativní hodnota růstu se pohybovala od 239 % po 281 %. U 1,00% koncentrace nebyl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P \geq 0,05$ ), na rozdíl od dalších testovaných koncentrací (0,25 %, 0,50 %, 0,75 %, a 2,00 % w/v), u kterých byl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ).

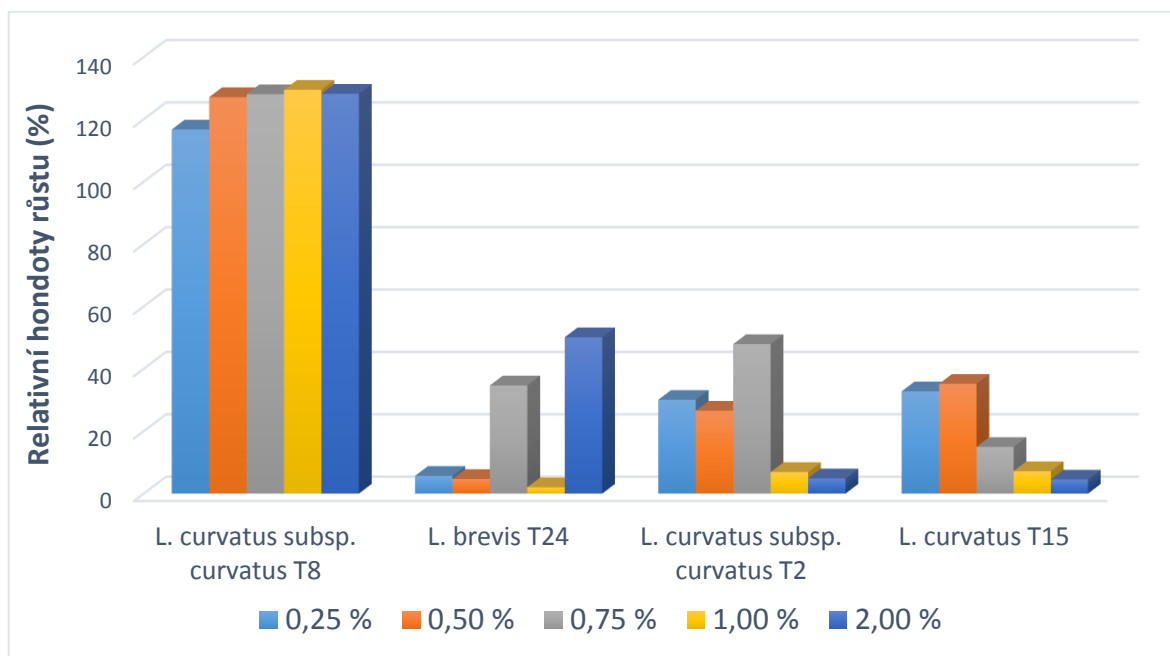


Obr. 26. Inhibiční účinek hydrogenfosforečnanu sodného na bakterie *Staphylococcus*

U bakterie *S. aureus* subsp. *aureus* CCM 3953, *S. epidermidis* CCM 4418 a *S. xylosus* DEPE26 byl viditelně silnější inhibiční účinek při použití vyšších koncentrací (0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v) hydrogenfosforečnanu sodného. Relativní hodnoty růstu se v těchto případech pohybovaly okolo 22 %. Srovnáním jednotlivých koncentrací daných bakterií s kontrolou byl zjištěn statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) u *S. epidermidis* CCM 4418 a *S. xylosus* DEPE26, v případě bakterie *S. aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 nebyl zjištěn významný rozdíl ( $P \geq 0,05$ ) u 2,00 % (w/v) koncentrace oproti kontrole.

Na Obr. 27 je uveden účinek hydrogenfosforečnanu sodného na bakterie rodu *Lactobacillus*. U těchto bakterií byl zjištěn silnější inhibiční účinek než v případě bakterií rodu *Staphylococcus*. Relativní hodnoty růstu se v tomto případě pohybovaly u většiny testovaných bakterií pod hranicí 51 %.

Výjimkou byl účinek soli hydrogenfosforečnanu sodného na bakterie *L. curvatus* subsp. *curvatus* T8. U všech testovaných koncentrací (0,25 %, 0,50 %, 0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v) došlo k výraznému snížení růstu ( $P < 0,05$ ) v přítomnosti této soli, jejíž relativní hodnoty růstu se pohybovaly okolo 120 %. U všech aplikovaných koncentracích  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  na bakterii *L. curvatus* subsp. *curvatus* T8 ve srovnání kontrolou byl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ).

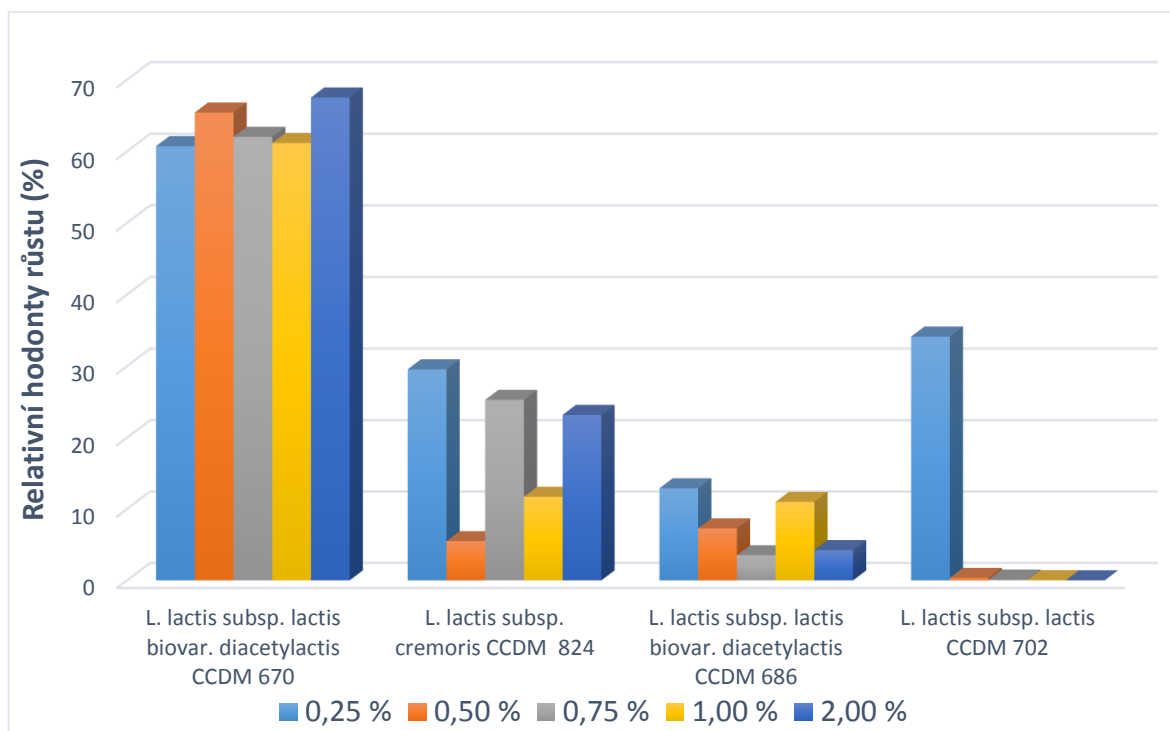


Obr. 27. Inhibiční účinek hydrogenfosforečnanu sodného na bakterie rodu *Lactobacillus*

U ostatních bakterií (*L. brevis* T24, *L. curvatus* subsp. *curvatus* T2 a *L. curvatus* T15) byl inhibiční účinek výrazně vyšší. U bakterie *L. brevis* T24 byla zjištěna silnější inhibice ( $P \geq 0,05$ ) u koncentrací 0,25 % a 0,50 % (w/v) na rozdíl od *L. curvatus* subsp. *curvatus* T2 a *L. curvatus* T15, u kterých byla zjištěn podobný účinek u koncentrací 1,00 a 2,00 % (w/v). Relativní hodnoty růstu se v těchto případech pohybovaly na hranici 7 %. U hodnot bakterie *L. curvatus* subsp. *curvatus* T2 byl oproti kontrole zjištěn významný statistický rozdíl ( $P < 0,05$ ) u koncentrací 1,00 a 2,00 % (w/v), přičemž bakterie *L. curvatus* T15 vykazovala statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) pouze u 2,00% (w/v) koncentrace na rozdíl od *L. curvatus* subsp. *curvatus* T2.

Podobně jako u bakterií rodu *Bacillus*, *Clostridium* a *Enterococcus*, nelze i v tomto případě říci, že by se při použití soli hydrogenfosforečnanu sodného zvyšoval inhibiční účinek užitím vyšších koncentrací ( $P < 0,05$ ).

V grafu na Obr. 28 jsou uvedeny testované bakterie rodu *Lactococcus* a jejich relativní hodnoty růstu při použití hydrogenfosforečnanu sodného. Z grafu je patrný inhibiční účinek na rod *Lactococcus* při srovnání relativních hodnot růstu s ostatními testovanými bakteriemi rodu *Bacillus*, *Clostridium* a *Enterococcus*, *Staphylococcus* a *Lactobacillus* (Obr. 25, 26 a 27).



Obr. 28. Inhibiční účinek hydrogenfosforečnanu sodného na bakterie rodu *Lactococcus*

Inhibiční účinek na růst u většiny sledovaných bakterií rodu *Lactococcus* (*L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 a *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702) byl patrný. Relativní hodnoty růstu se u bakterie *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 pohybovaly pod hranicí 30 %. V případě *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 byly relativní hodnoty růstu pod hranicí 13 %. U bakterie *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702 byl inhibiční účinek nejvyšší ze všech sledovaných bakterií rodu *Lactococcus* a v tomto případě se relativní hodnota růstu pohybovala pod hranicí 0,40 % u koncentrací (0,50 %, 0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v).

V případě relativních hodnot růstu *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 při srovnání s kontrolou nebyly zjištěny významné statistické rozdíly ( $P \geq 0,05$ ) u žádné z testovaných koncentrací. Naopak u relativních hodnot růstu bakterie *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 byl oproti kontrole zjištěn signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) u čtyřech testovaných koncentrací (0,50 %, 0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v). Podobné výsledky byly zjištěny i u bakterie *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702.

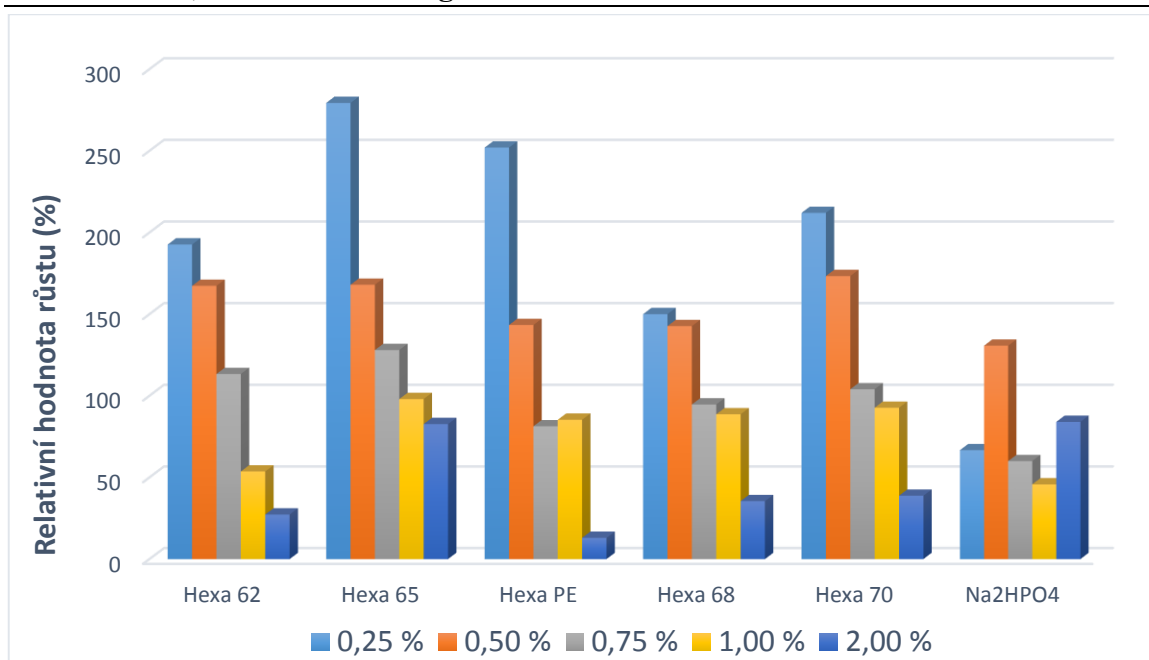
Nejmenší účinek hydrogenfosforečnanu sodného byl zjištěn u bakterie *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 670 a to u všech testovaných koncentrací, jejíž relativní hodnoty růstu se pohybovaly v rozmezí od 60 % do 68 %. Při srovnání s kontrolou nebyl zjištěn významný statistický rozdíl ( $P \geq 0,05$ ) u čtyřech testovaných koncentrací (0,25 %, 0,50 %, 1,00 % a 2,00 % w/v).

I v případě bakterií rodu *Lactococcus* nelze říci, že zvyšoval inhibiční účinek užitím vyšších koncentrací dané hydrogenfosforečnanu sodného.

#### **6.1.21 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Escherichia coli* CCM 3954**

Na Obr. 29 je zaznamenán inhibiční účinek fosforečnanových solí na první testovanou gramnegativní bakterii *Escherichia coli* CCM 3954, který byl téměř minimální, relativní hodnoty růstu se u této bakterie pohybovaly ve stovkách procent a hodnoty proto nebyly statisticky významné oproti kontrole ( $P \geq 0,05$ ). V tomto grafu jsou z tohoto důvodu uvedeny všechny testované soli, a tedy i hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), jehož účinky se pohybovaly v podobném rozmezí hodnot jako u ostatních testovaných fosforečnanových solí, zjištěné rozdíly nebyly signifikantní ( $P \geq 0,05$ ).

Inhibice nebylo dosaženo u nižších koncentrací všech testovaných solí (0,25 %, 0,50 % a 0,75 % w/v), kdy relativní hodnota přesahovala 100.



Obr. 29. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Escherichia coli* CCM 3954

U všech fosforečnanů Hexa (62, 65, PE, 68 i 70) je patrný vzrůstající účinek inhibice s rostoucí použitou koncentrací solí (od 0,75 %, případně 1,00 % po 2,00 % w/v), přesto ale tyto rozdíly nebyly statisticky významné ( $P \geq 0,05$ ). Nejvyšší inhibice byla zjištěna u soli Hexa PE ve 2,00 % (w/v) koncentraci, která dosahovala 13 % relativní hodnoty růstu. Podobného účinku bylo dosaženo i soli Hexa 62 ve stejné koncentraci (2,00 % w/v), v tomto případě se relativní hodnota pohybovala kolem 27 %. Obě tyto hodnoty (Hexa PE a Hexa 62 v koncentraci 2,00 % w/v) byly signifikantní ves srovnání s růstem bakterie v kontrolním bujónu bez přítomnosti fosforečnanů ( $P < 0,05$ ).

Hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) dosahoval poměrně vysoké účinnosti u bakterie *Escherichia coli* CCM 3954, v případě koncentrace 0,25 % w/v byla účinnost téměř o 200 % vyšší a tudíž statisticky významná ( $P < 0,05$ ), při srovnání se solí Hexa PE a Hexa 65 při použití stejné koncentrace (0,25 % w/v).

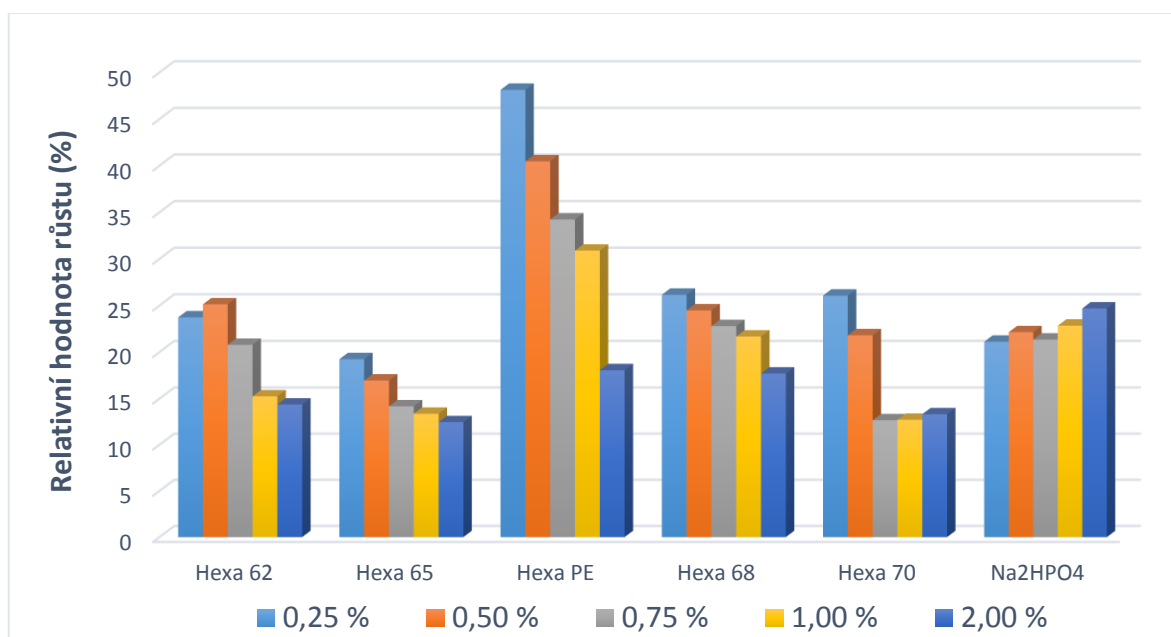
#### 6.1.22 Vliv fosforečnanových solí na bakterii *Enterobacter aerogenes* CCM 2531

V grafu (Obr. 30.) je uvedena druhá a zároveň poslední testovaná gramnegativní bakterie *Enterobacter aerogenes* CCM 2531. Relativní hodnoty růstu se u této bakterie pohybovaly v desítkách procent u všech použitých koncentrací sledovaných fosforečnanů, z tohoto

důvodu jsou všechny používané soli a tedy i hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) uvedeny v tomto grafu.

Největší inhibiční účinek se pohybuje u bakterie *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 okolo 12 % relativní hodnoty růstu, tyto hodnoty se vyskytují především při použití vyšších koncentrací solí (0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v). Celkově nejúčinnější antimikrobiální působení ( $P < 0,05$ ), jak je patrné i z grafu Obr. 30 bylo u fosforečnanu Hexa 65, jehož relativní hodnoty růstu se pohybovaly mezi 12 % až 20 %.

Nejméně účinnou solí byla naopak Hexa PE, jehož relativní hodnoty růstu byly v rozmezí 18 % až 48 %, ve srovnání s kontrolou pak byly hodnoty signifikantní ( $P < 0,05$ ).



Obr. 30. Inhibiční účinek fosforečnanů na *Enterobacter aerogenes* CCM 2531

U většiny sledovaných fosforečnanů (Hexa 65, PE a 68) je patrný zvyšující se inhibiční účinek se zvyšující se koncentrací solí. V případě Hexa 62 došlo ke změně tohoto trendu u koncentrace 0,50 % (w/v), která byla o necelé 2 % relativní hodnoty růstu méně účinná než koncentrace 0,25 % (w/v). K podobné situaci došlo i u Hexa 70, kdy koncentrace 2,00 % (w/v) byla méně účinná než dvě předcházející koncentrace (0,75 % a 1,00 % w/v). Při srovnání inhibičních účinků Hexa 62 a 70 bylo z výsledků zjištěno, že u žádné z testovaných koncentrací nebyl signifikantní rozdíl v působení jednotlivých koncentrací na růst *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 ( $P \geq 0,05$ ).

Bakterie *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 nebyla výrazně citlivá vůči inhibičnímu působení  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Relativní hodnoty růstu se u této soli pohybovaly v rozmezí od 21 % po 24 %. Mezi působením koncentrací 0,25 % a 0,75 % (w/v) nebyl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P \geq 0,05$ ), na rozdíl od účinku koncentrací 0,50 %, 1,00 % a 2,00 % (w/v).

## 6.2 Souhrnná diskuze

Potravinářské fosforečnany jsou široce využívány v potravinách z mnoha důvodů. Ať už k úpravě pH (jako kyseliny či zásady), pufrů, díky vaznosti minerálních látek, či jejich doplnění, jako podpora či inhibice koagulace, jako disperzní přísady či jako inhibitory spékání. Příмым přínosem je poskytnutí antioxidační aktivity, zahuštění a tvorba gelu u mléčných výrobků, při emulgaci masa a sýrů, pro ochranu barvy, kvůli zvýšení vaznosti vody a pro chemické kynutí. [2,13]

Potraviny, do kterých se přidávají fosforečnany, jsou nejčastěji maso, drůbež, mořské ryby, mléčné výrobky, pečivo, ovoce, zelenina, cukr, oleje, cukrovinky a nápoje. [2]

Použití fosforečnanů je upraveno a omezeno legislativně, podobně jako u ostatních přídatných látek používaných v potravinářství, vyhláškou Ministerstva zdravotnictví č. 4/2008 Sb., kterou se stanovují druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. [48]

Cílem této diplomové práce bylo zkoumání inhibičního účinku vybraných fosforečnanů na růst potravinářsky významných bakterií. K tomuto účelu bylo použito 21 kmenů bakterií, z nichž 2 kmeny patří mezi gramnegativní bakterie (rod *Escherichia* a *Enterobacter*) a 19 kmenů grampozitivních (rod *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Lactobacillus*). Výběr bakterií zahrnoval, jak bakterie, které mohou být součástí z potravin, protože se využívají během technologie jejich výroby, dále bakterie odolnější vůči vlivům vnějšího prostředí, tak i kontaminující bakterie včetně bakterií tvořících spory.

Ke zkoumání inhibičních účinků byly použity sodné soli fosforečnanů, které byly poskytnuty firmou Fosfa a.s., Břeclav-Poštorná. Za tímto účelem byly použity fosforečnanové soli s různou střední délkou řetězce, kdy se jmenovitě jednalo o Hexa 62  $\approx$  5, Hexa 65  $\approx$  9, Hexa PE  $\approx$  13, Hexa 68  $\approx$  20, Hexa 70  $\approx$  28 a hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Všechny uvedené soli byly aplikovány v 5 koncentracích (0,25 %; 0,50 %; 0,75 %; 1,00 % a 2,00 % w/v) u celého testovaného souboru bakterií.



Z výsledků experimentů je patrné, že u gramnegativních bakterií nebyl zjištěn výraznější inhibiční účinek vybraných fosforečnanů na jejich růstu. U první sledované gramnegativní bakterie *Escherichia coli* byl antimikrobiální účinek téměř minimální nebo žádný, relativní hodnoty růstu u této bakterie se pohybovaly ve stovkách procent. U všech polyfosforečnanů Hexa (62, 65, PE, 68 i 70) byl patrný vzrůstající účinek inhibice s rostoucí použitou koncentrací solí (od 0,25 % po 2,00 % w/v). Nejvyšší inhibice byla zjištěna u soli Hexa PE u koncentrace 2,00 % w/v, u které relativní hodnota růstu dosahovala 13 %.

Druhou a poslední testovanou gramnegativní bakterií na inhibiční působení fosforečnanových solí byl *Enterobacter aerogenes*. Inhibiční účinek fosforečnanů byl mírně silnější než u předešlé gramnegativní bakterie *Escherichia coli*. Antimikrobiální účinek byl zjištěn především při použití vyšších koncentrací solí (0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v). Celkově neúčinnější antimikrobiální působení bylo u fosforečnanu Hexa 65, jehož relativní hodnoty růstu se pohybovaly mezi 12 % až 20 %. Nejméně účinnou solí byl naopak Hexa PE, jehož relativní hodnoty růstu byly v rozmezí 18 % až 48 %. U většiny sledovaných fosforečnanů (Hexa 65, PE a 68) je patrný zvyšující se inhibiční účinek se zvyšující se koncentrací solí.

K podobným výsledkům dospěl i výzkum Buňkové a kol. [49], kde bylo zjištěno, že většina sledovaných gramnegativních bakterií významněji reagovala na přítomnost těchto solí až při nejvyšších zkoumaných koncentracích (1 - 2%). Lorencová a kol. [50] ve svém výzkumu upozorňuje i na to, že antibakteriální aktivita v případě gramnegativních bakterií byla více ovlivněna hodnotami pH kultivačního média (ovlivněna přidáním fosforečnanových solí), než v případě, grampozitivních bakterií. Inhibiční účinek u gramnegativních bakterií bývá popisován pouze zřídka. [49,50]

Grampozitivní bakterie, jsou více náchylné k působení fosforečnanů než gramnegativní bakterie. U fosforečnanů je schopnost chelatace kovových iontů zodpovědná za jejich antimikrobiální účinek. Fosforečnany pravděpodobně inhibují grampozitivní bakterie a plísně odstraněním podstatných kationtů z buněčné stěny. Dvojmocné kationy mohou naopak zvrátit inhibici fosforečnanů. Inhibice se také snižuje při snížení pH v důsledku protonace chelato-tvorných míst. U ortofosforečnanů, mezi které se řadí i hydrogenfosforečnan sodný, bylo zjištěno, že nemají chelatační schopnosti a tudíž ani výraznější inhibiční účinky. [51]

Z grampozitivních bakterií byly testovány bakterie rodu *Bacillus*, u obou tetovaných bakterií (*B. cereus* CCM 2010 a *B. subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062) došlo k výrazné inhibici růstu v přítomnosti polyfosforečnanů. Inhibiční působení bylo především patrné při použití vyšších koncentrací jednotlivých fosforečnanů. U *B. subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062 byl viditelný zvyšující se účinek fosforečnanů s delší střední délkou řetězce, především se pak tento účinek projevil u fosforečnanů Hexa 68 a 70. K podobnému závěru dospěla i Lorencová a kol. [50]. S větší délkou řetězce dochází k silnějšímu uvolňování kationtů kovů, čímž dochází k narušení buněčné stěny a membrán. Tímto mechanismem tedy dochází ke zvýšení inhibičních účinků fosforečnanů. [13,50]

Během výzkumu Maier a kol. [52] bylo zjištěno, že účinek fosforečnanů s dlouhým řetězcem je nejen dostatečný k inhibici vegetativních buněk *Bacillus cereus*, ale i k inhibici jejich spor a to již v koncentracích 0,05 % a 0,1 % (w/v). Při užití vyšších koncentrací (1,0 %) byl dokonce účinek sporocidní. [52]

Z testovaných bakterií rodu *Clostridium*, byl nejvýraznější inhibiční účinek zaznamenán u *C. perfringens* CAPM 5744 při použití soli Hexa 70 v koncentraci 2,00 % (w/v). Dále pak vzrůstající koncentrace solí pozitivně působila na zvyšující se inhibiční účinek solí u Hexa 62, 68 i 70. V případě bakterie *C. intestinale* CAPM 6397 byl zaznamenán u všech sledovaných solí zvyšující se inhibiční účinek, a tím pádem i klesající relativní hodnoty růstu se stoupající koncentrací dané soli (od 0,25 % po 2,00 % w/v). Nejnižší inhibice byla zjištěna u obou bakterií při použití nejnižší koncentrace (0,25 % w/v). Podobné výsledky byly prezentovány i Krpalovou [53]. Bylo rovněž zjištěno, že fosforečnany jsou účinným inhibičním agens vůči mikroorganismům podílejícím se na kažení mléčných potravin, zejména pak roztíratelných sýrových výrobků. Přídavek fosforečnanů do těchto výrobků může zpomalit nebo zabránit růstu nežádoucích sporulujících bakterií. [54]

Nejnižší inhibiční účinek na testované grampozitivní bakterie byl zjištěn u dvou testovaných bakterií rodu *Enterococcus*, jmenovitě se jednalo o bakterie *E. faecalis* CCM 2665 a *E. faecium* CCDM 816. Nejmenší inhibiční vliv na růst bakterie rodu *Enterococcus* byl zjištěn při použití nízkých koncentrací, nejčastěji u koncentrací 0,25 % a 0,50 % (w/v). Tuto nízkou inhibici růstu bylo možné pozorovat u všech použitých solí. Naopak největší vliv na relativní hodnotu růstu enterokoků měla nejvyšší použitá koncentrace (2,00 % w/v), kdy toto působení bylo prokázáno u všech sledovaných fosforečnanů (Hexa 62, 65, PE, 68 i 70). Výraznou inhibici růstu bakterie *E. faecalis* zaznamenala i Krpalová [53] při použití

fosforečnanů ve 2,00 % (w/v) koncentraci. Nízkou citlivost bakterie *E. faecalis* vůči fosforečnanům byla zjištěna i Lorencovou a kol. [50] na většinu testovaných fosforečnanů (zahrnujících i soli Hexa 68 a Hexa 70, které byly rovněž testovány v této diplomové práci). Výjimkou byla pouze sůl TSP (fosforečnan sodný), která zásadně zvýšila pH (pH 11,18-11,27) a u které byl prokázán inhibiční účinek u 1,00% koncentrace. [50]

Inhibiční účinek fosforečnanů byl nejvýznamnější u bakterie *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 ze všech sledovaných bakterií rodu *Staphylococcus*. Především byl znatelný inhibiční účinek u fosforečnanů užitých ve vyšších koncentracích, jednalo se především o koncentrace 1,00 % a 2,00 % (w/v). Největší inhibice u bakterie *S. aureus* subsp. *aureus* CCM 3953, tedy 0,064 % relativní hodnoty růstu se projevila u soli Hexa 62 v koncentraci 1,00 % (w/v). Nejnižší účinek byl, zaznamenám u soli Hexa 68 a to v obou nejnižších koncentracích, jejichž hodnoty se pohybovaly nad 0,23 % relativní hodnoty růstu. Fosforečnan Hexa 70 v koncentracích 0,25 % až 1,00 % (w/v) měl menší inhibiční účinky, oproti dalším solím ve stejné koncentraci, což potvrzují i práce Krpalové [53] a Lorencové [50] u kterých fosforečnan Hexa 70 nevykazoval výraznější inhibiční účinek. Vysvětlením tohoto zjištění může být fakt, že není známo přesné složení fosforečnanů Hexa 68 a 70 (jestli nejsou v jednotlivých fosforečnanech příměsi dalších solí a jejich přesná délka), z tohoto důvodu je možné, že Hexa 68 měla vyšší stupeň kondenzace než Hexa 70. [53,55,56]

Z rodu *Staphylococcus* byly dále testovány bakterie *S. epidermidis* CCM 4418, *S. xylosus* DEPE26, *S. succinus* DEPE18 a *S. warneri* DEPE23. Minimální antimikrobiální účinek byl zaznamenán *S. epidermidis* CCM 4418, *S. xylosus* DEPE26, *S. succinus* DEPE18 při užití nízkých koncentrací fosforečnanů a to především při použití prvních dvou aplikovaných koncentrací (0,25 % a 0,50 % w/v). V případě bakterie *S. warneri* DEPE23 byl nejnižší inhibiční účinek při použití nižších koncentrací solí, nejčastěji pak 0,25 %, 0,50 % a 0,75 % (w/v) u fosforečnanů Hexa 62 a 65. Naopak výrazná inhibice růstu byla u všech zmiňovaných bakterií rodu *Staphylococcus* (*S. epidermidis* CCM 4418, *S. xylosus* DEPE26, *S. succinus* DEPE18 a *S. warneri* DEPE23) zjištěna při použití vyšších koncentrací solí (0,75 %, 1,00 % i 2,00 % w/v), především pak u fosforečnanů s delší střední délkou řetězce (Hexa PE, 68 a 70). Lze tedy říci, že s větší střední délkou řetězce fosforečnanů dochází k silnějšímu uvolňování kationtů kovů, čímž dochází k narušení buněčné stěny a membrán, což vede k větší inhibici bakterií rodu *Staphylococcus*. [13]

Z bakterií mléčného kvašení byly sledovány dva rody *Lactobacillus* a *Lactococcus*. Mezi testované bakterie z rodu *Lactobacillus* na inhibiční působení fosforečnanů byly zařazeny *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T8, *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T2, *Lb. curvatus* T15 a *Lb. brevis* T24. U všech těchto bakterií byl zjištěn zvyšující se inhibiční účinek při použití vyšších koncentrací (0,50 %, 0,75 %, 1,00 % a 2,00 % w/v) solí. Inhibiční účinek byl především patrný u fosforečnanů s delší střední délkou řetězce (Hexa PE, 68 a 70). Tento trend byl sledován u bakterií *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T8, *Lb. curvatus* T15 a *Lb. brevis* T24. V případě *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* T2 byl zjištěn inhibiční účinek u všech testovaných fosforečnanů v daných koncentracích (0,50 %, 2,00 % w/v). U všech bakterií rodu *Lactobacillus* byl nejmenší inhibiční účinek zjištěn u nejnižších používaných koncentrací (0,25 % a 0,50 % w/v), které se tímto způsobem projeví u všech sledovaných fosforečnanů (Hexa 62, 65, PE, 68 i 70).

V případě *Lb. brevis* byl podobný výsledek zjištěn i ve výzkumu Krpalové [53], kdy silně inhibičním účinkem na *Lb. brevis* působily fosforečnany i kratší střední délkou řetězce (Hexa 62 a 65) při použití 2,00 % (w/v) koncentrace. [53]

Z rodu *Lactococcus* byly testovány následující bakterie *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* CCDM 670, *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* CCDM 686 a *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702. U všech testovaných bakterií tohoto rodu byl zjištěn silný antimikrobiální účinek na jejich růst při použití vyšších koncentrací solí, jmenovitě se jednalo o koncentrace 1,00 % a 2,00 % (w/v). U bakterií *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* CCDM 670, *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702 byl tento účinek zjištěn u všech použitých fosforečnanů. Výjimka byla zjištěna u bakterie *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* CCDM 686 u fosforečnanu Hexa 70, který byl nejméně účinný při srovnání s dalšími solemi, přesto je u něj patrný zvyšující se účinek při použití vyšších koncentrací. Nejnižší inhibiční účinek byl zjištěn, pokud byly aplikovány koncentrace 0,25 % a 0,50 % (w/v) u všech použitých fosforečnanů, tento trend byl patrný u všech sledovaných bakterií rodu *Lactococcus*.

Obecně lze říci, že u bakterií mléčného kvašení byl zjištěn vyšší inhibiční účinek při použití vyšších koncentrací jednotlivých fosforečnanů a že s větší střední délkou řetězce jednotlivých fosforečnanů (především pak Hexa PE, 68 a 70) dochází ke zvýšení inhibičních účinků fosforečnanů. [13]

Inhibiční účinek hydrogenfosforečnanu sodného byl sledován u všech testovaných gram-negativních i grampozitivních bakterií. Ze zjištěných výsledků vyplynulo, že antimikrobiální účinek byl u 13 grampozitivních bakterií minimální při srovnání s polyfosforečnanem (Hexa). Jmenovitě se jednalo o bakterie řazené do rodů *Bacillus*, *Clostridium* a *Lactobacillus*, dále *S. aureus* subsp. *aureus* CCM 3953, *S. succinus* DEPE18 a většina bakterií rodu *Lactococcus* (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 670, *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686). Tyto výsledky jsou v souladu s informací, že u ortofosforečnanů, mezi které se řadí i hydrogenfosforečnan sodný, bylo zjištěno, že nemají chelatační schopnosti a tudíž ani významný inhibiční účinek. Ve výzkumu Buňkové a kol [49] bylo potvrzeno, že ortofosforečnan a difosforečnan neměly významný inhibiční účinek na testované bakterie při neutrálním pH. [49,51]

U zbývajících 6 grampozitivních bakterií se inhibiční účinek hydrogenfosforečnanu sodného pohyboval v podobných hodnotách relativního růstu jako u polyfosforečnanů Hexa a nelze říci, že by inhibiční účinek hydrogenfosforečnanu sodného byl výrazněji nižší než u ostatních fosforečnanů (Hexa). Jmenovitě se jednalo o obě bakterie rodu *Enterococcus*, *S. epidermidis* CCM 4418, *S. xylosus* DEPE26, *S. warneri* DEPE23 a *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 702. U těchto bakterií mohla být hlavním inhibičním vlivem změna pH z neutrálních hodnot na alkalické, čímž mohly být ovlivněny inhibiční účinky hydrogenfosforečnanu sodného na výše uvedené bakterie. V případě ortofosforečnanů byla zjištěna tato změna pH ve výzkumu Buňkové a kol. [49], kdy byly zkoumány účinky solí Didi a Triskristal orthofosforečnan, během níž bylo zjištěno, že neutrální či mírně zásadité pH (okolo pH 7,5) nepodpoří tolik komplexotvornou schopnost fosforečnanů jako silně alkalické prostředí a inhibiční efekt daného fosforečnanu. [49]

## ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na sledování inhibičních účinků šesti fosforečnanových solí v různém kondenzačním stupni (střední délkou řetězce 5 - 28) na vybrané grampozitivní a gramnegativní bakterie. Fosforečnany, které byly pro měření v praktické části vybrány a užity byly Hexa 62  $\approx$  5, Hexa 65  $\approx$  9, Hexa PE  $\approx$  13, Hexa 68  $\approx$  20, Hexa 70  $\approx$  28 a hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Tyto fosforečnany se využívají díky emulgačním vlastnostem, za účelem úpravy pH a popřípadě díky svým antimikrobiálním účinkům.

Na základě výsledků této práce lze konstatovat následující fakta:

- Inhibiční účinek fosforečnanů na růst gramnegativních bakterií byl nevýznamný při srovnání s inhibičním účinkem na grampozitivní bakterie,
- Nejvíce citlivé na inhibiční působení polyfosforečnanů byly bakterie rodu *Bacillus*, respektive *B. subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062. Výjimku tvořil přídavek sodného fosforečnanu  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,
- Nejméně citlivé grampozitivní bakterie na inhibiční účinek fosforečnanů byly bakterie rodu *Enterococcus*, především pak *E. faecium* CCDM 816,
- Nejvyšší inhibiční účinek polyfosforečnanů na růst grampozitivních bakterií byl zjištěn především u Hexa PE, 68 a 70, tedy fosforečnanů s delší střední délkou řetězce,
- Inhibiční účinek se zvyšoval při použití vyšších koncentrací jednotlivých fosforečnanů, nejčastěji při použití 1,00% a 2,00% koncentrace.
- Inhibiční účinek hydrogenfosforečnanu sodného byl při srovnání s ostatními fosforečnany zcela minimální.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2012, 569 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.
- [2] BRANEN, Alfred Larry. *Food additives*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, 2002, xv, 938 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 116. ISBN 08-247-9343-9.
- [3] RADKOWSKI, M. *The Effect of Polyphosphates on Streptococci Isolated from Mastitis Cases*. Polish Journal of Veterinary Sciences. 2006, no. 2, s. 135-138
- [4] SUÁREZ, V.B., M. CARRASCO, A. SIMONETTA, M. RIVERA a J.A. REINHEIMER. *Phosphates as inhibitors of yeasts isolated from food sources*. Italian journal of food science: IJFS = Rivista italiana di scienza degli alimenti. Torino, 2007, s. 255-262. 19, 3. ISSN 1120-1770.
- [5] JENSEN, W. K., C. DEVINE a M. DIKEMAN. *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford [England]: Elsevier, 2004, 3 v. (xxxv, 1473 p.). ISBN 012464970X3.
- [6] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009, xx, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [7] SPAINHOUR, C.B. *Phosphoric Acid*. Encyclopedia of Toxicology. Elsevier, 2014, č. 3, s. 916. DOI: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00904-0. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864543009040>
- [8] WANG, Dongfeng. *Food chemistry*. Hauppauge, N.Y.: Nova Science Publishers, c2011, xii, 370 p. ISBN 978-161-9421-257.
- [9] GILMOUR, Rodney. *Phosphoric acid: purification, uses, technology, and economics*. Boca Raton: CRC Press, 2013-12-12, xix, 334 pages. ISBN 978-1-4398-9510-8.
- [10] GREENWOOD, N a A EARNSHAW. *Chemistry of the elements*. 2nd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, c1997, xxii, 1341 s. ISBN 07-506-3365-4.
- [11] Ritz E, Hahn K, Ketteler M, Kuhlmann MK, Mann J: *Phosphate additives in food-a health risk*. Dtsch Arztebl Int 2012; 109(4): 49–55. DOI: 10.3238/arztebl.2012.0049

- [12] CALVO, M. S. a J. URIBARRI. *Public health impact of dietary phosphorus excess on bone and cardiovascular health in the general population*. American Journal of Clinical Nutrition [online]. 2013-06-20, vol. 98, issue 1, s. 6-15 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.3945/ajcn.112.053934. Dostupné z: <http://ajcn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/ajcn.112.053934>
- [13] MOLINS, Ricardo A. *Phosphates in food*. Boca Raton: CRC Press, c1991, 261 p. ISBN 08-493-4588-X.
- [14] ADAMS, M a M MOSS. *Food microbiology*. 3rd ed. Cambridge, UK: RSC Publishing, c2008, xiv, 463 p. ISBN 08-540-4284-9
- [15] MODI, H.A. *Microbial spoilage of foods*. Jaipur, India: Aavishkar Publishers, Distributors, 2009. ISBN 978-817-9102-855
- [16] GRAM, Lone. *Microbial Food Spoilage*. Handbook of Food Science, Technology, and Engineering. 2005, č. 4. DOI: 10.1201/b15995-56. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b15995-56>
- [17] GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.
- [18] BAPTISTA, Inês, Rui P. QUEIRÓS, Ângela CUNHA, Sílvia M. ROCHA, Jorge A. SARAIVA a Adelaide ALMEIDA. *Evaluation of resistance development and viability recovery by toxigenic and non-toxigenic Staphylococcus aureus strains after repeated cycles of high hydrostatic pressure*. Food Microbiology [online]. 2015, vol. 46, s. 515-520 [cit. 2015-02-05]. DOI: 10.1016/j.fm.2014.09.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002014002469>
- [19] MORONI, Paolo, Giuliano PISONI, Paola CREMONESI a Bianca CASTIGLIONI. *Staphylococcus. Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens*. CRC Press, 2011-04-18, s. 307-322. DOI: 10.1201/b10848-31. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b10848-31>
- [20] ZELL, Christiane, Marion RESCH, Ralf ROSENSTEIN, Till ALBRECHT, Christian HERTEL a Friedrich GÖTZ. *Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures*. *International*



- Journal of Food Microbiology*. 2008, vol. 127, issue 3, s. 246-251. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160508003954>.
- [21] PLANCHON, S, B GAILLARDMARTINIE, E DORDETFRISONI, M BELLONFONTAINE, S LEROY, J LABADIE, M HEBRAUD a R TALON. *Formation of biofilm by Staphylococcus xylosus*. *International Journal of Food Microbiology*. 2006-05-25, vol. 109, 1-2, s. 88-96. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160506000675>
- [22] MOROT-BIZOT, Stephanie, Régine TALON a Sabine LEROY-SETRIN. *Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of Staphylococcus xylosus, a species used in food fermentation*. *Journal of Microbiological Methods*. 2003, vol. 55, issue 1, s. 279-286. DOI: 10.1016/S0167-7012(03)00159-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701203001593>
- [23] LIU, Dongyou. *Molecular detection of human bacterial pathogens*. Boca Raton, FL: Taylor, c2011, xxvii, 1251 p. ISBN 978-143-9812-389.
- [24] PHROMRAKSA, Panthitra, Hiroko NAGANO, Yoshihiro KANAMARU, Hidehiko IZUMI, Chikako YAMADA a Chirasak KHAMBOONRUANG. *Characterization of Bacillus Subtilis Isolated from Asian Fermented Foods*. *Food Science and Technology Research*. 2009, vol. 15, issue 6, s. 659-666. DOI: 10.3136/fstr.15.659.
- [25] ESAWY, Mona A., Eman F. AHMED, Wafaa A. HELMY, Nahla M. MANSOUR, Waled M. EL-SENOUSY a Mounir M. EL-SAFETY. *Production of levansucrase from novel honey Bacillus subtilis isolates capable of producing antiviral levans*. *Carbohydrate Polymers*. 2011, vol. 86, issue 2, s. 823-830. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.05.035. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861711004152>
- [26] LINDSTRÖM, Miia a Hannu KORKEALA. *Food-borne Pathogenic Clostridia*. *Food Associated Pathogens*. CRC Press, 2013-10-02, s. 67-87. DOI: 10.1201/b15475-7. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b15475-7>

- [27] ARAS, Zeki a Hasan Hüseyin HADIMLI. *Detection and molecular typing of Clostridium perfringens isolates from beef, chicken and turkey meats*. *Anaerobe*. 2015, vol. 32, s. 15-17. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2014.11.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996414001565>
- [28] AXELSSON, Lars. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, c2012, s. 1–16. ISBN 978-1-4398-3677-4.
- [29] VON WRIGHT, Atte. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, c2012, s. 63 - 67. ISBN 978-1-4398-3677-4.
- [30] FUGELSANG, K a Charles G EDWARDS. *Wine microbiology*. 2nd ed. /. New York, NY: Springer, c2007, xx, 393 p. ISBN 03-873-3349-5.
- [31] HEBERT, E. M., L. SAAVEDRA, M. P. TARANTO, F. MOZZI, C. MAGNI, M. E. F. NADER, G. FONT DE VALDEZ, F. SESMA, G. VIGNOLO a R. R. RAYA. *Genome Sequence of the Bacteriocin-Producing Lactobacillus curvatus Strain CRL705*. *Journal of Bacteriology*. 2011-12-29, vol. 194, issue 2, s. 538-539. DOI: 10.1128/JB.06416-11. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.06416-11>.
- [32] VISESSANGUAN, Wonnop, Soottawat BENJAKUL, Thitapha SMITINONT, Chonticha KITTIKUN, Preenapha THEPKASIKUL a Atikorn PANYA. *Changes in microbiological, biochemical and physico-chemical properties of Nham inoculated with different inoculum levels of Lactobacillus curvatus*. *LWT - Food Science and Technology*. 2006, vol. 39, issue 7, s. 814-826. DOI: 10.1016/j.lwt.2005.05.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643805001106>.
- [33] CHUNG, H.-J. a A.E. YOUSEF. *Lactobacillus curvatus produces a bacteriocin-like agent active against gram-negative pathogenic bacteria*. *Journal of Food Safety*. 2005, vol. 25, issue 2, s. 59-79. DOI: 10.1111/j.1745-4565.2005.00557.x.
- [34] MAKAROVA, K., A. SLESAREV, Y. WOLF a A. SOROKIN. *Comparative genomics of the lactic acid bacteria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006-10-17, vol. 103, issue 42, s. 15611-15616. DOI: 10.1073/pnas.0607117103. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0607117103>

- [35] SAKAMOTO, Kanta. *Beer spoilage bacteria and hop resistance in Lactobacillus brevis*. Ridderkerk, 2002. ISBN 90-367-1689-6.
- [36] KAGKLI, Dafni Maria, Marc VANCANNEYT, Colin HILL, Peter VANDAMME a Timothy M. COGAN. *Enterococcus and Lactobacillus contamination of raw milk in a farm dairy environment*. International Journal of Food Microbiology. 2007, vol. 114, issue 2, s. 243-251. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160506005186>.
- [37] VAN TYNE, Daria, Melissa MARTIN a Michael GILMORE. Structure, Function, and Biology of the Enterococcus faecalis Cytolysin. Toxins. 2013, vol. 5, issue 5, s. 895-911. DOI: 10.3390/toxins5050895. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6651/5/5/895/>
- [38] FRANZ, C. *Enterococci in foods—a conundrum for food safety*. International Journal of Food Microbiology. 2003-12-01, vol. 88, 2-3, s. 105-122. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00174-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503001740>
- [39] HUYCKE, Mark. *Multiple-Drug Resistant Enterococci: The Nature of the Problem and an Agenda for the Future*. Emerging Infectious Diseases. 1998, vol. 4, issue 2, s. 239-249. DOI: 10.3201/eid0402.980211.
- [40] VAN WAMEL, W. J. B., A. P. A. HENDRICKX, M. J. M. BONTEN, J. TOP, G. POSTHUMA a R. J. L. WILLEMS. *Growth Condition-Dependent Esp Expression by Enterococcus faecium Affects Initial Adherence and Biofilm Formation*. Infection and Immunity. 2007-01-22, vol. 75, issue 2, s. 924-931. DOI: 10.1128/IAI.00941-06. Dostupné z: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.00941-06>
- [41] MURRAY, Barbara. *Diversity among Multidrug-Resistant Enterococci*. Emerging Infectious Diseases. 1998, vol. 4, issue 1, s. 37-47. DOI: 10.3201/eid0401.980106.
- [42] GILMORE, Michael S. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Washington, D.C.: ASM Press, c2002, x, 439 p. ISBN 15-558-1234-1.
- [43] SHAW, Angela Laury, Amanda SVOBODA, Beatrice JIE, Gail NONNECKE a Aubrey MENDONCA. *Survival of Escherichia coli on strawberries grown under*

- greenhouse conditions*. Food Microbiology. 2015, vol. 46, s. 200-203. DOI: 10.1016/j.fm.2014.06.027. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002014001658>
- [44] ESAMEILI, Hossein, Ali KHANJARI a Fatemeh GHOLAMI. *Detection and characterization of Escherichia coli O157: H7 from feral pigeon in Qom province, Iran*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2015, vol. 5, issue 2, s. 116-118. DOI: 10.1016/S2222-1808(14)60637-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S222218081460637X>
- [45] TAJIMA, Yoshinori, Kenichi KAIDA, Atsushi HAYAKAWA, Keita FUKUI, Yousuke NISHIO, Kenichi HASHIGUCHI, Ryosuke FUDOU, Kazuhiko MATSUI, Yoshihiro USUDA a Koji SODE. *Study of the role of anaerobic metabolism in succinate production by Enterobacter aerogenes*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2014, vol. 98, issue 18, s. 7803-7813. DOI: 10.1007/s00253-014-5884-3. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-014-5884-3>
- [46] LEDERBERG, Joshua. Encyclopedia of microbiology. 2nd ed. San Diego: Academic Press, c2000-, 4 v. ISBN 01222680404-.
- [47] ELGENDY, Noha, Hossam IBRAHIM, Nahla ALSHABASY a And SAMAHA. *Enterobacteriaceae In Beef Products(Luncheon,Pasterma,Frankfurter And Minced meat)From Alexandria Retail Outlets*. Alexandria Journal of Veterinary Sciences. 2014, vol. 41, s. 80-86. DOI: 10.5455/ajvs.151171. Dostupné z: <http://www.scopemed.org/?mno=151171>
- [48] Vyhláška č. 4/2008 Sb. 2008., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. In: Sbíрка zákonů. 03.01.2008
- [49] BUŇKOVÁ, Leona, Eva LORENCOVÁ, Dora JURČOVÁ, František BUŇKA a Stanislav KRÁČMAR. *Effect of sodium phosphates on selected food grade bacteria*. Potravinářstvo. 2011-04-01, vol. 5, issue 2, s. -. DOI: 10.5219/141. Dostupné z: <http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/view/141>
- [50] LORENCOVÁ, Eva, Pavlína VLTAVSKÁ, Pavel BUDINSKÝ a Marek KOUTNÝ. *Antibacterial effect of phosphates and polyphosphates with different*

- chain length*. Journal of Environmental Science and Health, Part A. 2012, vol. 47, issue 14, s. 2241-2245. DOI: 10.1080/10934529.2012.707544. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10934529.2012.707544>
- [51] MONTVILLE, Thomas J, Karl R MATTHEWS a Kalmia E KNIEL. *Food microbiology: an introduction*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, c2012, p. ISBN 9781555817206-..
- [52] 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.
- [53] KRPALOVÁ, I., *Inhibiční účinky polyfosforečnanů na vybrané kmeny mikroorganismů*. Zlín, 2014. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.
- [54] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., DOLEŽÁLKOVÁ, I. *Faktory ovlivňující mikroflóru tavených sýrů*. *Mlékařské listy*, 121:VIII-XII. 2010.
- [55] MATSUOKA, A., TSUTSUMI, M., WATANABE, F., *Inhibitory Effect of Hexameta-phosphate on the Growth of Staphylococcus aureus*, *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 1995, no. 5, 588-594 s.
- [56] LORENCOVÁ, E., *Vliv fosforečnanů a růst vybraných potravinářsky významných bakterií*. Zlín, 2010. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

USDA	United States Department of Agriculture
E 338	Kyselina fosforečná
E 339	Fosforečnan sodný
E 340	Fosforečnan draselný
E 341	Fosforečnan vápenatý
E 342	Fosforečnan amonný
E 343	Fosforečnan hořčnatý
E 450	Difosforečnan
E 451	Trifosforečnan
E 452	Polyfosforečnan
MCP	Dihydrogenfosforečnan
CCDM	Cultures Collection of Dairy Microorganisms
CCM	Czech Collection of Microorganisms
CAPM	Collection of Animal Pathogenic Microorganisms

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1. Struktura kyseliny fosforečné [7] .....	19
Obr. 2. Struktura fosforečnanu sodného [9] .....	20
Obr. 3. Struktura fosforečnanu draselného [8] .....	21
Obr. 4. Struktura fosforečnanu vápenatého [10].....	21
Obr. 5. Chemická rovnice trifosforečnanu sodného [10].....	22
Obr. 6. Inhibiční účinek fosforečnanů na bakterii <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010.....	51
Obr. 7. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> CCM 4062 .....	52
Obr. 8. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Clostridium perfringens</i> CAPM 5744.....	53
Obr. 9. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Clostridium intestinale</i> CAPM 6397 .....	55
Obr. 10. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665 .....	56
Obr. 11. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Enterococcus faecium</i> CCDM 816 .....	57
Obr. 12. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953 .....	58
Obr. 13. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4418.....	59
Obr. 14. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Staphylococcus xylosus</i> DEPE26.....	61
Obr. 15. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Staphylococcus succinus</i> DEPE18.....	62
Obr. 16. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Staphylococcus warneri</i> DEPE23 .....	63
Obr. 17. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T8.....	64
Obr. 18. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> T2.....	65
Obr. 19. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Lactobacillus curvatus</i> T15 .....	66
Obr. 20. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Lactobacillus brevis</i> T24 .....	67
Obr. 21. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 670 .....	68
Obr. 22. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 .....	70
Obr. 23. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> CCDM 686 .....	71
Obr. 24. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 702.....	72
Obr. 25. Inhibiční účinek hydrogenfosforečnanu sodného na bakterie rodu <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> a <i>Enterococcus</i> .....	73

---

Obr. 26. Inhibiční účinek hydrogenfosforečnanu sodného na bakterie <i>Staphylococcus</i> .....	74
Obr. 27. Inhibiční účinek hydrogenfosforečnanu sodného na bakterie rodu <i>Lactobacillus</i> .....	75
Obr. 28. Inhibiční účinek hydrogenfosforečnanu sodného na bakterie rodu <i>Lactococcus</i> .....	76
Obr. 29. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Escherichia coli</i> CCM 3954 .....	78
Obr. 30. Inhibiční účinek fosforečnanů na <i>Enterobacter aerogenes</i> CCM 2531 .....	79



**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1. Obsah fosforu ve významných potravinových surovinách a potravinách [6] .....	15
Tabulka 2. Seznam kyselin a solí používaných v České republice omezeně pro některé druhy potravin [6] .....	16
Tabulka 3. Sekvestrující schopnost vybraných fosforečnanů sodných [2].....	18



