

Vliv fosforečnanů na růst vybraných potravinářsky významných bakterií

Bc. Eva Lorencová

Diplomová práce



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVE PRACE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva LORENCOVÁ**
Osobní číslo: **T080341**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Vliv fosforečnanů na růst vybraných potravinářsky významných bakterií**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Zpracujte literární rešerši týkající se obecné charakteristiky, vlastností a potravinářského využití fosforečnanů v různém kondenzačním stupni.
2. Popište potravinářsky významné skupiny mikroorganismů a zaměřte se na inhibiční účinky fosforečnanových solí na jejich růst.

II. Praktická část

1. Provedte stanovení inhibičních účinků komerčně využívaných fosforečnanů lišících se délkou řetězce a koncentrací na vybrané skupiny gram pozitivních a gram negativních bakterií.
2. Výsledky statisticky vyhodnoťte.
3. Na základě teoretické části a výsledků praktické části formulujte závěry o působení fosforečnanů na testované bakterie. Porovnejte a zhodnoťte inhibiční růstový účinek daných fosforečnanových solí.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] MOLINS, R. A., Phosphates in Food, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, CRC Press, Inc. 1991.

[2] KAPRÁLEK, F., Základy bakteriologie, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum 1999.

[3] CARNEIRO DE MELO, A., CASSAR, C., MILES, R., Trisodium Phosphate Increases Sensivity of Gram-Negative Bakteria to Lysozyme and Nisin, Division of Life Science, King's College London 1997.

[4] AITKEN, A., Polyphosphates in Fish Processing, Ministry of agriculture, fisheries and food, TORRY RESEARCH STATION FAO ind partnership with Support unit for International Fisheries and Aquatic Reseach, SIFAR 2001.

[5] JULÁK, J., Identifikace Bakterií metodami instrumentální chemické analýzy, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum 1998.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

4. října 2010

Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2010

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
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 ¹⁾;
- 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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ 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 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 16. 5. 2010


.....

¹⁾ 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.

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Fosforečnany jsou užívány jako potravinářská aditiva. Disponují mnoha zlepšujícími účinky na výslednou kvalitu produktů. Za další funkci fosforečnanů by pak mohla být považována antimikrobní aktivita. V této diplomové práci byl sledován inhibiční efekt sedmi fosforečnanů na vybrané druhy gramnegativních a grampozitivních bakterií. Pro dané účely byly použity soli (HEXA 68, HEXA 70, FST, TRIKRYSTAL, PYRO 52, KPS, DIDI), které se lišily délkou řetězce. Inhibiční působení fosforečnanů bylo hodnoceno pomocí změny optické denzity bakteriální suspenze v čase. Měření probíhalo při 600 nm. Účinky jednotlivých solí na růstové chování bakterií byly porovnány a bylo zjištěno, že zmiňovaný inhibiční účinek není dán jen stupněm kondenzace, ale také hodnotami pH.

Klíčová slova: fosforečnany, inhibiční účinky na růst, stupeň kondenzace, grampozitivní a gramnegativní bakterie, hodnoty pH

ABSTRACT

Phosphates are used like food additives. They dispose of many improving effects on resulting quality of products. As another function of phosphates could be considered the antimicrobial activity. In this thesis was monitored an inhibitory effect of seven phosphates on selected strains of Gram-negative and Gram-positive bacteria. For these purposes were used phosphate salts (HEXA 68, HEXA 70, FST, TRIKRYSTAL, PYRO 52, KPS, DIDI) which differed in chain length. The inhibitory effect of phosphates was evaluated by the change of optical density of bacterial suspension. This measurement was practised by the wavelength 600 nm. The effects of separated salts on bacterial growth behaviour were compared with each other and was observed that mentioned inhibitory effect is not determined just by the condensation degree but it is also dependent on pH values.

Keywords: phosphates, inhibitory effects on bacterial growth, condensation degree, Gram-positive and Gram-negative bacteria, pH values

Děkuji RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při realizaci mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za jeho pomoc při vyhodnocování výsledků praktické části a doc. Ing. Miroslavu Fišerovi, CSc. za konzultaci principu měření zvolenou optickou metodou.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 FOSFOREČNANY	12
1.1 CHEMICKÁ STRUKTURA A NÁZVOSLOVÍ FOSFOREČNANŮ	12
1.2 VLASTNOSTI FOSFOREČNANŮ	13
1.3 ÚČINEK FOSFOREČNANŮ NA SLOŽKY POTRAVIN	14
1.4 PRŮMYSLOVÁ VÝROBA FOSFOREČNANOVÝCH SOLÍ	15
1.4.1 Elektrotermální metoda výroby kyseliny fosforečné.....	15
1.4.2 Výroba kyseliny fosforečné mokřým způsobem	15
1.5 FOSFOREČNANY V POTRAVINÁCH.....	16
1.5.1 Maso a masné výrobky	16
1.5.2 Plody moře, ryby	17
1.5.3 Mléčné výrobky.....	17
1.5.4 Pekařské výrobky	18
1.5.5 Další příklady použití fosforečnanových solí pro výrobu potravin a krmiv	18
1.5.6 Fosforečnany a legislativa	19
1.5.7 Vliv fosforečnanů užívaných v potravinářství na lidský organizmus	20
2 VLIV FOSFOREČNANOVÝCH SOLÍ NA MIKROBIÁLNÍ POPULACI	22
2.1 ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINEK FOSFOREČNANOVÝCH SOLÍ.....	22
2.1.1 Vliv fosforečnanových solí na struktury buněčných stěn a cytoplazmatických membrán bakterií.....	22
2.1.2 Význam hořčíku a vápníku v bakteriální buňce v souvislosti s působením fosforečnanů	23
2.1.3 Ovlivnění antimikrobního účinku fosforečnanů	25
2.2 VYBRANÉ SKUPINY POTRAVINÁŘSKY VÝZNAMNÝCH MIKROORGANISMŮ	25
2.2.1 Rod <i>Bacillus</i>	26
2.2.2 Rod <i>Staphylococcus</i>	27
2.2.3 Rod <i>Enterococcus</i>	27
2.2.4 Rod <i>Micrococcus</i>	28
2.2.5 Rod <i>Pseudomonas</i>	28
2.2.6 Rod <i>Proteus</i>	29
2.2.7 Rod <i>Escherichia</i>	30
2.2.8 Rod <i>Salmonella</i>	31
2.2.9 Rod <i>Citrobacter</i>	31
2.3 INHIBIČNÍ ÚČINEK FOSFOREČNANŮ NA VYBRANÉ RODY BAKTERIÍ.....	32
2.4 PŮSOBENÍ FOSFOREČNANŮ NA KVASINKY A PLÍSNĚ	35
3 ZJIŠŤOVÁNÍ RŮSTOVÝCH KŘIVEK BAKTERIÍ OPTICKOU METODOU	37
3.1 RŮSTOVÉ KŘIVKY BAKTERIÁLNÍ POPULACE	37

3.2	OPTICKÁ METODA STANOVENÍ RŮSTOVÉ KŘIVKY BAKTERÍ.....	39
II	PRAKTICKÁ ČÁST	42
4	CÍLE PRÁCE	43
5	PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY.....	44
6	MATERIÁL A METODY	45
6.1	MATERIÁL	45
6.1.1	Použité mikroorganismy	45
6.1.2	Kultivační půdy	45
6.1.3	Zásobní roztoky fosforečnanových solí.....	46
6.2	METODY.....	47
6.2.1	Příprava bakteriální suspenze.....	47
6.2.2	Sledování účinku fosforečnanových solí na vybrané potravinářsky významné bakterie.....	47
6.2.3	Stanovení pH kultivačního prostředí.....	48
7	VÝSLEDKY.....	49
7.1	VLIV JEDNOTLIVÝCH SOLÍ NA RŮST A RŮSTOVÉ PARAMETRY VYBRANÝCH BAKTERÍ	49
7.1.1	Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010	49
7.1.2	Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> CCM 2216.....	52
7.1.3	Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732.....	54
7.1.4	Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953	56
7.1.5	Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224.....	58
7.1.6	Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Escherichia coli</i> CCM 3954.....	61
7.1.7	Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Citrobacter freundii</i> CCM 7187	63
7.1.8	Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188.....	65
7.1.9	Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis CCM 4420.....	67
7.1.10	Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955.....	69
8	DISKUZE	71
	ZÁVĚR	76
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	77
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	85
	SEZNAM OBRÁZKŮ	86
	SEZNAM TABULEK.....	88
	SEZNAM PŘÍLOH.....	89

ÚVOD

Kažení potravin je závažným problémem v souvislosti se zajištěním jejich údržnosti a zdravotní nezávadnosti. Dochází k němu jednak působením nativních enzymů, které jsou přirozeně přítomné, a také vlivem mikrobiální kontaminace.

Vědci, výrobci i laikové požadují maximální možné vyloučení veškerého rizika při spotřebě potravin. Pro potlačení nežádoucích jevů jsou do potravin přidávána aditiva (konzervanty), která cíleně působí proti nežádoucím mikroorganismům, jež by mohly člověku způsobit zdravotní komplikace. Přídavné látky jsou přítomny samozřejmě i z jiných důvodů, kdy fungují např. jako emulgátory, stabilizátory, sekvestranty apod. Fosforečnanové soli, jimiž se zabývá tato diplomová práce, jsou aplikovány pro své schopnosti modifikovat vlastnosti složek potravin a zajistit tak na výstupu kvalitnější výrobek.

Protože je bezpečnost potravin jedním z nejdůležitějších zájmů společnosti, jsou hledány další cesty, jak jí dosáhnout. Logickým a zároveň nejjednodušším krokem bylo zjišťování dalších antimikrobních účinků aditiv, která se již běžně pro produkci potravin používají.

Fosforečnany, zvláště ty s dlouhým řetězcem, prokazují podle mnoha studií inhibiční účinky na grampozitivní bakterie a dokonce působí na některé kvasinky či plísně. Seznam mikroorganismů, na které tyto soli při jistých koncentracích působí, se stále prodlužuje. Snaha zjistit minimální množství komerčních solí, které by již účinkovalo proti nebezpečným mikroorganismům, vede stále k dalším výzkumům.

Tato diplomová práce se zabývá inhibičními účinky v praxi užívaných fosforečnanů v různém stupni kondenzace na růst vybraných potravinářsky významných bakterií (včetně gramnegativních bakterií) a poukazuje na minimální koncentrace, které jsou schopny inhibovat dané mikroorganismy nebo jejich rozvoj alespoň znatelně omezit.

Je nutné podotknout, že inhibiční efekt fosforečnanů může být ovlivněn matricí. To znamená, že ve skutečném prostředí, narozdíl od podmínek *in vitro* s čistými kulturami bakterií, nemusí k tak silnému účinku fosforečnanů vůbec dojít. Stejně tak nelze vyloučit synergická působení, která mohou vyplynout díky ostatním přítomným složkám v potravinách či zákrocům, které byly v souvislosti s produkcí daného potravinového výrobku provedeny.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 FOSFOREČNANY

Fosforečnany jsou soli kyseliny trihydrogenfosforečné, které vznikají neutralizací kyseliny zásadami. V přírodě se vyskytují v mnoha minerálech i živých soustavách. V biologických systémech se fosforečnany přirozeně nacházejí v iontové formě, která vzniká hydrolyzou difosforečnanu. Nejčastější podobou fosforečnanů v organizmech jsou makroergické struktury (adenozinfosfáty, fosfoenolpyruvát, kreatinfosfát), fosfolipidy či součásti nukleových kyselin. Fungují tedy jako složka enzymatických systémů zapojených do metabolismu různých živin. Účastní se tvorby struktur tkání. Jsou nezbytnou součástí naší stravy. Fosforečnanové soli mohou být z technologických důvodů, pro své zlepšující účinky, záměrně přidávány do potravin. V poslední době je pozornost soustředěna na předpokládaný inhibiční účinek vůči mikroorganismům. Jedná se totiž o zajímavou skutečnost v souvislosti se zajištěním bezpečnosti a udržitelnosti potravin. [1], [2]

1.1 Chemická struktura a názvosloví fosforečnanů

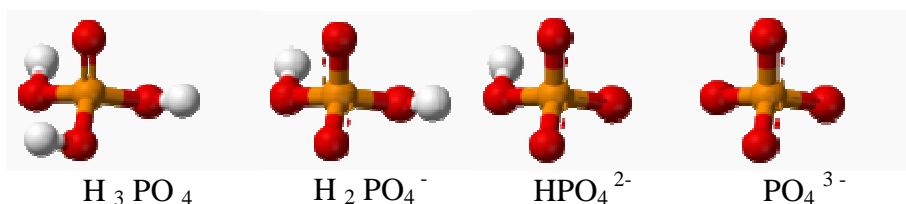
Kyselina fosforečná je schopná tří disociací, tří ztratit H^+ iontů. Pokud kyselina ztratí všechny tři vodíkové kationty, vznikne ortofosforečnan. [3]

Fosforečnanový iont má čtyřstěnou strukturu (viz Obr. 1). Okolo atomu fosforu jsou rozmístěny čtyři totožné atomy kyslíku. Náboj tohoto iontu je 3-. Jeho konjugovanou bází je hydrogenfosforečnan (HPO_4^{2-}), který je konjugovanou bází dihydrogenfosforečnanu ($H_2PO_4^-$, konjugovaná báze kyseliny fosforečné). [4], [5]

Fosforečnany mohou být tvořeny, z hlediska chemické struktury, jednou PO_4 skupinou ve formě ortofosforečnanového aniontu (PO_4^{3-}), nebo mohou mít v molekule jeden, dva, či tři kyslíky kovalentně vázány na jiné atomy. Tato molekula má tři nahraditelné vodíkové atomy, které poskytují velký počet možných kombinací vodíků a kationtů kovů (nejčastěji alkalických zemin). Lze se tedy setkat s ortofosforečnanem s jedním zásaditým iontem a dvěma atomy vodíku, nebo s ortofosforečnanem, který obsahuje dva alkalické kovové ionty a jeden vodík, či s takovým, který obsahuje tři kovové ionty. [2], [4]

PO_4 skupina, jak již bylo zmíněno, má tetraedrickou strukturu formovanou čtyřmi kyslíkovými atomy kolem centrálního atomu fosforu. Třebaže jen tři ze čtyř kyslíkových atomů fosforečnanové skupiny mohou vytvářet kovalentní vazby, čtvrtý kyslík je schopen vytvořit

můstek mezi sousedními atomy fosforu ve fosforečnanovém řetězci. Nejjednodušší z řady fosforečnanů je ortofosforečnan, který dále kondenzuje ve vyšší struktury. Tato situace nastává za vysokých teplot a uvolnění vody z dvou hydroxylů sousedících fosforečnanových jednotek. Kondenzací dvou molekul fosforečnanu vzniká pyrofosforečnan. Spojením dvou a více fosforečnanových skupin získáme polyfosforečnany. Kromě lineárních molekul mohou vznikat prostorově větvené ultrafosforečnany. Další možností je výskyt uzavřených cyklů v řetězci. Takové struktury jsou nazývány metafosforečnany. [4]



Obr. 1. Kyselina fosforečná a její disociační stupně [6]

1.2 Vlastnosti fosforečnanů

Většina fosforečnanů je rozpustná ve vodě za normální teploty a tlaku. Jedná se zpravidla o ortofosforečnany, hydrogen- a dihydrogenfosforečnany alkalických kovů (kromě fosforečnanu lithného). Ve zředěném vodném roztoku jsou fosforečnany přítomny ve čtyřech formách. V silně zásaditém prostředí převažuje fosforečnanový iont PO_4^{3-} , zatímco ve slabě zásaditém se spíše setkáváme s hydrogenfosforečnanovým iontem HPO_4^{2-} . Ve slabě kyselém prostředí je nejvíce zastoupen dihydrogenfosforečnan $H_2PO_4^-$ a v silně kyselém prostředí kyselina trihydrogenfosforečná. Vodné roztoky alkalických dihydrogenfosforečnanů reagují kyselé, což je důsledek disociace $H_2PO_4^-$. Zásaditě naopak reagují vodné roztoky hydrogenfosforečnanu a ortofosforečnanu. [6], [8]

Fosforečnany mohou podlehnout hydrolýze. Je pravděpodobné, že právě tento jev stojí za ztrátou funkčních schopností a inhibičních bakteriálních účinků. Hydrolýza fosforečnanů v potravinách může být způsobena rozmanitými druhy enzymů, vysokými teplotami, nebo může být výsledkem činnosti mikroorganismů. Polyfosforečnany jsou stabilní ve vodných roztocích při 25 °C v alkalickém a neutrálním prostředí. Hydrolýza je urychlována zvýšenou teplotou nebo změnou hodnoty pH. Probíhá nejčastěji od koncových fosforečnanových skupin. Ve vysoce kyselém prostředí se pak polyfosforečnany mohou štěpit náhodně

v celém řetězci. Intenzita hydrolytických pochodů se snižuje s klesající koncentrací roztoků. [4]

Fosforečnany mají silné chelatační schopnosti. Chelatace je tvorba komplexů s kovovými mono- či polyvalentními kationty (nejčastěji se sodíkem, draslíkem, vápníkem nebo hořčíkem). Stejně tak dokáží navázané kationty odštěpit. Tvorba komplexů je podporována zvýšenou teplotou, rostoucím pH a počtem molekul ortofosforečnanu. Fungují prakticky na stejném principu jako komplexotvorné činidlo ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA). [4]

Kyselina trihydrogenfosforečná a její soli jsou důležité okyselující a puфраční agens používané v potravinářství. Puфраční schopnost je schopnost některých fosforečnanů udržet stabilní pH v úzkém rozmezí v prostředí bez ohledu na vnější vlivy. Puфраční kapacita polyfosforečnanového aniontu klesá s rostoucí délkou řetězce. [4], [7]

1.3 Účinek fosforečnanů na složky potravin

Fosforečnany přidávané do potravin intereagují se složkami potravin a pozměňují jejich vlastnosti. O významném ovlivnění lze hovořit u polysacharidů a hlavně u bílkovin. Příkladem může být jak změna pH a iontové síly roztoku bílkovin, právě tak jako chelatace kovových iontů. Fosforečnany se mohou vázat na proteiny nebo reagovat s nabitými skupinami v polypeptidech za tvorby komplexů, což přímo ovlivňuje vlastnosti proteinů, jako je hydratace, bobtnání, tvorba gelu a denaturace indukovaná vysokou či nízkou teplotou. [4]

Anionaktivní povaha fosforečnanů je zodpovědná za zvýšení počtu vazeb na proteiny v souvislosti s klesajícím pH prostředí. Při hodnotách pod izoelektrickým bodem jsou skupiny protonizovány, celý protein má pozitivní náboj a naopak. Odpuzování stejně nabitých skupin způsobuje zpřístupnění struktury k reakcím s okolními molekulami (jako je voda). Interakce polyanionických fosforečnanů s pozitivně nabitými skupinami molekuly bílkoviny je schopna zvýšit negativní náboj a způsobit jejich vyšší rozpustnost. Vlastnosti fosforečnanů spočívají též ve stabilizaci koloidních suspenzí, které determinují jejich využití v mlékárenském průmyslu. [4]

1.4 Průmyslová výroba fosforečnanových solí

Soli užívané jako stabilizátory, emulgační činidla, látky podporující kynutí či chemická kypřidla potravin jsou potravinářským podnikům dodávány výrobcí ve formě snadno aplikovatelné a pro daný účel uzpůsobené. Obecně produkce fosforečnanů probíhá dvěma způsoby: elektrotermálním nebo mokrým způsobem. Výchozími surovinami jsou: kyselina trihydrogenfosforečná a nejčastěji uhličitan sodný, hydroxid sodný, oxid vápenatý, hydroxid vápenatý, uhličitan vápenatý, hydroxid draselný a amoniak. [8]

1.4.1 Elektrotermální metoda výroby kyseliny fosforečné

V tomto procesu je kyselina ortofosforečná vyráběna z elementárního fosforu získaného z rudy, např. z fluorapatitu, při teplotách nad 1100 °C (nejlépe 1400-1600 °C). Fosfor je uvolňován hořením v nadbytku vzduchu ve formě oxidu fosforečného. Ten je následovně hydratován za vzniku par kyseliny fosforečné. Množstvím přidané vody lze regulovat koncentraci výsledného produktu. Hlavní znečištění vzniklé kyseliny představuje arsen (20-100 ppm). Protože je tato kyselina používána v potravinářství i ve farmacii, je nutná purifikace. Úprava znečištěné kyseliny probíhá v nadbytku sulfanu s následnou filtrací. Sirovodík je vyhnán proudícím vzduchem. Obsah arsenu je tímto potlačen na méně než 0,5 ppm. Na rozdíl od výroby mokrým způsobem je získaná kyselina podstatně méně znečištěná, proto také dnes elektrotermální způsob výroby v průmyslu převažuje. [8]

1.4.2 Výroba kyseliny fosforečné mokrým způsobem

Mokrý způsob výroby zahrnuje dva kroky. První fází je digesce rudy obsahující fosfor s kyselinou sírovou (méně častěji pak s kyselinou chlorovodíkovou). V druhé fázi je vytvořena kyselina fosforečná, která je následně filtrací oddělena od vzniklé sraženiny síranu vápenatého. Aby byla sraženina filtrovatelná a zvýšilo se množství oxidu fosforečného, je filtrát kyseliny recyklován v reaktoru. Při teplotách 70-80 °C získáme zhruba 30 % P_2O_5 v kapalné fázi a sraženinu $CaSO_4 \cdot 2H_2O$. Zhruba 40 % P_2O_5 a filtrovatelný $CaSO_4 \cdot 0,5 H_2O$ poskytují reakce při teplotách 80-90 °C. Kyselina fosforečná vyráběná mokrou cestou je spíše užívána pro výrobu minerálních hnojiv a krmiv pro zvířata. [8]

Vzniklá kyselina trihydrogenfosforečná je následovně neutralizována pomocí již jmenovaných bazických sloučenin (uhličitan sodný, hydroxid sodný, oxid vápenatý, hydroxid vápe-

natý, uhličitán vápenatý, hydroxid draselný, amoniak). Dehydratací (evaporací) dochází k vysušování systému roztok/sraženina a ke vzniku ortofosforečnanových solí, které mohou být dále kondenzovány termální dehydratací (pražením, vyžiháním). [8]

1.5 Fosforečnany v potravinách

Fosforečnany jsou zákonem povolené přídatné látky, které jsou používány ve výrobě potravin kvůli tomu, že dokáží modifikovat jisté vlastnosti výsledných produktů jako je například struktura, chuť, šťavnatost a barva. Zároveň mají pufrovací schopnosti, disponují sekvestračními vlastnostmi, rozšiřují kapacitu zadržované vody a v jistých případech jsou schopny specifických bakteriostatických účinků. [10]

Uplatnění v procesu výroby potravin nacházejí zejména jako tavicí soli, stabilizátory, sekvestranty, kypřící látky, emulgátory, regulátory kyselosti, zahušřovadla, plnidla, protispěkové a zvlhčující látky. Setkáváme se s nimi například při výrobě a úpravě tavených sýrů, masa, rybích produktů a výjimkou nejsou ani pekařské výrobky. Fosforečnany se totiž také používají při výrobě prášku do pečiva. Svou úlohu plní i v kolových nápojích (resp. kyselina fosforečná) a ve velkém množství hnojiv a detergentů. Soli aplikované v potravinářství mohou být jednoduché, pyrofosforečnany, trifosforečnany nebo polyfosforečnany. [10]

1.5.1 Maso a masné výrobky

Hlavní funkce fosforečnanů v mase a masných výrobcích spočívá ve zvýšení vaznosti vody, které zprostředkovávají díky reakci s přítomnými bílkovinami. Umožňují stabilitu tučkové i vodné složky masové směsi. Tento efekt se nejvíce uplatňuje při výrobě šunky, salámových děl a párků. Dochází ke zvyšování výtěžnosti, snížení hmotnostních ztrát při tepelném opracování, zlepšení šťavnatosti a křehkosti, dokonce ke zpomalení oxidace lipidů. Trvanlivé masné výrobky mají zvýšenou údržnost v důsledku snížení vodní aktivity sušením na 0,93. Fosforečnany používané do výrobků paradoxně brání dehydrataci na požadovanou hodnotu. Ve výsledku pak může dojít k ožinění povrchu a vzniku falešné plísně trvanlivých masných produktů. [11]

Jinými zdroji fosforu v mase mohou být anorganické sloučeniny, které vznikají jako důsledek rozkladu přirozených složek masa (adenozintrifosfátu a deoxynukleotidů) při působení

enzymů nebo mikroorganismů. Zdrojem fosforu v masných výrobcích mohou být dále sloučeniny z koření a složky kořenících směsí. Fosforečnany jsou v masných výrobcích povoleny do koncentrace 5 000 mg/kg. V případě suchých trvanlivých uzenin by se mělo jejich použití zvážit. [11], [12]

Polyfosforečnany se v procesu zpracování a skladování masných výrobků působením přirozeně přítomné fosfatázy hydrolyzují na neškodný ortofosforečnan. Jednoduché fosforečnany se běžně vyskytují v mase. Proto se malá množství těchto přidaných solí nedají spolehlivě dnešními metodami zjistit a výrobci je na obale výrobku často neuvádějí. Vyšší přídavky fosforečnanů lze odhalit, pokud P-číslo (poměr celkového obsahu fosforečnanů k bílkovině masa) překročí hodnotu 2,4 (empiricky zjištěná hodnota). [13]

1.5.2 Plody moře, ryby

Fosforečnanové soli zajišťují šťavnatost a jemnost rybího masa, mořských plodů a z nich vytvořených výrobků. Velký význam mají hlavně pro udržení vlastností rybí svaloviny i po rozmrazení. Výrazně ovlivňují ztráty při dalším zpracování. Hlavní přínos spočívá v retenci vody v proteinech. Pokud použijeme fosforečnanových solí před zmrazením rybí svaloviny, snížíme tím množství jí vypuzené při rozmrazování. Jejich adice může navíc výrazně zlepšit vzhled filé. Způsobují změnu barvy povrchu z hnědé na leskle bílou či bílou s mírně namodralým odstínem. Zlepšovací efekt spočívá pouze v úpravě vzhledu nikoli jakosti. Rybí svalovina ošetřená fosforečnanovými solemi je vhodná pro výrobu tvarovaných výrobků (bloků, prstů). Fosforečnany dávají vzniknout mazovatelé vrstvě na povrchu ořezků, která pak následně ulehčuje formování polotovarů bez přebytečných dutin, které by mohly mít negativní vliv na tvar a hmotnost výsledných výrobků. Příliš mnoho fosforečnanových solí pak s sebou nese zhoršující efekt vzhledem k aroma, textuře a nezajišťuje ani významnější prodloužení údržnosti. [10]

1.5.3 Mléčné výrobky

Jako stabilizátory mléčných disperzí našly fosforečnany hlavní uplatnění při výrobě tavených sýrů. Zde se užívají jako emulgační činidla, která umožňují aplikaci přirozených vlastností mléčných bílkovin, konkrétně kaseinu tím, že z jeho struktury vyvazují vápník a nahrazují ho sodnými ionty, které jsou rozpustnější. Kaseinové frakce pak umožní výrobu

taveniny, krému. Schopnost na sebe vázat kationty je ovlivněna celou řadou faktorů např. konkrétním kationtem kovu, teplotou (s rostoucí teplotou roste schopnost vazby kationtů), počtem fosforečnanových jednotek v molekule (s rostoucím počtem, roste i afinita ke kationtům). Kromě zvýšené intenzity vazby vody je pro utváření výsledné matrice taveného sýra důležitý i vápník navázaný v tavicích solích. Při chladnutí dochází k uvolňování kalcia a k jeho znovuzapojování do zesíťované struktury taveného sýra. Funkce fosforečnanů je tedy klíčová při utváření finální konzistence daného výrobku. Další uplatnění nacházejí při výrobě mléčných produktů z kondenzovaného mléka nebo náhražek mléka do kávy. [4], [7], [12]

1.5.4 Pekařské výrobky

Zlepšující účinek fosforečnanů (hlavně pyrofosforečnanu sodného, fosforečnanu draselného a vápenatého) u pečiva spočívá v podpoře fermentačních procesů a tím i biologického kypřicího efektu. Reagují také s kyselým bikarbonátem sodným za vzniku oxidu uhličitého. Oxid uhličitý hraje, stejně jako při kynutí těsta, hlavní roli u kypření a ovlivňuje tak výsledné vlastnosti pekařských výrobků. Kvasinky vyžadují v prostředí řadu minerálů, z nichž právě fosfor významně ovlivňuje růstovou aktivitu těchto nižších hub. Fosfor je zapojen do hospodaření s energií, které je pro růst a množení kvasinek nezbytné. [3], [14]

1.5.5 Další příklady použití fosforečnanových solí pro výrobu potravin a krmiv

Limonády obsahující kofein disponují rovněž fosforečnany. Jedná se hlavně o přídavek kyseliny fosforečné, který zde má okyselující funkci. Nadměrná spotřeba kolových nápojů u dětí je podrobována kritice. S jejím zvýšením souvisí nebezpečí odvápnění kostí a vzniku osteoporózy. [15]

Mražené pomfrity obsahují hydrogenfosforečnan disodný, který je zde užíván jako sekvestrant. Pomáhá udržet barvu mražených fritovaných hranolků a zlepšit jejich kvalitu. [16]

Krmiva pro zvířata obsahují rovněž fosforečnany, resp. fosforečnany vápenaté, které jsou zde nezbytným zdrojem dostupného anorganického fosforečnanu. Obiloviny a olejninny nejsou v dostatečné míře schopny suplementovat fosforem zvířecí organismus, protože je v nich tento minerál vázán na kyselinu fytoovou. Vzniklé fytáty, které jsou přítomny v krmivech, nemohou být bez přídatku enzymu fytázy využívány a potřebně využity. [17]

1.5.6 Fosforečnany a legislativa

Použití fosforečnanů je upraveno, stejně jako u ostatních přídatných látek užívaných v potravinářství, vyhláškou Ministerstva zdravotnictví č. 130/2010 Sb., která je účinná od 1. 6. 2010. Tato vyhláška byla přijata 23. 4. 2010 a mění dříve platnou vyhlášku č. 4/2008 Sb. [18]

Fosforečnany sodné, označovány jako E 339, představují ortofosforečnany, dihydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan disodný a fosforečnan trisodný. Tyto soli jsou užívány v podobě sypkých směsí pro výrobu ochucených nealkoholických nápojů, v náhražkách mléka do kávy, v sýrech a masných výrobcích. Slouží zde k úpravě kyselosti, působí stabilizačně a zabraňují nežádoucím reakcím kovů v potravinách. [18], [19], [20]

Fosforečnany draselné jsou vedeny pod E kódem E 340. Dihydrogenfosforečnan draselný, hydrogenfosforečnan didraselný a fosforečnan tridraselný mají obdobnou funkci jako sodné soli. Rovněž upravují kyselost, zabraňují nežádoucím reakcím kovů přítomných ve stopových množstvích v potravinách, navíc váží vytékající šťávy při výrobě masných výrobků a účinkují jako emulgační činidla či stabilizátory. Kromě sýrů a masných výrobků se s nimi lze setkat při výrobě sypkých nápojů a náhražek mléka do kávy. [18], [19], [20]

Fosforečnany vápenaté, neboli E 341, lze užít jako zlepšující složky pro výrobu těst, látky upravující pH a jako prostředky pro zabránění nežádoucích reakcí kovů v potravinách. Fungují také jako stabilizátory, kypřící a protispékavé látky. Svou úlohu plní i v ovocných a zeleninových konzervách, kde vytváří nepravý rosol a mají zpevňující účinek. Často se užívají jako protihrudkující látky při výrobě koření. Význam mají v suchých práškových potravinách (včetně cukrů), v koření, jedlé soli, v tabletovaných potravinách a plátkových tavených sýrech. [18], [19], [20]

Fosforečnany hořečnaté (E 343) upravují pH a účinkují jako stabilizátory. Mohou působit jako zdroj magnézia, který se přidávkem fosforečnanové soli dostává do potravin. [19]

Amonné fosforečnany (E 342) se nesmí do potravin v České republice přidávat. Mají ale zlepšující účinky na vlastnosti těsta, fungují jako kypřící látky a látky, které kontrolují pH. V USA se používají hojně při výrobě pečiva, alkoholických nápojů, margarínů a kypřícího prášku. [19]

Jako emulgátory, stabilizátory, regulátory kyselosti, sekvestranty či také jako zvlhčující látky slouží difosforečnany uváděné pod kódem E 450. E 451, trifosforečnany, lze rovněž užít jako sekvestrant a regulátor kyselosti, ale i pro zahušťování. Polyfosforečnany (E 452) mohou být přidávány proto, aby plnily totožné funkce, jako výše uvedené soli (E 450 a E 451). Navíc mohou působit jako kypřící látka. [20]

1.5.7 Vliv fosforečnanů užívaných v potravinářství na lidský organizmus

Fosfor je klasifikován jako minerální nutrient. Asi 85 % této látky je v lidském těle vázáno v kostní tkáni (kosti, zuby) ve formě hydroxyapatitu, fosforečnanu vápenatého, sodného a draselného. 10-15 % je uloženo v měkkých tkáních a tělních tekutinách. Organická forma fosforu představuje fosfatidy, nukleoproteiny a fosfoproteiny. Podílí se tedy také na tvorbě složek určených k hospodaření s energií, přenosu genetické informace, či na tvorbě enzymů a hormonů. Fosfátová složka je rovněž důležitá pro udržení acidobazické rovnováhy. [21]

Resorpce i exkrece fosforu je ovlivňována stávající hladinou vápníku v krvi, stejně tak jeho využitelnost. V případě, že je jeden z těchto prvků podán ve zvýšeném množství, vzroste exkrece druhého. Zvýšené vylučování podporuje parathormon (PTH). PTH je hormon příštítných tělísek a slouží k regulaci homeostáze kalcia tak, že ho při nedostatku uvolňuje z kostní tkáně do krevního řečiště. Dochází k růstu plazmatické hladiny vápníku. Kalcemie zpětně reguluje syntézu tohoto hormonu. [22], [23]

Jestliže bude příjem fosforu zvýšený, aniž by přitom došlo k adekvátnímu doplnění vápníku, začne PTH vykonávat zmíněnou funkci. V krajním případě je důsledkem vznik osteoporózy. Fosforečnany, jako zdroj fosforu, působí ve zvýšeném množství laxativně. Mohou vyvolávat, kromě odvápnění kostní hmoty, kalcifikaci orgánů, měkkých tkání a nepříznivě ovlivňovat schopnost utilizace vápníku, železa, hořčíku a zinku. [22], [24]

Pokud jde o vstřebávání různých sloučenin fosforu, lze říci, že nejlépe jsou resorbovány soli a estery kyseliny trihydrogenfosforečné. Poněkud snížená je resorpce solí kyseliny hydrogenfosforečné a polyfosforečnanů. Vstřebané množství fosforečnanů ve vyšším kondenzačním stupni je závislé na enzymatické hydrolýze na ortofosforečnany. [1], [22]

Většina fosforečnanových solí přidávaných do potravin je nutričně ekvivalentní s fosforečnany, které se v nich přirozeně vyskytují a tudíž nepředstavují zdravotní riziko. Nicméně v přebytku škodí a mezinárodní zdravotnické úřady doporučily, aby denní spotře-

ba nepřekračovala určitou úroveň. Příliš vysoká množství těchto látek, díky schopnosti chelatace vícevalentních kationtů, mohou mít za následek odvápnění kostí. [10]

Doporučený denní příjem fosforu by se měl pro dospělého jedince pohybovat zhruba okolo 30 mg na 1 kg tělesné hmotnosti, maximálně však 70 mg/kg. Hodnota RDA (Recommended Dietary Allowances - doporučený potravní příjem) je určena množstvím od 240 do 1200 mg na den, přičemž poměr vápníku a fosforu by měl být zachováván 1:1. [4]

2 VLIV FOSFOREČNANOVÝCH SOLÍ NA MIKROBIÁLNÍ POPULACI

2.1 Antibakteriální účinek fosforečnanových solí

Antimikrobní účinek fosforečnanů je chápán jako pozitivní vedlejší efekt aplikace těchto solí v potravinách. V zásadě se jedná hlavně o inhibiční účinek na grampozitivní bakterie. Uvedená skutečnost souvisí se strukturou buněčné stěny a schopností, zvláště polyfosforečnanů, vyvazovat dvojmocné kationty (vápenaté a hořečnaté). [25]

První zmínky o tom, že dlouhé řetězce fosforečnanů vedou k účinnějšímu potlačení růstu grampozitivních bakterií, byly odprezentovány Kohlem (1971), Wagnerem (1983), Bustou (1983) a Molinsem (1985). Jak již bylo naznačeno, tento efekt je dán hlavně porušením integrity buněčné stěny prostřednictvím chelatace vápenatých a hořečnatých iontů, přičemž také dochází ke ztrátě osmoregulace a porušení selektivní permeability membrány, což v konečném důsledku znamená snížení metabolických funkcí vyplývajících z úniku substrátů. [26]

2.1.1 Vliv fosforečnanových solí na struktury buněčných stěn a cytoplazmatických membrán bakterií

Buněčná stěna je struktura rozmanité stavby a různého stupně složitosti u různých bakterií. Grampozitivní i gramnegativní bakterie obsahují polymer peptidoglykan (murein), který je tvořen dlouhými řetězci aminocukrů propojenými tetrapeptidovými řetězky. Výsledná síť chrání buňku před lyzí. Grampozitivní bakterie mají podstatně tlustější vrstvu mureinu, která disponuje větším počtem propojení, ale na rozdíl od gramnegativních bakterií postrádají vnější membránu. Navíc je jejich buněčná stěna prostoupena lineárními řetězci teichoových kyselin. U gramnegativních bakterií nalezneme jednu nebo několik málo peptidoglykanových vrstev s absencí teichoové kyseliny. [27], [28]

Místo v grampozitivní bakteriální stěně, do kterého je soustředěno působení polyfosforečnanové soli, je lokalita prostupu řetězců teichoové kyseliny. [7], [29]

Glykopolymer teichoová kyselina je molekula bohatá na fosforečnanové skupiny. Konkrétně se jedná o derivát polymeru glycerolfosforečnanu nebo ribitolfosforečnanu

s glykosidově navázanými cukry. Nachází se u grampozitivních bakterií, patogenních i nepatogenních. Setkáváme se s dvěma typy teichoové kyseliny: s lipoteichoovou kyselinou (L-TA) a stěnovou formou teichoové kyseliny (W-TA). Řetězce L-TA příčně prolínají buněčnou stěnu. Vedou od cytoplazmatické membrány až do peptidoglykanové vrstvy. Druhá forma (W-TA), která je kovalentně připojena na peptidoglykan, nejen že prochází napříč buněčnou stěnou, ale její řetězce zasahují i do vnějšího prostoru a udávají negativní náboj povrchu buňky. Toto napojení W-TA na peptidoglykan je zprostředkováváno pomocí fosfodiesterové vazby na C6 hydroxyl N-acetyl muramové kyseliny. Stěnová forma teichoové kyseliny tvoří až 60 % celkové hmotnosti buněčné stěny grampozitivních organismů. Její konkrétní struktura se různí dle druhu bakterie. Nejobvykleji je však tvořena z N-acetylmanózy a N-acetylglukózy, které jsou spojeny $\beta 1 \rightarrow 4$ glykosidovou vazbou s jedním nebo až třemi glycerolfosforečnany následovanými delším řetězcem glycerol- nebo ribitolfosforečnanu, např. kmeny *S. aureus* tvoří polyribitolfosforečnanové W-TA. [30]

W-TA tvoří hustou síť negativních nábojů na povrchu grampozitivních bakterií. Kvůli zmírnění výsledných elektrostatických odpudivých interakcí váže teichoová kyselina mono- a divalentní kationty kovů. Síť W-TA ovlivněná kationty zapříčiňuje porozitu a rigiditu buněčného obalu. Předpokládá se, že hraje důležitou roli v udržování homeostáze kationtů a vytváří jejich rezervoár na povrchu bakterie. Odtud pak mohou být využívány enzymy, které se účastní biochemických reakcí. Gradient iontů je schopen do jisté míry zmírňovat rozdíl osmotického tlaku mezi vnitřním a vnějším prostředím buňky. Množství navázaných kationtů může ovlivnit i přítomný D-alaninový zbytek, resp. jeho pozitivně nabitá aminoskupina. WTA, která postrádá D-alanilové estery, může navázat o 60 % více hořečnatých iontů než její analog obsahující danou modifikaci. [30]

2.1.2 Význam hořčíku a vápníku v bakteriální buňce v souvislosti s působením fosforečnanů

Je známo, že některé kovy, jako např. Mo, Fe, Mg, Ca, K, Zn apod., jsou z prostředí mikroorganismy koncentrovány a aktivně vyvazovány organickými chelatačními činidly, aby mohly krýt potřeby nejen strukturních komponent, ale také metaloenzymů. [31]

Velké množství iontů vápníku a hořčíku je zastoupeno v buněčných stěnách a cytoplazmatických membránách prokaryotických mikroorganismů. Důležitost těchto iontů spočívá ve strukturální funkci a zároveň představuje potenciální nebezpečí porušení integrity buněčné stěny nejen při působení komplexotvorných činidel (např. EDTA, fosforečnany), ale i při nedostatku vápníku a magnézia v kultivačním médiu. [29], [32]

Je dokázáno, že vápenaté ionty navíc ovlivňují metabolismus fosfolipidů (požadavek vápenatých iontů u fosfolipázy) a tím bezprostředně i tvorbu membránových struktur. [29]

Jejich část je také navázána na vnější povrch buňky, resp. na vnější lipopolysacharidovou vrstvu gramnegativních bakterií. Avšak v souvislosti s tímto faktem nebývají antimikrobní účinky polyfosforečnanových solí dostupnou literaturou příliš často zmiňovány a popisovány. [29]

Hořčík se v grampozitivních bakteriích podílí na aktivaci bakteriálního růstu a buněčného dělení (zvláště u tyčinkových bakterií). Hraje důležitou roli pro buněčnou stěnu resp. vnější membránu gramnegativních bakterií. Funguje jako strukturální složka ribozomů, z čehož vyplývá, že je také esenciální pro syntézu bílkovin. Plní rovněž funkci kofaktorů mnohých bakteriálních enzymů. Nedostatek tohoto prvku v médiu může být nahrazen jinými dvojmocnými ionty (např. vápníkem, manganem). Nízká množství magnézia dobře snáší gramnegativní bakterie. Mezi další minerální látky koncentrované mikroorganismy náleží draselné ionty, které fungují jako regulátory osmotického tlaku. Zinek se zase vyskytuje v metaloenzymech, např. v alkalické fosfatáze a vystupuje také jako regulátor aspartáttranskarbamoylázy. [31], [33], [34], [35]

Eagon a kol. uvedli, že *Pseudomonas aeruginosa* rychle odumírá v přítomnosti EDTA. Tato skutečnost opět souvisí s chelatací vícevalentních kovových kationtů a s jejich tvrzením, že vápenaté, hořečnaté a zinečnaté kationty jsou složkou buněčných stěn *Pseudomonas aeruginosa*. Multivalentní kationty představují neenzymovou složku lipopolysacharidu nebo lipoproteinové složky buněčné stěny. [35]

Wagner a Busta došli k závěru, že přídavek kyselého pyrofosforečnanu sodného (SAPP) do kultivačního média inhibuje produkci nebo aktivitu proteázy zodpovědné za aktivaci toxinu *Clostridium botulinum*. Při použití rybí svaloviny a SAPP byla inhibována 5' nukleáza, která hydrolyzuje adenosinmonofosfát (AMP) na adenosin a ortofosforečnan. Tím bylo

dokázáno, že anorganické fosforečnany jsou schopny regulovat enzymovou aktivitu. Byl také zjištěn účinek tripolyfosforečnanu sodného na hexokinázu kvasinek, což je způsobeno chelatací hořečnatých iontů, které jsou esenciální pro hexokinázovou aktivitu. ATP tedy soutěží s polyfosforečnany o kovové ionty. [2]

Fosforečnanové soli mohou rovněž znemožnit klíčení spor nebo negativně ovlivnit tvar a tvorbu septa při dělení buněk (např. u *Bacillus cereus*). Působení se pak také projevuje zmenšením bakteriálních kolonií právě v důsledku defektního nebo zhoršeného buněčného množení. [4], [24]

2.1.3 Ovlivnění antimikrobního účinku fosforečnanů

Změna pH, která je indukována přidavkem fosforečnanů, může hrát roli při uplatnění sekvestrační schopnosti. S rostoucím pH roste i tvorba komplexů. Fosforečnany, které vykazovaly alkalickou reakci v kultivačním médiu (neutrální hodnoty pH), mají vyšší inhibiční kapacitu. Nízká pH totiž způsobují protonizaci vazebných míst, čímž dochází ke značnému poklesu žádaného chelatačního účinku. [4], [36]

Navíc pH bezprostředně ovlivňuje i hydrolýzu fosforečnanových solí. Je také pravděpodobné, že inhibiční účinek fosforečnanů může být znehodnocen působením záhřevu, který vyvolává rovněž hydrolýzu. Hydrolýzu lze způsobit i jinak, a to právě přítomnými mikroorganismy. Některé bakterie totiž disponují enzymy, které jsou schopny rozkládat fosforečnanové soli. Většina z nich však ke své činnosti bezpodmínečně vyžaduje hořečnaté, vápenaté či manganaté ionty. Dochází tedy ke kompetitivnímu chování, kdy enzymy a fosforečnany soutěží o přítomné potřebné ionty alkalických kovů. [4]

Syrové potraviny, které nejsou tepelně upravené, disponují aktivní fosfatázou schopnou štěpit polyfosforečnany na nižší jednotky a zbavovat je tak sekvestračních účinků. Záhřevem, dochází k její inaktivaci. Proto je, pro zachování a maximalizaci inhibičního účinku fosforečnanových solí ihned po jejich přidání do potravinového výrobku, nutný tepelný záhřev. [36]

2.2 Vybrané skupiny potravinářsky významných mikroorganismů

V následujícím textu budou blíže charakterizovány některé skupiny mikroorganismů, jejichž výskyt v potravinářských výrobcích přinejmenším není vítán. Daný oddíl je hlavně

zaměřen na bakterie, kterých se týká praktická část této diplomové práce. Taxonomické zařazení a názvy bakterií byly ověřeny v databázi LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature). [37]

2.2.1 Rod *Bacillus*

Rod *Bacillus* náleží do čeledi *Bacillaceae*. Jedná se o grampozitivní, aerobní či fakultativně anaerobní peritrichní tyčinky, pro něž je typická tvorba rezistentních spor (endospor). Bacily se v přírodě vyskytují v půdě a ve vodě. Některé druhy jsou schopné produkovat polypeptidová antibiotika (např. bacitracin, polymyxin, gramicidin). V mnoha případech je tvorba antibiotik spojována právě se sporulací, kdy kultura vstupuje do stacionární fáze růstu. Jiné druhy bacilů jsou zase schopny vytvářet slizová pouzdra polysacharidové povahy, která způsobují vadu (nitkovitost) pečiva. Bakterie rodu *Bacillus* mají bohatý enzymový systém, což jim dává schopnost hydrolyzovat a využívat nejrůznější organické sloučeniny. Za zmínku stojí pektolytické enzymy, které nacházejí uplatnění např. při postupu máčení lnu, protože rozkládají pektiny rostlinných pletiv a tím uvolňují celulózu. V praktické části mé diplomové práce jsem účinku fosforečnanových solí vystavila právě dva druhy těchto bakterií. Jedná se o *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis*. *Bacillus cereus* i *B. subtilis* jsou mezofilní mikroorganismy. [38], [39], [40]

Bacillus cereus vytváří na pevné půdě kolonie voskového vzhledu. Na krevním agaru způsobují β -hemolýzu. Tento druh disponuje velkými buňkami. Spory, které vytvářejí, bakterii nezduňují a jsou vysoce termorezistentní. Optimální teplota kultivace je 30 °C. *Bacillus cereus* je kataláza a lecitináza pozitivní. V potravinách obsahujících lecitin může způsobit jeho rozklad na jedovatý lysolecitin. Tvoří acetoin, hydrolyzuje želatinu, škrob, kasein a eskulin. Redukuje dusičnany na dusitany. [38], [39], [41]

Bacillus subtilis je někdy označován jako senný bacil. Tyčinky se formují většinou do řetízků. Spory jsou oválné a buňku opět nezduňují. Potravinářské výrobny a provozovny se obávají jejich výskytu, jelikož jsou vysoce rezistentní. V tekutém médiu, z důvodů zvýšené potřeby přístupu vzduchu, roste *Bacillus subtilis* převážně v podobě povrchové blanky. Optimální teplota kultivace je stejně jako u výše jmenovaného 30 °C. *Bacillus subtilis* tvoří katalázu. Na rozdíl od druhu *Bacillus cereus* neprodukuje lecitinázu. Je ale schopen tvořit acetoin a hydrolyzovat želatinu či škrob. Redukuje dusičnany na dusitany. [38], [39], [42]

2.2.2 Rod *Staphylococcus*

Bakterie rodu *Staphylococcus* náleží do čeledi *Staphylococcaceae*. Buňky stafylokoků vytvářejí shluky hroznovitého uspořádání. Mohou se ale vyskytovat jen v páru, po čtyřech nebo naopak samostatně. Někdy jsou schopny dokonce tvořit řetízky. Označení *Staphylococcus* vypoovídá i o kulovitém tvaru buněk. Tyto fakultativně anaerobní koky netvoří spory a nejsou pohyblivé. Mohou být původci zánětlivých hnisutvorných onemocnění a alimentárních intoxikací. Otravy z požití potravin, ve kterých se stafylokok pomnožil, mohou končit až smrtí. Enterotoxin, který je příčinou, lze charakterizovat jako látku polypeptidové povahy produkovanou některými kmeny daného druhu. Obecně jsou stafylokoky v přírodě velmi rozšířené. Osidlují povrch těla člověka a zvířat. [38], [43], [44]

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* je považován za patogenní bakterii. Na choroboplodnosti se podílí toxické produkty a extracelulární enzymy. Za odezvu organismu jsou zodpovědné jednak substance vázané na buňku (např. adheziny, peptidoglykan, protein A, sliozová vrstva, specifické antigeny) a také extracelulární faktory (např. hemolyziny, deoxyribonukleáza, hyaluronidáza, leukocidiny). Nejlépe roste na krevním agaru, kde způsobuje zřetelnou zónu úplné hemolýzy a vytváří typické zlatožluté až oranžové, jindy bílé nebo až okrově hnědé kolonie. Optimální teplota kultivace se pohybuje od 30 do 37 °C. *Staphylococcus aureus* disponuje enzymy katalázou, koagulázou a fosfatázou. Postrádá oxidázu. Je schopen redukovat nitráty, růst při 15% koncentraci NaCl v prostředí a tvořit acetoin. [38], [43], [45]

2.2.3 Rod *Enterococcus*

Rod *Enterococcus* náleží do čeledi *Enterococcaceae*. Enterokoky byly dříve řazeny do rodů *Enterobacter* a následně i *Streptococcus*. Náleží do skupiny tzv. střevních bakterií, které jsou indikátory fekálního znečištění a jejich přítomnost představuje kontaminaci potravin a vody. Jeho výskyt může s určitou pravděpodobností poukazovat na možnou účast patogenních bakterií. Jedná se o grampozitivní, kataláza negativní, nesporulující koky. Od streptokoků se odlišují odolností vůči alkalickému pH. Rostou v přítomnosti 6,5 % NaCl, při nízké teplotě 10 °C i při teplotě 45 °C. Morfologicky vytváří tyto koky dvojice, případně řetízky. Na krevním agaru rostou v šedě pigmentovaných koloniích. [38], [46]

Enterococcus faecalis je fakultativně anaerobní bakterie, jejíž některé kmeny našly uplatnění jako doplňková kultura v sýrařství. Nepohyblivé koky *Enterococcus faecalis* disponují fermentativním metabolismem. Sacharidy, s výjimkou L-arabinózy, kterou ponechávají nezfermentovanou, rozkládají na L(+) izomer kyseliny mléčné. Redukují dusičnany na dusitany a z argininu vytváří amoniak. Mají specifické požadavky na výživu. V prostředí vyžadují hlavně vitaminy skupiny B (kyselinu nikotinovou, pantotenovou, riboflavin, pyridoxin) a biotin. Optimální teplota kultivace je 37 °C. [38], [46]

2.2.4 Rod *Micrococcus*

Dalším grampozitivním kokem je *Micrococcus*. Ten řadíme do čeledi *Micrococceae*. Jedná se o nepohyblivou, obligátně aerobní bakterii, jejíž buňky nejčastěji formují pravidelná seskupení, tetrády. Nikdy netvoří řetízky. Na rozdíl od stafylokoků nerostou při teplotě 45 °C, ale mohou vegetovat i při teplotě nižší 10 °C. Některé druhy mikrokoků produkují pigmenty např. *Micrococcus luteus* vytváří žlutě zbarvené kolonie. Bakterie tohoto rodu jsou výhradně saprofytickými mikroorganismy a vyskytují se běžně na povrchu potravinářských výrobků a surovin. *Micrococcus luteus* je považován za původce chorob nemocničních pacientů s potlačenou imunitou. Může být zapojen v mnoha infekcích včetně meningitidy, zánětů popálenin či endokarditidy. Je kataláza negativní a oxidáza pozitivní bakterií. Odolává prostředí s nižším obsahem vody a vyšší koncentrací soli, ale v prostředí s 15 % NaCl již neroste. Hydrolyzuje želatinu, ale nezkrvašuje glukózu. Optimální teplota kultivace je 35 °C. [38], [46], [48], [49], [50]

2.2.5 Rod *Pseudomonas*

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou grampozitivní rovné či mírně zahnuté tyčinky, které netvoří spory. Jsou považovány za striktně aerobní, poslední dobou je však toto zařazení diskutováno. Některé druhy mohou používat nitrát jako anaerobní elektronový akceptor, což umožňuje anaerobní růst. Náleží k tzv. nefermentujícím tyčinkám. Jejich pohyb je uskutečňován pomocí bičíků, které jsou povětšinou polárně umístěny. V přírodě jsou velmi rozšířené. Vyskytují se v půdě, na rostlinách, ve vodách, ve stolici lidí i exkrementech zvířat. Kontaminují potraviny. Vzhledem ke svým schopnostem růstu i při 4 °C a širokému enzymovému vybavení, jsou častými původci kažení masa, ryb, mléka, tuků a vajec, u nichž způsobují pachutě, cizí vůně a zbarvení. Nejsou náročné co se týče požadavků na prostře-

dí. Rod *Pseudomonas* se vyznačuje vysokou genetickou variabilitou, což způsobuje zvýšenou adaptabilitu na nejrůznější substráty. Některé druhy pseudomonád dokáží hydrolyzovat chitin. Mnoho druhů tvoří různobarevné pigmenty (např. žluté, zelené, modré, fluoreskující), které uvolňují do prostředí. Jedná se zpravidla o látky fenazinového původu. Z hlediska jejich diagnostiky lze říci, že mezi charakteristické rysy těchto bakterií zařazujeme schopnost syntézy katalázy a oxidázy. Jsou indol- a methyl- negativní. Netvoří acetoin. [38], [40], [51]

Pseudomonas aeruginosa byla dříve označována jako *Bacillus pyocyaneus*. Své původní jméno získala na základě produkce pigmentu pyocyaninu. Běžně se vyskytuje v půdě, vodě a na rostlinných produktech. Tato fluorescenční pseudomonáda je označována jako častý původce nozokomiálních nákaz. *Pseudomonas aeruginosa* je považována za obligátně patogenního mikroba. Je schopna vyvolat zánětlivá onemocnění močových cest, středního ucha, lokální infekce v popáleninách, dokonce i velmi nebezpečné sepse. Je rezistentní vůči mnohým běžně užívaným antibiotikům. Může kontaminovat potravinářské výrobky, vodu povrchovou či upravenou v plaveckých bazénech. Asi 90 % kmenů vytváří toxin A, který je nejedovatějším produktem této bakterie. Na krevním agaru vytváří zónu úplné hemolýzy. Na Endově půdě a MacConkeyho agaru vyrůstá v růžově fialových koloniích s poměrně příjemnou vůní podobnou vůni jasmínu. Starší kolonie ovšem zapáchají amoniakem. *Pseudomonas aeruginosa* je schopna růst i při teplotách nad 43 °C, zatímco nepatogenní druhy z fluorescenční skupiny dokáží růst jen při nižších teplotách. [38], [51], [52]

2.2.6 Rod *Proteus*

Rod *Proteus*, stejně jako níže zmíněné bakterie (*Escherichia*, *Salmonella*, *Citrobacter*), náleží do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jako všechny enterobakterie je schopen užívat nitrát jako alternativní elektronový akceptor. [38]

Bakterie rodu *Proteus* zahrnuje gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinky. Jsou peritrichní a tudíž i vysoce pohyblivé. Nevytváří spory a nemají ani zvláštní nutriční požadavky na růstové prostředí. Vyskytují se v půdě, na rostlinách, ve znečištěné vodě, v exkrementech zvířat a střevním obsahu lidí. Účastní se hydrolytických a hnilobných procesů, jelikož vykazují silnou proteolytickou aktivitu vůči bílkovinným substancím. Na krevním agaru roste v plazivých koloniích. *Proteus* je schopen způsobit záněty močových

cest a sekundární infekce různých poranění a proleženin. Z těchto důvodů je považován za potenciální patogen. Z hlediska biochemického je pro tuto bakterii typická produkce ureázy a sulfanu, kterými se prokazuje na příslušných selektivně diagnostických půdách. Tvoří fenylalanindeaminázu a nezkvašuje glukózu. [38], [39], [40], [53]

Proteus mirabilis je bakterie typická právě plazivým růstem a schopností rychlého pohybu. Na agaru tvoří svým narůstáním vlny. Mezi hustými lemy je půda potažena lesklou vrstvou méně intenzivního biofilmu. Svou roli patogenu hraje hlavně v infekcích močových cest a septikémii. Disponuje početnými faktory virulence (cytotoxiny, hemolyziny, ureáza). Netvoří indol. Nezkvašuje maltózu, ale syntetizuje dekarboxylázu ornitinu. [38], [39]

2.2.7 Rod *Escherichia*

Bakterie rodu *Escherichia* jsou gramnegativní krátké tyčinky. Většina z nich disponuje peritrichózně umístěnými fimbriemi a bičíky. Netvoří spory a fermentují laktózu. Některé kmeny tvoří alfa nebo beta hemolýzu na krevním agaru. Zástupci rodu *Escherichia* osidlují intestinální trakt lidí a teplokrevných zvířat. Tato koliformní bakterie hraje roli v syntéze nutričních faktorů, hlavně vitamínu K a B. Je kompetitivní vůči růstu některých nežádoucích bakterií, jelikož využívá stejné živiny a může také spotřebovávat kyslík (je fakultativně anaerobní). Kmeny *Escherichia* nevyžadují žádné zvláštní nutriety v růstovém médiu. Dokáží existovat všude tam, kde naleznou zdroje uhlíku jako jsou např. sacharidy, aminokyseliny, organické kyseliny apod. Optimální teplota růstu se opět pohybuje okolo 37 °C. [38], [52], [54]

Rod *Escherichia* zahrnuje druhy *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris* a nejprozkoumanější *Escherichia coli* (dále jen *E.coli*). Právě *E. coli* je považována za podmíněně patogenní bakterii, která vyvolává onemocnění močových cest a průjemové infekce u kojenců či malých dětí. Jedná se o její enteropatogenní kmeny, jež jsou schopné způsobit zdravotní komplikace díky produkci enterotoxinu. Vzniklé zdravotní komplikace vyvolávají dehydrataci útlého dětského organismu. Výsledkem může být poškození epiteliálního povrchu střev. Z hlediska patogenity se dále rozlišují enterotoxikogenní skupiny schopné způsobit střevní problémy nejen u dětí, ale i u dospělých. Enteroinvazivní kmeny vyvolávají zase dysenterický syndrom se stopami krve ve stolici a v neposlední řadě enterohemoragické kmeny (nejčastěji sérotyp O157) jsou původci hemo-

ragické kolitidy. Poslední zmíněná skupina je dokonce schopna vyvolat i hemolyticko-uremický syndrom. Kmeny *E.coli* se sérologicky dělí na základě antigenů O, H a K. Antigeny O jsou spojovány se stavbou buněčné stěny, antigeny H s bičíky u pohyblivých kmenů a K s polysacharidickou kapsulí. V závěru stručné charakteristiky lze vyzdvihnout, že *E. coli* byla a stále je významným modelovým organizmem pro fyziologické, biochemické a genetické výzkumy. [38], [52], [55]

2.2.8 Rod *Salmonella*

Salmonella je obligátní patogen. Gramnegativní, nesporulující tyčinky z čeledi *Enterobacteriaceae* jsou původci významné alimentární nákazy salmonelózy. Většinou jde o peritrichózně obrvené a většinou pohyblivé bakterie. Mohou se vyskytovat v řetězcích, dvojicích či samostatně. *Salmonella* zkvašuje glukózu za produkce plynu, ale laktózu ponechává nezfermentovanou. Je schopna tvorby sirovodíku. Těchto znaků se využívá v diagnostice. Proto na Endově půdě a na McConkeyho agaru vyrůstá v podobě bezbarvých kolonií a na půdě obsahující deoxycholát sodný v typických koloniích s černým středem. Z hlediska biochemických vlastností, je kromě již zmíněné fermentace glukózy za tvorby kyselin a plynů, schopna utilizace citrátu, dekarboxylace lyzinu a tvorby amoniaku z močoviny. Po biochemické identifikaci této bakterie se provádí sérotypizace pomocí příslušných antisér. *Salmonella* je typická tím, že vlastní povrchové antigenní struktury. Podstatou patogenity je hlavně její termostabilní endotoxin identický s O-antigenem. Vyskytuje se ubikvitárně. Kontaminuje vody, ovzduší a rostliny. Zdroji infekce lidí je zvláště nedokonale tepelně opracované maso, a to jak drůbeží, tak jiných hospodářských zvířat. Vejce, která pochází z infikovaných nosnic a potraviny z nich vyrobené, mohou být rovněž dalším zdrojem alimentární choroby způsobené touto bakterií. *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sérovar Enteritidis je hlavním původcem salmonelóz u nás. Jedná se o rovné, pohyblivé tyčinky s bičíky, jejichž optimální teplota růstu dosahuje 37 °C. [38], [39], [56]

2.2.9 Rod *Citrobacter*

Dalším rodem, který je zahrnován do čeledi *Enterobacteriaceae*, je *Citrobacter*. A stejně jako bakterie rodu *Escherichia* jsou běžnými obyvateli gastrointestinálního traktu lidí a zvířat. Jedná se o gramnegativní tyčinky, které nejsou sporogenní. Náleží mezi fakultativně anaerobní organizmy. Pohybují se pomocí peritrichně umístěných bičíků. Utilizují citrát

jako zdroj uhlíku. Zkvašují glukózu a další cukry na organické kyseliny a plyn. Jsou oxidáza negativní. Disponují enzymem katalázou. Neprodukují acetoin a ani nejsou schopny dekarboxylovat lyzin. Rozlišují se na základě toho, jestli dokáží měnit tryptofan na indol, fermentovat laktózu a nebo využít malonát. V neposlední řadě je nutné zmínit, že *Citrobacter* je většinou řazen mezi indikátorové mikroorganismy signalizující fekální znečištění. [38], [40], [57], [58]

V praktické části mé diplomové práce jsem k prokázání potenciálního inhibičního účinku fosforečnanových solí využila druh *C. freundii*. Jedná se o bakterii, která se vyskytuje ve vodách (nejen odpadních), v potravinách a v půdě. Zdravotní komplikace může vyvolávat jak u lidí, tak u zvířat. Napadá zvláště močové ústrojí. Stejně tak způsobuje průjmová onemocnění. Je rezistentní vůči ampicilinu a mnoha dalším antibiotikům, což je způsobeno geny kódujícími tuto odolnost v plazmidech. *C. freundii* je z hlediska biochemického kataláza pozitivní. Produkuje sirovodík, ale netvoří lyzin. Neprovádí dekarboxylaci ornitinu. Netvoří ureázu a ani indol. Optimální teplota kultivace je opět 37 °C. [38], [57], [58]

2.3 Inhibiční účinek fosforečnanů na vybrané rody bakterií

Již koncentrace 0,1 % polyfosforečnanových solí v růstovém prostředí významně ovlivní log fázi bakterií rodu *Bacillus*, v níž způsobuje rapidní lyzi a redukcí životaschopných buněk. Ke stejným závěrům došlo i u spor *Bacillus cereus*, kdy 0,1% obsah polyfosforečnanu inhiboval germinaci a vyšší koncentrace (1%) dokonce znemožnily tvorbu klidové formy. Subletální koncentrace 0,05 % způsobila změnu tvaru buněk bacilů protahováním. [25]

Minimální inhibiční koncentrace (Minimum inhibitory concentration, dále jen MIC) *Staphylococcus aureus* u vybraných, do potravin přidávaných fosforečnanů, se pohybuje okolo 0,1 % pro ultrafosforečnan a polyfosforečnan sodný “glassy” (glassy nebo také Grahamova sůl je běžně užívaný název pro směs polymerických metafosforečnanů, dále jen SPG). Avšak pro kyselý pyrofosforečnan sodný, tripolyfosforečnan sodný a pyrofosforečnan tetrasodný téhož účinku dosahuje až zhruba při hodnotě 0,5 %. MIC u polyfosforečnanů s delším řetězcem byla podstatně nižší než u kratších. Z daného zjištění vyplývá, že fosforečnany s delším řetězcem mají silnější antibakteriální účinky na zástupce daného rodu bakterií. Hexametaposforečnan a určité druhy polyfosforečnanů mají MIC již v hodnotách necelého jednoho procenta a disponují nejvyšším antibakteriálním efektem

mezi zkoušenými polyfosforečnanů. Hexametaposforečnan způsobuje vytékání hořčíku z buněčné membrány do média a zvyšuje únik aminokyselin nebo nízkomolekulárních nukleových kyselin do neionizované vody. Tím dochází k porušení selektivní permeability membrány *S. aureus*. [26], [59]

Suplementace růstových médií hořečnatými ionty dokáže zvrátit inhibiční účinek polyfosforečnanů. Tripolyfosforečnan v koncentraci 0,5 % nepůsobily inhibičně na *Staphylococcus aureus* v prostředí obsahujícím tyto kovové ionty. Částečně byla inhibice eliminována přidávkou vápenatých a železnatých iontů. Zinečnaté a manganaté ionty toto působení neprokázaly. [36]

Rody *Enterococcus* a *Micrococcus* náleží také ke grampozitivním bakteriím, tudíž je možné předpokládat, že stejně jako u výše jmenovaných bacilů a stafylokoků dojde působením fosforečnanových solí zvláště delších řetězců k inhibici růstu. [60]

Gramnegativní mikroorganismy, kromě rodů *Escherichia*, *Salmonella* a *Pseudomonas*, jsou nepříznivě ovlivněny přidávkou alkalických polyfosforečnanů. Grampozitivní bakterie, kromě rodu *Staphylococcus* a *Listeria*, jsou náchylné k působení alkalických nebo neutrálních polyfosforečnanů. Specifické polyfosforečnanů (např. SPG) jsou efektivnější. Inhibiční účinek způsobí koncentrace v rozsahu 0,05-3 %. [60]

Gramnegativní bakterie, jak již bylo zmíněno, nejsou povětšinou spojovány s účinkem fosforečnanových solí (byť by šlo o jejich polymerní formy). V závěru jedné studie je ale uvedeno, že fosforečnan trisodný (dále jen TSP) je schopen zvýšit citlivost těchto bakterií vůči lysozymu a nizinu. Výsledky ukázaly, že vysoké koncentrace TSP, nutné pro úspěšnou dekontaminaci povrchu drůbeží kůže a ostatních potravin, mohly být výrazně redukovány přidáním lysozymu nebo nizinu. V rámci této studie byla zjištěna skutečnost, že TSP disponuje jistým mikrobicidním účinkem, který je zaměřen na gramnegativní a sporulující bakterie. Inhibiční schopnost jmenované soli spočívá v natržení cytoplazmatické membrány. Tudíž je možné, že disrupce u gramnegativních bakterií rozruší vnější membránu a způsobí lepší přístupnost dalších látek s antimikrobním účinkem (jako je např. nizin a lysozym). Autoři výzkumu využívali suspenze buněk bakterií *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* a *Salmonella enteritidis*. *Salmonella enteritidis* byla na danou kombinaci látek velmi citlivá. Letalita dosahovala až 99,9%. [62]

TSP používaný na ošetření syrového drůbežního masa účinně inhibuje růst *Escherichia coli* O157:H7 a jistý vliv má dokonce i na *Salmonella* Typhimurium. Bakterie *Escherichia coli* byla velmi citlivá. Zcela destruktivně na ně působila již 1% koncentrace. U salmonel stejná koncentrace vyvolala pouze redukci počtu životaschopných buněk. Omezení růstu způsobila až 4 % soli TSP. [63]

Kombinace pyrofosforečnanu s modifikovanou atmosférou (80 % CO₂, 10 % N₂) v balení chlazeného rybího masa, skladovaného při 4 °C, se projevila jako velmi účinná možnost prodloužení trvanlivosti. Mimo jiné zvláště inhibičně působila i proti již zmíněné patogenní *Escherichia coli*. Redukovala počty životaschopných buněk či v některých případech zcela inaktivovala. [64]

Jiná studie uvedla, že TSP dokáže potlačit rozvoj bakterií rodu *Salmonella* na chlazených kuřatech, které byly ponořeny do 10% roztoku této soli. Vysoké pH během aplikace TSP zapříčiní poškození membrány a zničení *Salmonella* Enterica. Uvedený závěr vychází z testů, při kterých byly sledovány bakteriální buňky ovlivněné TSP při normálním a alkalickém pH (konkrétně pH 10-11). Při vyšších hodnotách pH i koncentrace TSP buňky ztrácely životaschopnost. [65]

Destruktivní působení záhřevu na salmonelu posiluje přídavek polyfosforečnanu, zvláště tripolyfosforečnanu sodného. Zvýšení citlivosti závisí samozřejmě na složení zahřívajícího média a vybraném kmenu. [66]

Polyfosforečnany společně s kuchyňskou solí pravděpodobně způsobují antibakteriální aktivitu komerčních marinád užívaných pro úpravu zvláště drůbežního masa. *Salmonella* Typhimurium byla působením daného složení inhibována. [67]

SPG je spojován s inhibičním účinkem na pseudomonády až od koncentrace 10 %. Antimikrobní působení fosforečnanů u tohoto rodu obecně vyvolává změna pH a podporuje ho chelatace iontů mající strukturální funkci ve složení buněčné stěny. Bylo zjištěno, že 1% čistý fosforečnan nebo směs tripolyfosforečnanu a pyrofosforečnanu tetrasodného ve složení 75 % a 25 % dokáže inhibovat nefluorescentní kmeny rodu *Pseudomonas*. Fluorescentní pseudomonády naopak překonávají působení fosforečnanů tím, že produkují pyoverdín, který je typický přirozenou schopností navazovat se na kovové ionty. Je tedy prav-

děpodobné, že uvedený pigment soutěží v chelataci s fosforečnanovými solemi a tím pádem tlumí inhibiční projevy jmenovaných solí. [4]

U rodů *Proteus* a *Citrobacter* nebude předpokládán inhibiční účinek fosforečnanů až tak jistý. Doposud se těmito bakteriemi, z hlediska antimikrobního působení fosforečnanů, mnoho výzkumů nezabývalo. Lze ale uvažovat, že při vyšších koncentracích dojde k ovlivnění růstových schopností jmenovaných gramnegativních bakterií.

2.4 Působení fosforečnanů na kvasinky a plísně

Fosforečnany mohou inhibovat i kvasinky a plísně. Na rozdíl od antibakteriálního účinku inhibice růstu plísni není příliš objasněna. Je zde předpoklad, že zasahují do určitých metabolických procesů. Ve stěnách těchto mikroskopických hub jsou totiž též anionaktivní polymerní struktury jako např. chitin, chitosan a glykoproteiny, které jsou schopny vázat dvojmocné kationty. [4], [36]

Na většinu kvasinek izolovaných z ovocných džusů, ze sýrů a z povrchů venkovních rostlin působila inhibičně již koncentrace do 1,5 % polyfosforečnanových solí (složených z 20-ti až 15-ti ortofosforečnanových jednotek) v prostředí. Kvasinky, na jejichž růst byl sledován účinek solí i o nižším kondenzačním stupni (tripolyfosforečnan sodný, tripolyfosforečnan - vysoce rozpustný, neutrální pyrofosforečnan, kyselý pyrofosforečnan sodný), byly inhibovány až při koncentracích vyšších než 1,5 %. Druhy kvasinek, u kterých byl zkoumán vliv daných solí, byly: *Candida humicola*, *Geotrichum penicillatum*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida famata*, *Geotrichum* sp., *Cryptococcus heveanensis*, *Cryptococcus albidus*, *Brettanomyces custersii*, *Brettanomyces intermedius* a velmi na fosforečnanovou sůl citlivá kvasinka *Trichosporon cutaneum* (již 0,3% koncentrace polyfosforečnanů a přídavky do 1% koncentrace ostatních fosforečnanů o nižším kondenzačním stupni úspěšně inhibovaly její růst). [68]

V jedné ze studií Iowské univerzity byl pozorován růst plísně *Aspergillus flavus* na médiích obsahujících různé druhy fosforečnanů. Výzkum byl doplněn o sledování vlivu přídavků kovů (hořčík, mangan, zinek, vápník) na inhibiční účinek fosforečnanů. *Aspergillus* byl kompletně inhibován na médiu obsahujícím 1 % různých alkalických polyfosforečnanů. Přídavek hořčíku stimuloval růst *A. flavus* i v přítomnosti pyrofosforečnanu tetrasodného (TSPP). Stejně tak manganaté ionty zase dovolily růst této plísni v přítomnosti hexameta-

fosforečnanu sodného. Ortofosforečnany, které mají malý chelatační potenciál, na *Aspergillus flavus* neměly žádný vliv. [36]

Bylo zjištěno, že ponoření čerstvých třešní do 10% roztoku hexametrafosforečnanu sodného, tripolyfosforečnanu sodného, pyrofosforečnanu tetrasodného nebo tetrapolyfosforečnanu sodného výrazně omezí či zpomalí kažení plísněmi jako je *Penicillium expansum*, *Rhizopus nigricans* nebo *Botrytis ssp.* [69]

TSPP, polyfosforečnan sodný a SPG (samostatně či ve směsi) působí zcela inhibičně na růst plísně rodu *Aspergillus*, konkrétně *A. flavus* a *A. parasiticus*, při 2 % TSPP, 1 a 2 % SPG a 2 % komerčního fosforečnanu v kultivačním médiu. Nižší koncentrace fosforečnanů dovolila pouze limitovaný a atypický micelární růst. Sporulace byla inhibována rovněž 2% koncentrací výše jmenovaných solí. TSPP nebo SPG již při 1 % v prostředí redukuje množství aflatoxinu z miliontiny na biliontinu. [69]

V souvislosti s neutrálním a alkalickým pH jsou plísně rodu *Aspergillus* (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*) a *Fusarium* (*Fusarium poliferatum*) rezistentní vůči jejich působení. Fosforečnanové soli jsou naopak velmi účinné na plísně *Byssochlamys* a *Penicillium*. Důležitý poznatek, co se týče účinků fosforečnanů na plísně, spočívá hlavně v podstatném snížení produkce mykotoxinů. [4], [36]

3 ZJIŠŤOVÁNÍ RŮSTOVÝCH KŘIVEK BAKTERIÍ OPTICKOU METODOU

3.1 Růstové křivky bakteriální populace

Růstová křivka je grafickým vyjádřením růstu bakterií v podmínkách statické kultivace. Představuje funkční závislost logaritmu stoupající koncentrace buněk resp. počtu živých buněk na čas. Křivky získané pro různé bakterie za různých okolností mají jisté společné a obecně platné znaky. Jsou charakteristické určitými úseky, které lze nazývat růstovými fázemi. Analýzu obecných vlastností množení bakteriální populace je možné provést za jistých podmínek, a to sice: jedná-li se o čistou bakteriální kulturu geneticky totožných buněk, rostou-li v tekutém živném roztoku uměle připraveném, zpravidla zcela nebo z větší části chemicky definovaném a je-li celý systém uzavřený vůči okolí co do koncentrace svých složek. Přičemž jsou fyzikální parametry kultivačního zařízení udržovány konstantní. Zvýšení počtu buněk je ovlivněno disponibilními zdroji živin a kumulací produktů metabolismu v daném prostředí. [27]

Obecně jsou rozeznávány čtyři fáze:

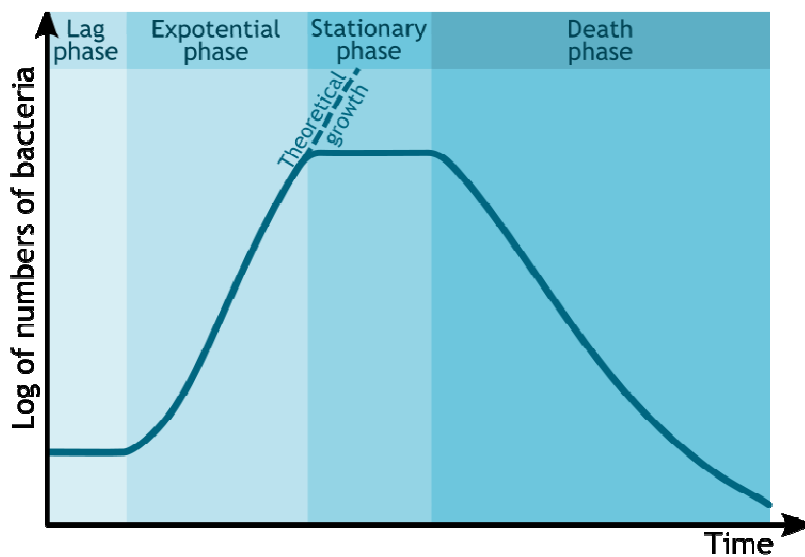
První fáze, lag-fáze, je fází přípravnou charakterizovanou tím, že bakterií zatím nepřibývá, ba někdy dokonce ubývá. Příčina daného jevu spočívá jednak ve specifické adaptaci buňky na nové prostředí, v aktivaci enzymatického systému a také v potřebné době pro nahromadění dostatečného množství intermediárních metabolitů, a to zejména v minerálním médiu a při malém inokulu. Přípravná fáze může chybět, jestliže je velké inokulum exponenciálně rostoucí kultury přeneseno do bohatého média stejného složení. Doba trvání lag fáze je ještě prodloužena v případě potřeby přestavby klidové buňky (spory) v buňku exponenciálně rostoucí. Za tento časový interval je ve většině literárních zdrojů zařazována další fáze zrychleného růstu, kdy jsou již buňky přizpůsobené, mají velkou intenzitu metabolismu a rychlost dělení. [27], [70]

Druhá fáze, exponenciální nebo též logaritmická, je chápána jako doba, kdy probíhá intenzivní množení bakterií a populace dosahuje exponenciálního růstu, jehož zákonem je geometrická řada s kvocientem 2. Růst bakteriální populace je mnohonásobné množení bakte-

riální buňky metodou binárního dělení za vzniku dvou nových jedinců, které se opakuje. Z jedné bakterie vznikají dvě, ze dvou pak čtyři a ze čtyř osm bakterií atd. [27], [68]

Průměrná generační doba je zde konstantou a nezávisí na počtu buněk. Buňky se chovají navzájem nezávisle. Zároveň lze konstatovat, že v této fázi prakticky nedochází k odumírání. Rychlost růstu bakteriální populace je závislá na druhu bakterie a její vnitřní genetické determinaci, na chemickém složení média, či na koncentraci nepostradatelné živiny a fyzikálních faktorech prostředí (teplota, pH, iontová síla, osmotický tlak apod.). Fáze zpomaleného růstu, která je typická snížením intenzity metabolismu a množení buněk v důsledku vyčerpání živin a hromadění metabolitů, je opět jistou mezifází, která vyústí v třetí fázi stacionární. Pokud je přechod exponenciální fáze do fáze stacionární způsoben vyčerpáním jedné limitující živiny je přechod náhlý. V každém živném médiu je jedna z živin v relativně nejnižší koncentraci, i když třeba nevíme, která to je. Fyziologie buněk nacházejících se ve stacionární fázi díky vyčerpání limitující živiny je charakterizována nejprve nevyváženým růstem, pak přestavbou enzymového vybavení a posléze relativním metabolickým klidem. Maximální délka této fáze je dána citlivostí buněk k hladovění. Druhý důvod přechodu do stacionární fáze je pozvolný, neboť jsou příčiny komplexnější. Dochází ke zvyšování koncentrace zplodin metabolismu, které mohou být pro bakterie v jistých koncentracích až toxické. Patří sem zvýšený obsah neúplně oxidovaných uhlíkatých sloučenin, nejčastěji různých alkoholů a organických kyselin, které mohou měnit nežádoucím způsobem životní podmínky bakterií. U organických kyselin se jedná o změnu pH. Dalšími limitujícími faktory jsou redoxní potenciál, množství dostupného kyslíku a oxidu uhličitého. [27], [70]

Po jisté době dochází k fázi postupného odumírání, kterou lze charakterizovat rychlostí hynutí bakterií. Za mrtvou bakterii je považována hladovějící nerostoucí bakterie, která není dále schopná dělení. Příčinou je destrukční působení fyzikálních a chemických faktorů na biomolekuly, které není dostatečně kompenzováno procesy reparace. Buňky se snaží i nadále zachovávat životaschopnost a tvoří enzymy, které dovolují využít alternativních živin a odbourávají zásobní látky. Tento stav může trvat týdny i měsíce. [27], [70]



Obr. 2 Růstová křivka bakterií [71]

3.2 Optická metoda stanovení růstové křivky bakterií

Pro stanovení růstových křivek byla z hlediska analytického zvolena metoda turbidimetrie, která je jednoduchou, poměrně přesnou a nedestruktivní možností. Turbidimetrie je založena na měření procházejícího světla, které bylo zeslabeno rozptylem a částečně i jeho rozptylem na částicích. V našem případě jsou částice nahrazeny buňkami bakterií suspendovanými v tekutém kultivačním médiu. Ty jsou schopny absorpce záření o určité vlnové délce v opticky neaktivním prostředí. Daný efekt způsobují chromoforické skupiny obsažené v mikroorganizmech (složky buňky). Prošlé záření má díky těmto jevům nižší intenzitu, než dopadající, které udává světelný zdroj. [72], [73]

Bakteriální suspenze se při vlnových délkách viditelného světla jeví jako mléčně zakalená. Lze uvést, že s nárůstem buněčné hmoty, dojde ke zvětšení zákalu, tudíž i k postupné změně intenzity prošlého záření. Pomocí této metody můžeme vysledovat růstové chování bakterií, protože se průběh optické hustoty během kultivace v mikrotitračních destičkách s časem mění. [73], [74], [75]

Běžná praxe v bakteriologii je pro měření turbidity použit každý dostupný kolorimetr nebo spektrofotometr. Ideální je takový přístroj, který měří primární paprsek světla procházející vzorkem bez vychýlení do fotocely. Fotometr pro tyto účely musí být konstruován s úzkým paprskem světla, tak aby rozptyl směřoval přímo do fotocely. Přístroj musí mít vyváženou optiku. [48]

Pokud světlo prochází suspenzí s větším množstvím bakteriální hmoty, bude mít na výstupu nižší intenzitu. Při malém zákalu se jedná o jednoduchý geometrický vztah. Míra rozptýleného záření se sníží exponenciálně s nárůstem bakterií. Geometrický vztah mezi turbiditou a počtem bakterií může být vyvozen z úvah, že suspenze bakterií redukuje intenzitu prošlého záření na desetinu původní intenzity zdroje. To lze matematicky vyjádřit jako

$$I = I_0 \cdot 10^{-W/W_{10}},$$

kde I je intenzita nerozptýleného světla, I_0 intenzitou dopadajícího záření násobená $10^{-W/W_{10}}$, kde W_{10} je koncentrace bakterií, která je dána desetinásobným poklesem intenzity světla. Když použijeme logaritmus na obě strany rovnice, vzorec je možno vyjádřit takto: [48]

$$-\log I/I_0 = \log I_0/I = W/W_{10}.$$

Podobný zákon, Lambert-Beerův, platí pro absorbanci záření čirými barevnými vzorky:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot L = \log(100/T) = \log I_0/I,$$

kde ε je molární absorpční koeficient látky, c je koncentrace látky a l je délkou optické dráhy. T je transmitance, která udává poměr zářivého toku propuštěného vzorkem ku zářivému toku, jež do vzorku vstupuje. Zákon je limitován. Pro dokonale nepropustný vzorek platí $T=0\%$, což znamená $A=\infty$. Naopak pro dokonale propustný vzorek $T=100\%$ je $A=0$. Hlavně tedy v oblastech s vyšší koncentrací analytu je platnost tohoto zákona omežována odchylkami a závislost absorbance na koncentraci pak není lineární. Měření je následovně zcela nepřesné ba dokonce nemožné. [76]

Lambert-Beerův zákon může být tedy odvozen stejnou cestou, jako výše uvedený matematický vztah pro turbidimetrii. Proto mnoho přístrojů disponuje stupnicí, na které lze přímo odečíst $\log I_0/I$, tedy absorbanci. Většinou se ale setkáváme s optickou densitou (OD), která je mnohem obecnějším termínem a je vhodná jak pro zakalené suspenze, tak pro absorbující. V této metodě měření se kombinuje rozptyl s absorbancí. Optická hustota je absorbance daného optického elementu při dané vlnové délce λ na jednotku vzdálenosti. Pro optickou hustotu platí:

$$OD_\lambda = A_\lambda / L = -1/L \cdot \log T = 1/L \cdot \log(I_0 / I),$$

kde OD je optická hustota při dané vlnové délce λ , A je absorbance, L je délka optické dráhy, I_0 je intenzita dopadajícího světla a I intenzita prošlého záření. [48], [77], [78]

V souvislosti s turbidimetrií lze uvést, že je optická hustota rovna :

$$OD_{\lambda} = \log(I_0/I) = \tau \cdot L \cdot W,$$

kde I_0 je opět intenzita dopadajícího světla, I intenzitou prošlého záření, τ je turbiditní koeficient, L je světelná dráha kyvetou a W koncentrace buněk. Oba vztahy jsou si podobné a jelikož měření probíhá při vlnové délce 600 nm, která spadá do viditelné oblasti spektra, tak se někteří autoři uchylují k označování této „mikrobiologické“ metody jako spektrofotometrické stanovení založené na turbidimetrickém měření. [72], [74], [75]

OD se často využívá, protože v mikrobiologii představuje jednoduchou metodu k určení koncentrace počtu buněk ve zředěné suspenzi. V jistém rozsahu platí přibližně lineární vztah mezi koncentrací buněk a OD. [77], [78]

Pro pochopení praktických důsledků této metody platí přibližné pravidlo, že hmotnostní koncentrace sušiny bakterií je přímo úměrná absorbanci. [48]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE PRÁCE

Cíle předložené práce byly vymezeny následovně:

- stanovit inhibiční účinky komerčně využívaných fosforečnanů lišících se délkou řetězce a koncentrací na vybrané grampozitivní a gramnegativní bakterie.
- porovnat a zhodnotit inhibiční růstový účinek daných fosforečnanových solí.
- výsledky statisticky vyhodnotit a na základě teoretické části formulovat závěry o působení fosforečnanů na testované bakterie.

5 PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY

Analytické váhy KERN 440-47 N, Německo

Autokláv Varioklav H+P, Německo

Automatické mikropipety Hirschmann, Německo

Automatické mikropipety Nichipet EX, Japonsko

Biohazard box EUROFLOW (Clean Air), Holandsko

Biologický termostat BT 120, Česká republika

Fotometr TECAN Sunrise TW/TC, Rakousko

Chladnička Electrolux

Laboratorní plasty (špičky pro automatické mikropipety, mikrotitrační destičky, očkovací kličky)

pH-metr GRYP 208L, Česká republika

Vortex Heidolph, Reax top, Německo

Laboratorní sklo

Ostatní běžné laboratorní pomůcky a vybavení

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Materiál

6.1.1 Použité mikroorganismy

Pro dosažení cílů této práce byly využity následující kmeny gram pozitivních a gram negativních bakterií, které byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM):

Bacillus cereus CCM 2010

Bacillus subtilis subsp. *subtilis* CCM 2216

Citrobacter freundii CCM 7187

Enterococcus faecalis CCM 4224

Escherichia coli CCM 3954

Micrococcus luteus CCM 732

Proteus mirabilis CCM 7188

Pseudomonas aeruginosa CCM 3955

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

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* CCM 3953

Všechny používané bakteriální kmeny byly uchovávány na Petriho miskách při teplotě 4 ± 2 °C a byly přeočkovávány po 3 – 4 týdnech.

6.1.2 Kultivační půdy

Pro uchovávání kultur bakterií byl použit masopeptonový agar (MPA), který byl připravován následovně:

Beef extract (HiMedia) 3,0 g

Pepton (HiMedia) 5,0 g

Agar..... 15,0 g

NaCl (Lach-Ner) 5,0 g

destilovaná voda 1000 ml

Konečné pH (při 25 °C) $6,8 \pm 0,2$

Pro přípravu inokula určeného k vlastnímu stanovení inhibičních účinků daných fosforečnanových solí bylo použito masopeptonového bujónu (MPB), jehož složení bylo následující:

Beef extract (HiMedia)	3,0 g
Pepton (HiMedia)	5,0 g
NaCl (Lach-Ner)	5,0 g
destilovaná voda	1000 ml
Konečné pH (při 25 °C) 7± 0,2	

Obě živné půdy byly sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut.

6.1.3 Zásobní roztoky fosforečnanových solí

Za účelem zjištění inhibičních účinků sedmi komerčních fosforečnanových solí byly připraveny jejich 10% roztoky rozpuštěním příslušné navážky v destilované vodě. Následovně byly vysterilizovány v autoklávu a uchovávány v uzavřených nádobách při pokojové teplotě. Jednalo se o soli:

HEXA 68	polyfosforečnan, jehož vzorec není přesně znám
HEXA 70	polyfosforečnan, jehož vzorec není přesně znám
TRIKRYSTAL.....	zásaditý ortofosforečnan sodný ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$)
DIDI.....	dihydrát hydrogenfosforečnanu (di)sodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
KPS	kyselý pyrofosforečnan sodný ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$)
FST.....	tripolyfosforečnan sodný ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$)
PYRO 52.....	zásaditý pyrofosforečnan sodný ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$)

6.2 Metody

6.2.1 Příprava bakteriální suspenze

Bakteriální suspenze byly připraveny zaočkováním a následnou kultivací příslušných pěti gram pozitivních a pěti gram negativních bakterií v 3 ml MPB ve zkumavkách. Inokulum pocházelo z bakteriálních kultur uchovávaných na Petriho miskách. Kultivace bakterií v tekutém médiu probíhala v termostatu při 30 °C po dobu 24 hodin.

6.2.2 Sledování účinku fosforečnanových solí na vybrané potravinářsky významné bakterie

Byl sledován vliv fosforečnanů na růst vybraných bakterií. Pro tyto účely bylo použito sedmi druhů solí v různém kondenzačním stupni (HEXA 68, HEXA 70, TRIKRYSTAL, DIDI, KPS, FST, PYRO 52). Pro zjištění senzitivity jednotlivých bakteriálních kmenů bylo využito devíti koncentrací každé soli (0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%; 0,75%; 1,0; 2,0% w/v). Roztoky fosforečnanových solí byly v příslušném množství přímo dávkovány do zkumavek s odpovídajícím množstvím sterilního masopeptonového bujónu do celkového objemu 3 ml. Takto připravená kultivační média s různou koncentrací fosforečnanů byla rozpipetována v množství 200 µl do jamek mikrotitrační destičky a zaočkována 5 µl suspenze bakterií. Destička byla přichystána tak, aby bylo možné hodnoty měřit duplicitně tzn., že byly vedle sebe umístěny dvě stejné koncentrace pro jednu bakteriální suspenzi. Stejně tak byla uskutečněna i pozitivní a negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola posloužilo čisté kultivační médium, kde nebyly obsaženy roztoky fosforečnanů, tudíž ani nebyly předpokládány žádné inhibiční účinky na růst zaočkovaných bakterií. Negativní kontrola byla tvořena pouze připraveným MPB s fosforečnanem bez bakteriální suspenze. Zde nebyl žádný nárůst mikroorganismů očekáván. Testované bakterie byly kultivovány při teplotě 25±1 °C za občasného protřepávání po dobu 24 hodin.

Bakteriální nárůst, resp. změna optické denzity, byla měřena na přístroji TECAN Sunrise TW/TC (TECAN, Rakousko) při vlnové délce 600 nm v 30-ti minutových intervalech. Před měřením byly vzorky protřepávány po dobu 10-ti sekund. Měřicí přístroj disponuje softwarem pro komplexní redukci dat MegallanTM, pomocí něhož byl TECAN řízen.

Pro sestrojení křivek byly vypočítány průměry hodnot optické hustoty v jednotlivých jamkách. Ty byly porovnány s průměrnými hodnotami naměřenými u negativní kontroly. Sestrojené křivky byly využity ke zjišťování růstových konstant.

Byly vypočteny logaritmy OD v čase t oproti hodnotám OD v čase 0: $[y = \ln(OD_t / OD_0)]$

Růstové křivky byly znázorněny jako závislost výše uvedeného logaritmu na čase kultivace. Pro výpočet růstových parametrů (μ_m , λ) z hodnot ležících v logaritmické fázi růstových křivek podle Gompertzova modelu byla použita nelineární regresní analýza s Marquardtovým algoritmem (konkrétně metoda Marquardt-Levenburgova za podmínek $\mu_m > 0$ a pro $\lambda > 0$). Gompertzův model růstové křivky [79]:

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

kde: μ_mmaximální růstová rychlost [h^{-1}]

λlag fáze [h]

Aasymptota, maximální dosažená hodnota ($A = \ln(N/N_0)$, kde N ...počet organismů)

Další růstové parametry, které lze vypočítat z hodnot optické hustoty v logaritmické fázi růstové křivky [80]:

Průměrná rychlost dělení: $R = 1/\log 2 \cdot (\log x - \log x_0) / (t - t_0)$ [h^{-1}]

Průměrná generační doba: $G = 1/R$ [h]

Specifická růstová rychlost: $\mu = 0,693/G$ [h^{-1}],

kde: x_0počáteční množství biomasy v čase t_0 , xkonečný počet buněk v čase t ,
 tdoba růstu

6.2.3 Stanovení pH kultivačního prostředí

Byly změřeny hodnoty pH růstového prostředí bakterií, které bylo tvořeno roztoky solí s MPB. Zjišťováno bylo pH pro každou sůl v koncentraci 0,4 % a 1 %. Měření bylo prováděno při laboratorní teplotě pomocí pH-metru, který byl před měřením řádně nakalibrován pufrů (pH 4,01; pH 7,01).

7 VÝSLEDKY

7.1 Vliv jednotlivých solí na růst a růstové parametry vybraných bakterií

Byl sledován vliv sedmi fosforečnanových solí v odlišném stupni kondenzace na růst vybraných gram pozitivních a gram negativních bakterií. Byly zkoumány inhibiční účinky různých koncentrací fosforečnanů (0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,75 %, 1,0 %, 2,0 %) přidanych do kultivačního prostředí. Vyhodnocení působení solí na mikroorganismy probíhalo sledováním průběhu růstových křivek a změn růstových parametrů (délka lag fáze, maximální hodnota nárůstu buněk, délka generační doby, růstová rychlost). V grafech i tabulkách upravených Gompertzovou modulací jsou uváděny výsledné hodnoty pouze pro koncentrace solí, u nichž byl zaznamenán nárůst sledovaných bakterií. Danou metodou vypočtené růstové parametry jsou umístěny v tabulkách v příloze této práce.

Bylo změřeno pH kultivačního prostředí v přítomnosti fosforečnanových solí v koncentraci 0,4 a 1 %. V následující tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty pH.

Tab. 1. Hodnoty pH kultivačního prostředí

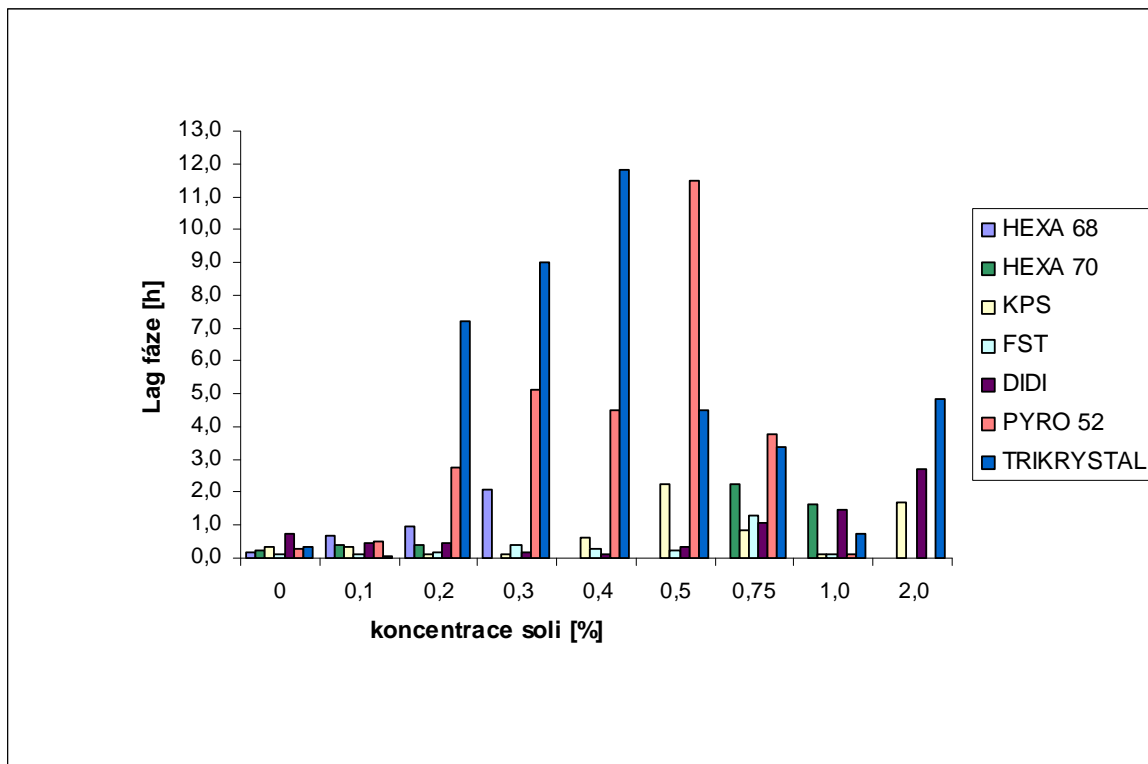
Sůl	pH	
	0,40%	1%
HEXA 68	5,85±0,01	5,61±0,01
HEXA 70	5,63±0,02	5,36±0,02
FST	7,67±0,01	7,81±0,01
PYRO 52	8,51±0,01	8,80±0,01
TRIKRYSTAL	11,18±0,01	11,27±0,01
KPS	5,58±0,01	5,34±0,02
DIDI	7,78±0,01	7,83±0,01

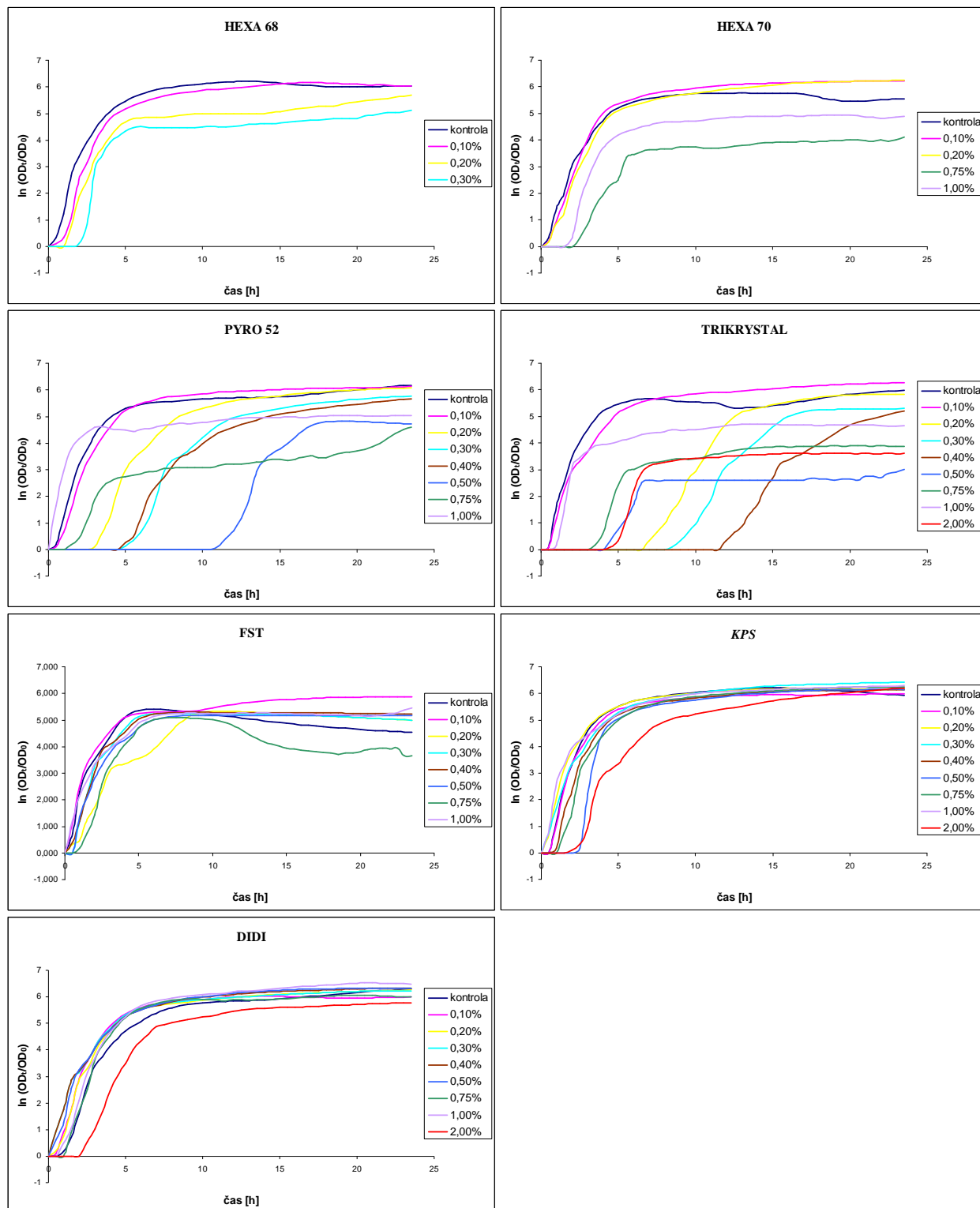
7.1.1 Vliv fosforečnanových solí na růst *Bacillus cereus* CCM 2010

Z průběhu křivek a z růstových parametrů je patrné, že se zvyšující se koncentrací fosforečnanové soli HEXA 68 v kultivačním prostředí docházelo k postupné inhibici růstu. Prodlužovala se doba lagu a generační doba, naopak rychlost růstu se snížila. Koncentrace, při které již nebyl *Bacillus* schopen růstu byla stanovena na 0,4 % (Obr. 3, 4). Obdobného účinku bylo dosaženo i u další polyfosforečnanové soli HEXA 70, kdy ovšem byly bakterie

zcela inhibovány koncentracemi vyššími než 0,3 % fosforečnanových solí v růstovém bujónu. Inhibičně také působily soli o nižším kondenzačním stupni. Jednalo se hlavně o fosforečnany PYRO 52 a TRIKRYSTAL. Zásaditý pyrofosforečnan snižoval účinně nárůst této bakterie od koncentrace 0,5 %. Nižší koncentrace této soli, stejně jako u TRIKRYSTAL (Obr. 4), prodlužovaly dobu lagu (Obr. 3), ale ve výsledku růstové křivky dosáhly obdobných maximálních hodnot nárůstu jako u kontroly. Od 0,5 % fosforečnanu TRIKRYSTAL v MPB pak došlo ke snížení maximální hodnoty růstu a také vzrostla doba lagu (vyjma 1% koncentrace). Přídavek FST do kultivačního prostředí ve většině případů způsobil prodloužení lag fáze dané bakterie, ale až v 2% koncentraci působil zcela inhibičně. U solí KPS a DIDI nelze hovořit o silném inhibičním účinku ani u nejvyšší koncentrace 2 %, která nárůst *Bacillus cereus* pouze mírně snížila (Obr. 4), a při níž došlo k prodloužení doby lagu (Obr. 3). U soli DIDI je možné tento jev sledovat již od koncentrace 0,75 %. U KPS zase od této hodnoty dochází ke snížení rychlosti růstu (příloha PII).

Obr. 3. Vliv fosforečnanů na délku lag fáze *Bacillus cereus* CCM 2010



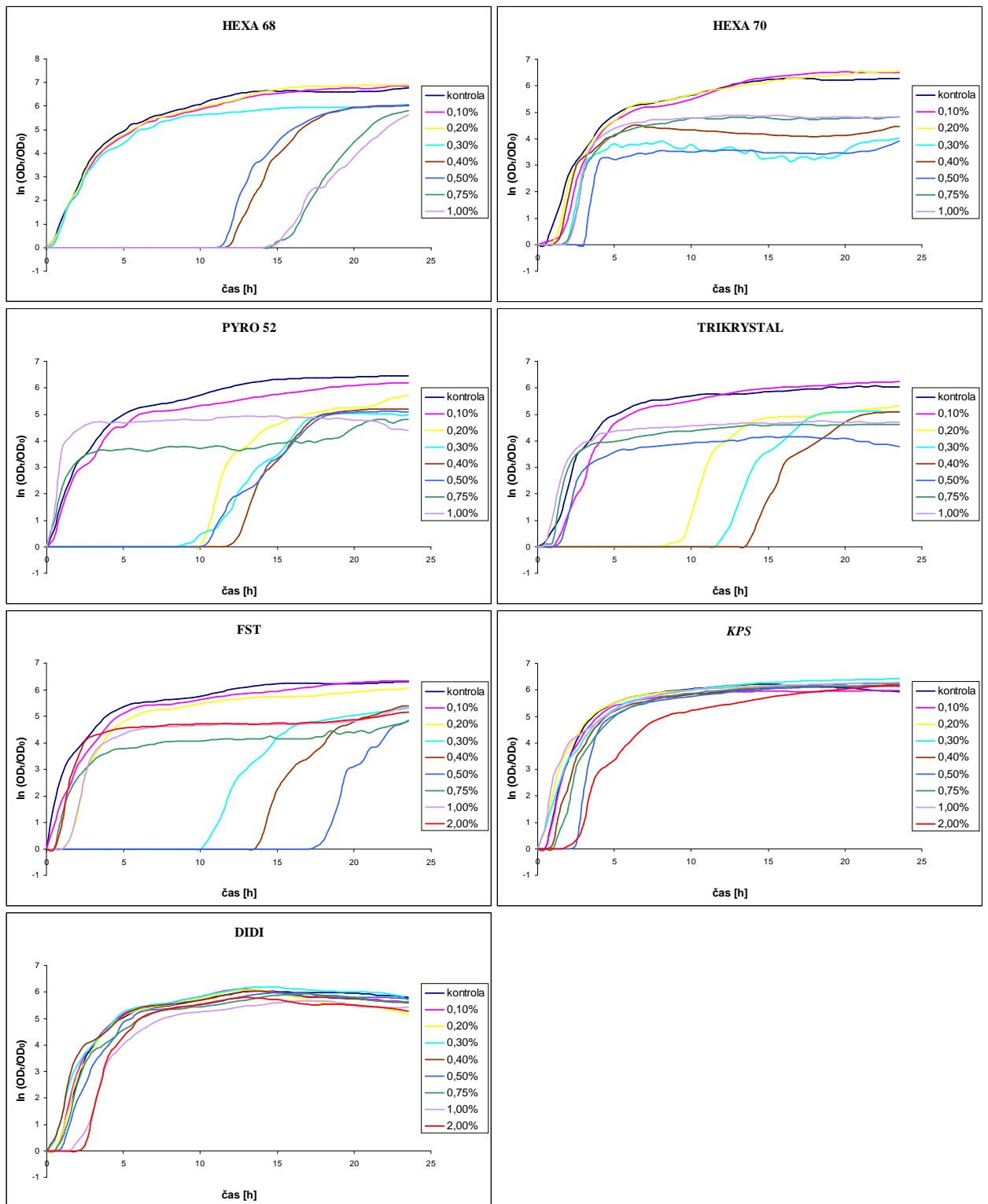
Obr. 4. Vliv fosforečnanových solí na růst *Bacillus cereus* CCM 2010

7.1.2 Vliv fosforečnanových solí na růst *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CCM 2216

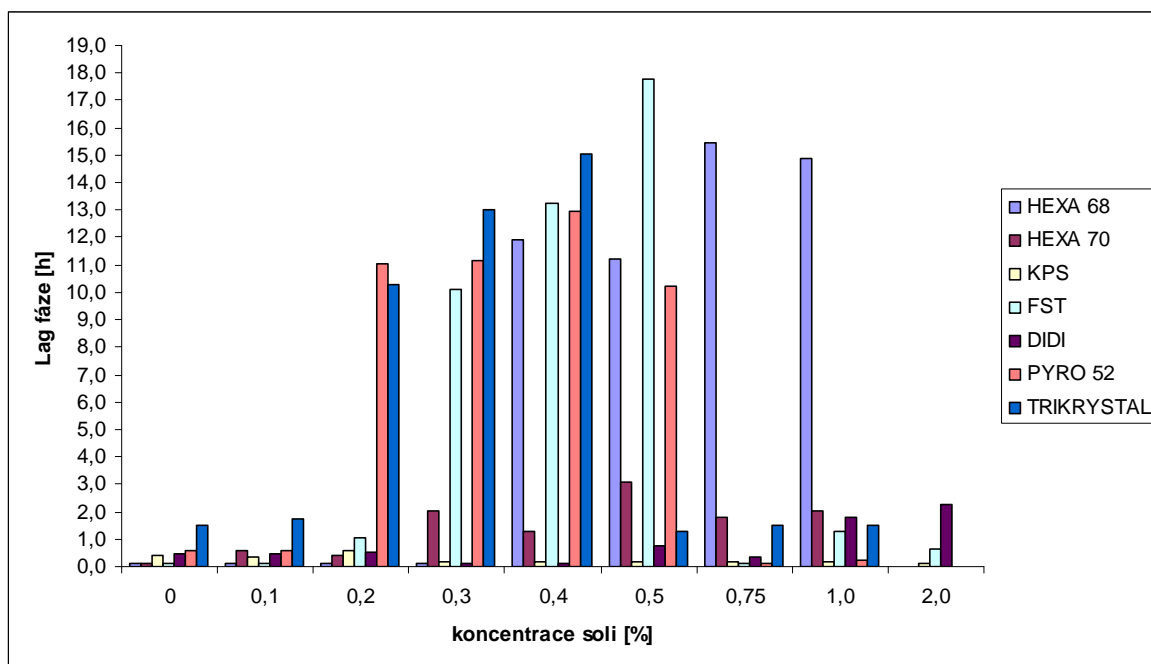
Z průběhu růstových křivek lze vyvodit, že se inhibiční efekt na růst této bakterie projevuje v závislosti na zvyšující se koncentraci soli HEXA 68 (Obr. 5). Bylo zjevné, že s rostoucím množstvím fosforečnanu dochází jednak k poklesu maximální hodnoty růstu, ke zdatelnému prodloužení doby lagu (Obr. 6) či k prodloužení generační doby (příloha PII), a to již od koncentrace 0,4 %. Při hodnotě 2 % v prostředí nebyl *Bacillus subtilis* schopen žádného významného množení. Sůl HEXA 70 působila odlišně. Koncentrace 0,3 až 0,5 % poměrně výrazně snížily množení a prodloužily dobu lagu dané bakteriální populace. 0,75% a 1% obsah soli HEXA 70 v kultivačním médiu, ale opět jistý nárůst zaznamenal. Celkově ale lze již od koncentrace 0,1 % vysledovat prodlužování lag fáze (Obr. 6).

Zásadité soli TRIKRYSTAL a PYRO 52 poměrně výrazně omezovaly růst již při koncentraci 0,2 % (Obr. 5), kdy došlo k významnému prodloužení lag fáze (Obr. 6) a snížení maximální hodnoty růstu (příloha PI). U fosforečnanu PYRO 52 bylo působení následujících koncentrací na růstové chování obdobné až do 0,5 % v MPB. U soli TRIKRYSTAL lze tento princip pozorovat jen do 0,4% koncentrace. Při vyšším obsahu fosforečnanů v růstovém prostředí byl sice zaznamenán jistý nárůst bez výrazně prodloužené doby lagu, ale maximální hodnota růstu byla oproti kontrole úspěšně snížena. Dvouprocentní koncentrace PYRO 52 a TRIKRYSTAL, podobně jako u solí HEXA 68 a HEXA 70, zcela znemožnila jakýkoliv nárůst. Sůl FST v případě této bakterie působila podobně jako soli s vyšším pH. Efekt potlačení růstu byl zřetelný již od koncentrace 0,3 % (Obr. 5). V intervalu 0,3-0,5 % došlo k významnému prodloužení lag fází či generační doby a snížení maxima růstu. Naopak u vyšších koncentrací (0,75-2 %) bylo možné zaznamenat nárůst, u něhož k prodloužení doby lagu nedošlo, ale opět byla konečná hodnota v porovnání s kontrolou snížena. Fosforečnany KPS a DIDI, stejně jako u *Bacillus cereus* CCM 2010, nezpůsobily výrazné omezení růstu *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CCM 2216. Jen 1% a 2% koncentrace soli DIDI zapříčinila mírné prodloužení lag fáze (Obr. 5). V přítomnosti soli KPS (0,4-2 %) nebyla patrna doba nutná pro přizpůsobení dané bakterie - buňky přešly ihned do fáze exponenciální (Obr. 6). Ze sloupcového souhrnného grafu vlivu fosforečnanových solí na délku lagu je u některých solí (PYRO 52) patrný trend připomínající Gaussovu křivku.

Obr. 5. Vliv fosforečnanových solí na růst *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CCM 2216



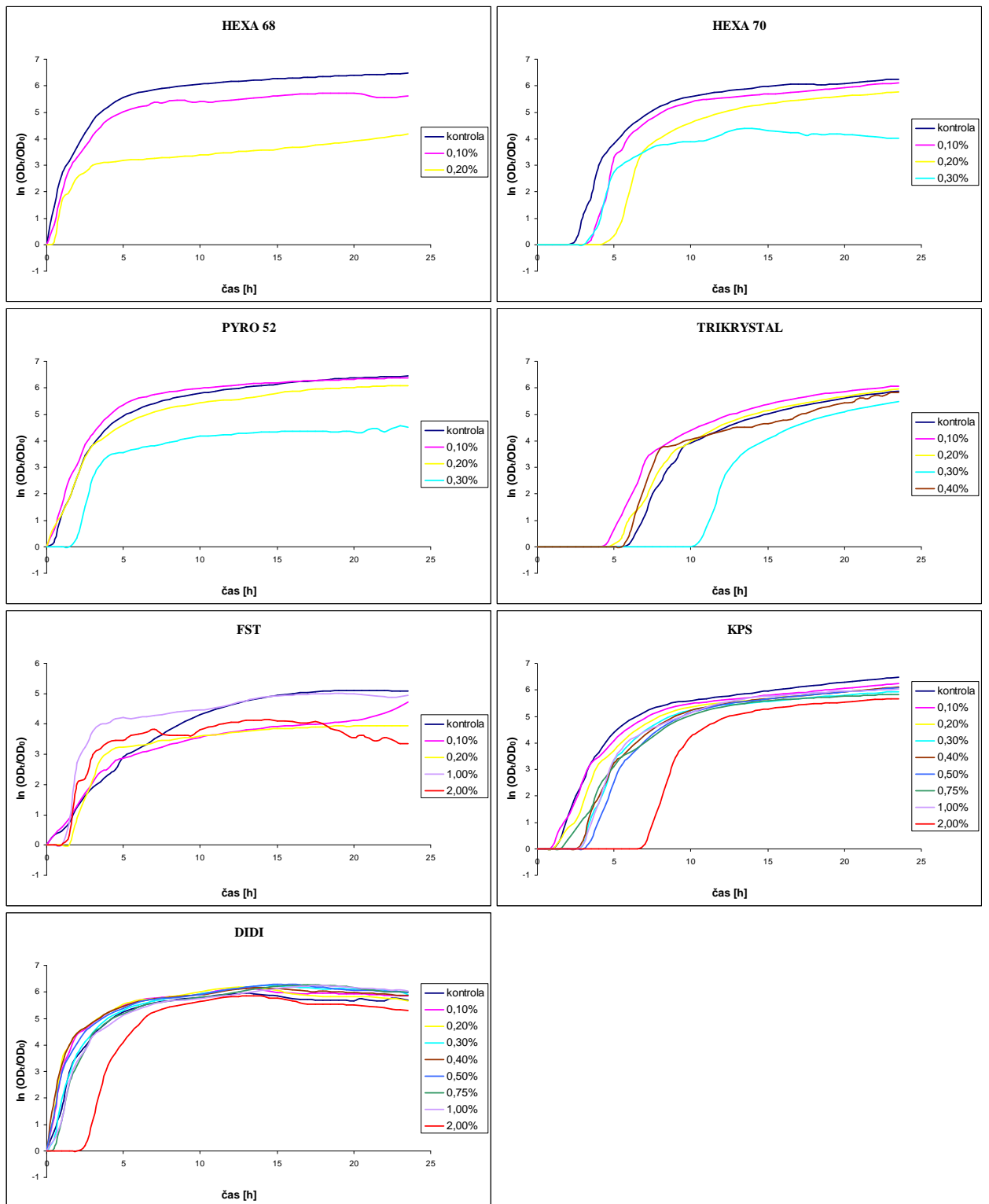
Obr. 6. Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CCM 2216



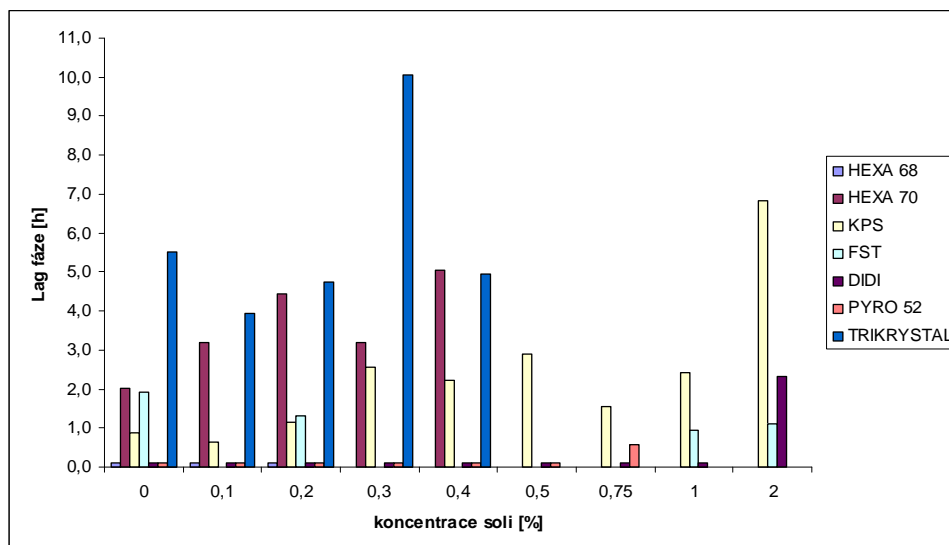
7.1.3 Vliv fosforečnanových solí na růst *Micrococcus luteus* CCM 732

Nejvyšší inhibiční účinek na tuto bakterii vykazovaly polyfosforečnanové soli (HEXA 68, HEXA 70) a zásaditý fosforečnan PYRO 52. Koncentrace, které v kultivačním médiu znemožňovaly nárůst, se pohybovaly okolo 0,3 % (HEXA 68 dokonce 0,2 %). Soli HEXA 70 a PYRO 52 v uvedeném množství 0,3 % (u soli HEXA 70 spíše 0,4 %) způsobily výrazný pokles růstové aktivity dané bakterie oproti kontrole (Obr. 7). Maximální hodnota byla viditelně nižší a doba lagu vyšší (příloha PI). U soli PYRO 52 od 0,4% koncentrace došlo k výraznému snížení růstové rychlosti sledované bakterie (příloha PII). Poměrně účinně se projevovala i další zásaditá sůl TRIKRYSTAL, kdy 0,3% obsah této soli způsobil výrazné prodloužení lag fáze (Obr. 8). Od koncentrace 0,5% nebyl patrný žádný růst. Fosforečnan FST způsoboval v intervalu 0,3-0,75 % úplnou inhibici růstu, ale ve vyšších koncentracích, které by podle očekávání měly účinkovat snad ještě silněji, došlo k nárůstu (Obr. 7). O antimikrobním účinku solí DIDI a KPS v tomto případě nelze hovořit. Pouze 2% obsah těchto fosforečnanů způsobil výraznější prodloužení doby lag fáze (Obr. 8) a snížení maximální dosažené hodnoty růstu (příloha I). Ostatní koncentrace významněji nepotlačovaly množení *Micrococcus luteus* CCM 732 (Obr. 7).

Obr. 7. Vliv fosforečnanových solí na růst *Micrococcus luteus* CCM 732



Obr. 8. Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze *Micrococcus luteus* CCM 732

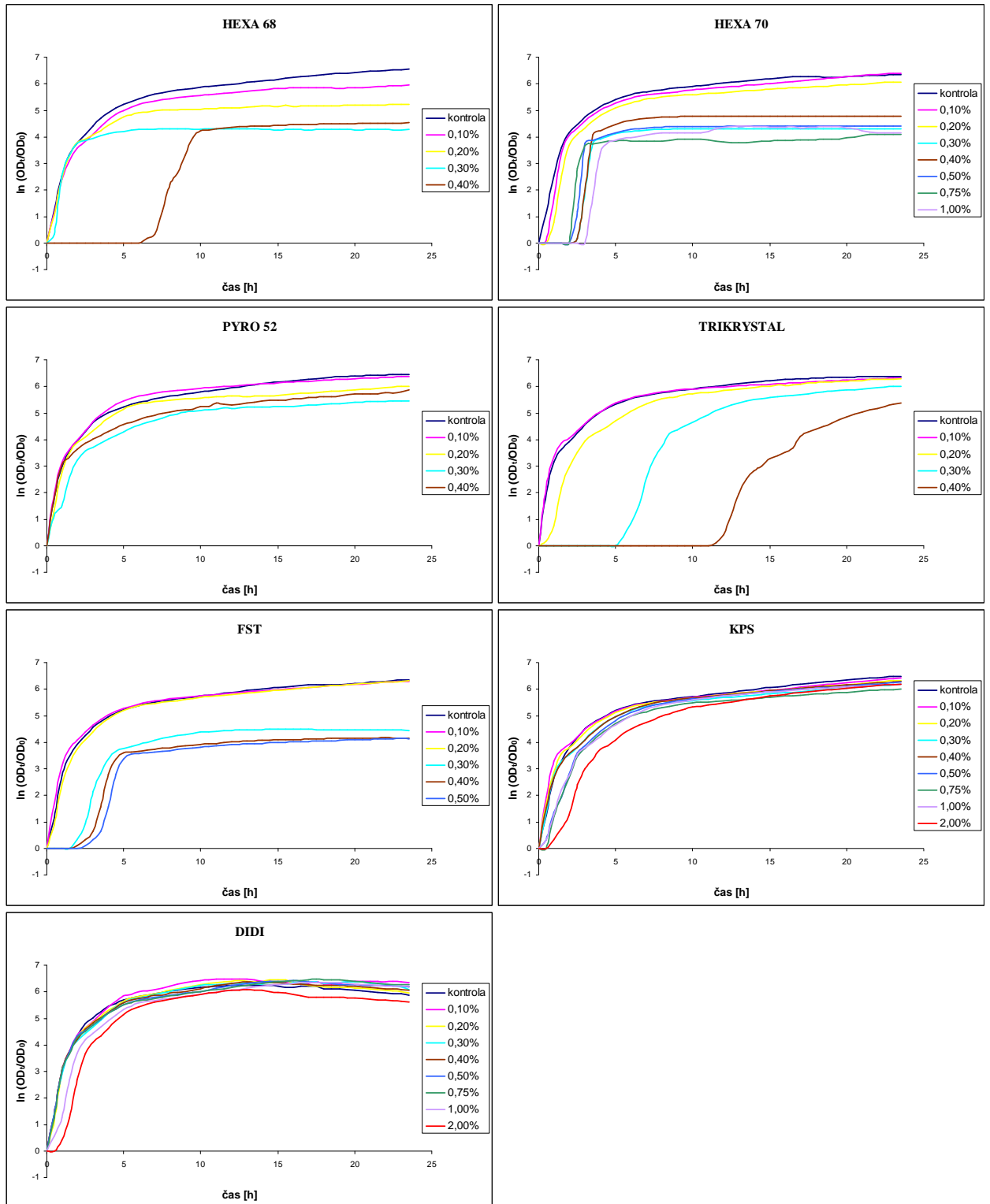


7.1.4 Vliv fosforečnanových solí na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

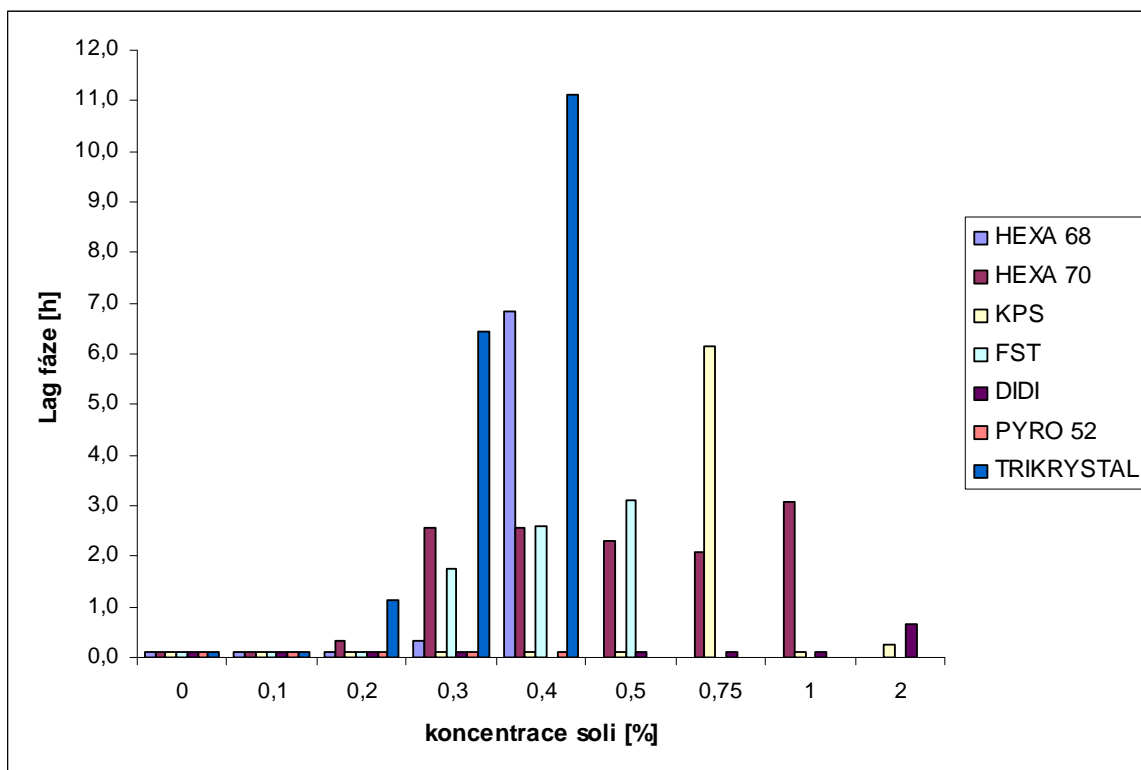
Nejúčinněji potlačovaly růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 tyto fosforečnany: HEXA 68, PYRO 52 a TRIKRYSTAL. Už 0,5% koncentrace působila zcela inhibičně a bakterie nebyly schopné růstu (Obr. 9). Při 0,4 % HEXA 68 v kultivačním médiu byla výrazně prodloužena doba lagu testované bakterie (Obr. 10). K podobnému jevu došlo u soli TRIKRYSTAL již při koncentraci 0,3 % (Obr. 10), přičemž s přidavkem této zásadité soli došlo ke zpomalení růstové rychlosti (příloha PII). Druhý polyfosforečnan, HEXA 70, tak silný inhibiční účinek nevykazoval. Od 0,3% koncentrace ale docházelo ke zřetelnému prodlužování lag fáze (Obr. 10) a výraznému snížení maximální hodnoty růstu (příloha PI). Při 2 % HEXA 70 v prostředí se nebyl *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 schopen rozmnožovat (Obr. 9). Fosforečnan FST evidentně účinkoval již od koncentrace 0,3 % (Obr. 9), kdy do 0,5% obsahu v médiu způsoboval prodlužování lagu (Obr. 10) a v porovnání s kontrolou významně potlačoval růst (příloha PI). Vyšší koncentrace FST pak zcela danou bakterii inhibovaly. Soli KPS a DIDI opět neúčinkovaly tak, jak bylo očekáváno, ale alespoň došlo k mírnému snížení růstové rychlosti a u fosforečnanu DIDI také k prodloužení generační doby (příloha PII). Avšak ani 2% obsah těchto solí

v kulturačním médiu nevytvořil dostatečně nepříznivé prostředí pro rozvoj *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 (Obr. 9).

Obr. 9. Vliv fosforečnanových solí na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953



Obr. 10. Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze *Staphylococcus aureus subsp. aureus* CCM 3953



7.1.5 Vliv fosforečnanových solí na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224

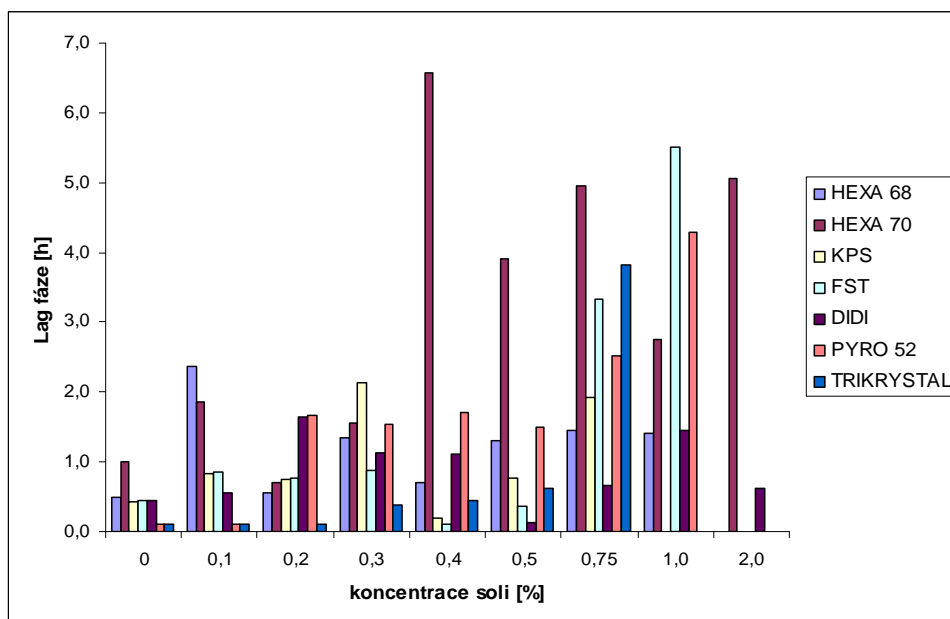
Enterococcus faecalis CCM 4224 se v přítomnosti fosforečnanových solí choval poněkud nevyzpytatelně. Lze říci, že až 1% koncentrace fosforečnanu HEXA 68 výrazněji potlačila růst této bakterie (Obr. 12), prodloužila dobu lagu (Obr. 11) a snížila maximální hodnotu růstu (příloha PI), přičemž od hodnoty 0,1 % došlo k pozvolnému snižování růstové rychlosti a prodlužování generační doby (příloha PII) v závislosti se stoupajícím přidáním množství tohoto polyfosforečnanu do kultivačního média. Při 2 % HEXA 68 v prostředí *Enterococcus faecalis* CCM 4224 nebyl schopen růstu. Sůl HEXA 70 takový trend chování nevykazovala. I při nejvyšších koncentracích docházelo k množení daného mikroorganismu (Obr. 12). Nastalo ale zřetelné prodlužování lag fáze (Obr. 11) a rychlost růstu byla oproti kontrole snížena (příloha PII). K největšímu prodloužení doby lagu došlo při 0,4% koncentraci soli HEXA 70 v růstovém bujónu. Obsah 2 % způsobil delší dobu lagu a v porovnání s kontrolou i podstatně nižší maximální dosaženou hodnotu růstu. PYRO 52 již v 0,2% obsahu způsobil prodlužování lag fáze, přičemž byl tento jev nejvýraznější u

1% koncentrace (Obr. 11). Zásaditý pyrofosforečnan při vyšším obsahu způsobil postupné mírné prodlužování generační doby (příloha PII). PYRO 52 v 2% koncentraci v prostředí vytvořilo pro enterokoka zcela nevhodné růstové podmínky (Obr. 12).

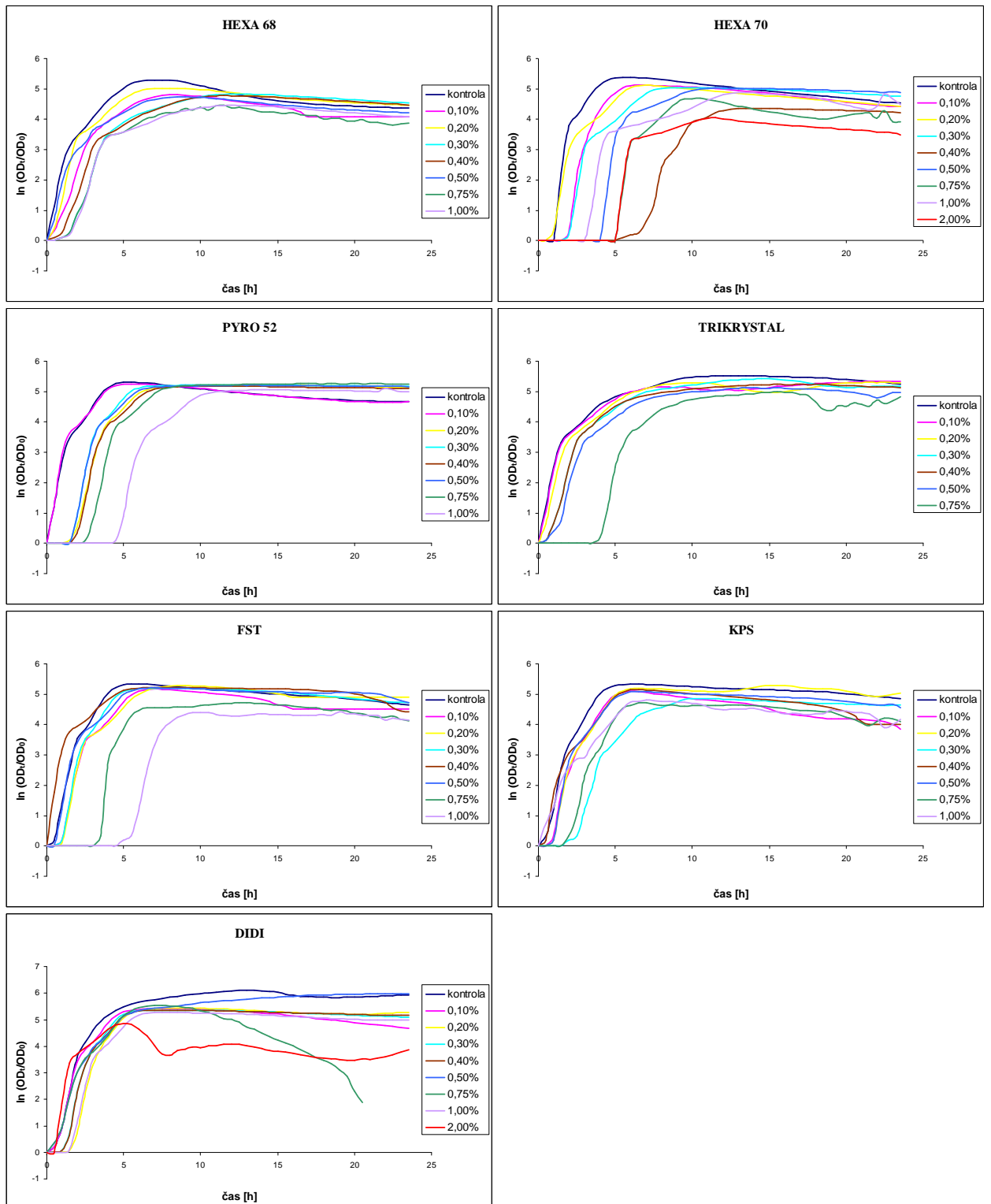
Podobně tomu bylo i u soli TRIKRYSTAL, kdy ke stejné situaci docházelo již od koncentrace 0,75 % (Obr. 11). 1 a 2% obsah fosforečnanu TRIKRYSTAL znemožnil jakýkoliv růst (Obr. 12). FST v koncentracích 0,75 a 1 % ovlivnil růstové chování tak, že došlo opět k prodlužování doby lagu (Obr. 11), ale také k poměrně zřetelnému snížení aktivity daného mikroorganismu (Obr. 12). Koncentrace 2 % zde vykazovala antimikrobní účinek.

Jako u jediné ze sledovaných bakterií došlo k odlišnému účinku solí KPS a DIDI, kdy KPS při 0,3 % v prostředí způsobila znatelné prodloužení lag fáze (Obr. 11) a v 0,75% a 1% koncentracích navíc došlo ke snížení maximální hodnoty růstu (příloha PI), přičemž 2 % kyselého pyrofosforečnanu v prostředí působila zcela inhibičně (Obr. 12). Další růstové parametry dané bakterie zaznamenaly rovněž změnu. Růstová rychlost se od 0,3% obsahu KPS v prostředí pozvolna snižovala (příloha PII). Většina koncentrací zapříčinila prodloužení generační doby (příloha PII). Pro sůl DIDI nebyl tento trend zjevný. Jen 2% koncentrace významněji omezila růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224 (Obr. 11, 12).

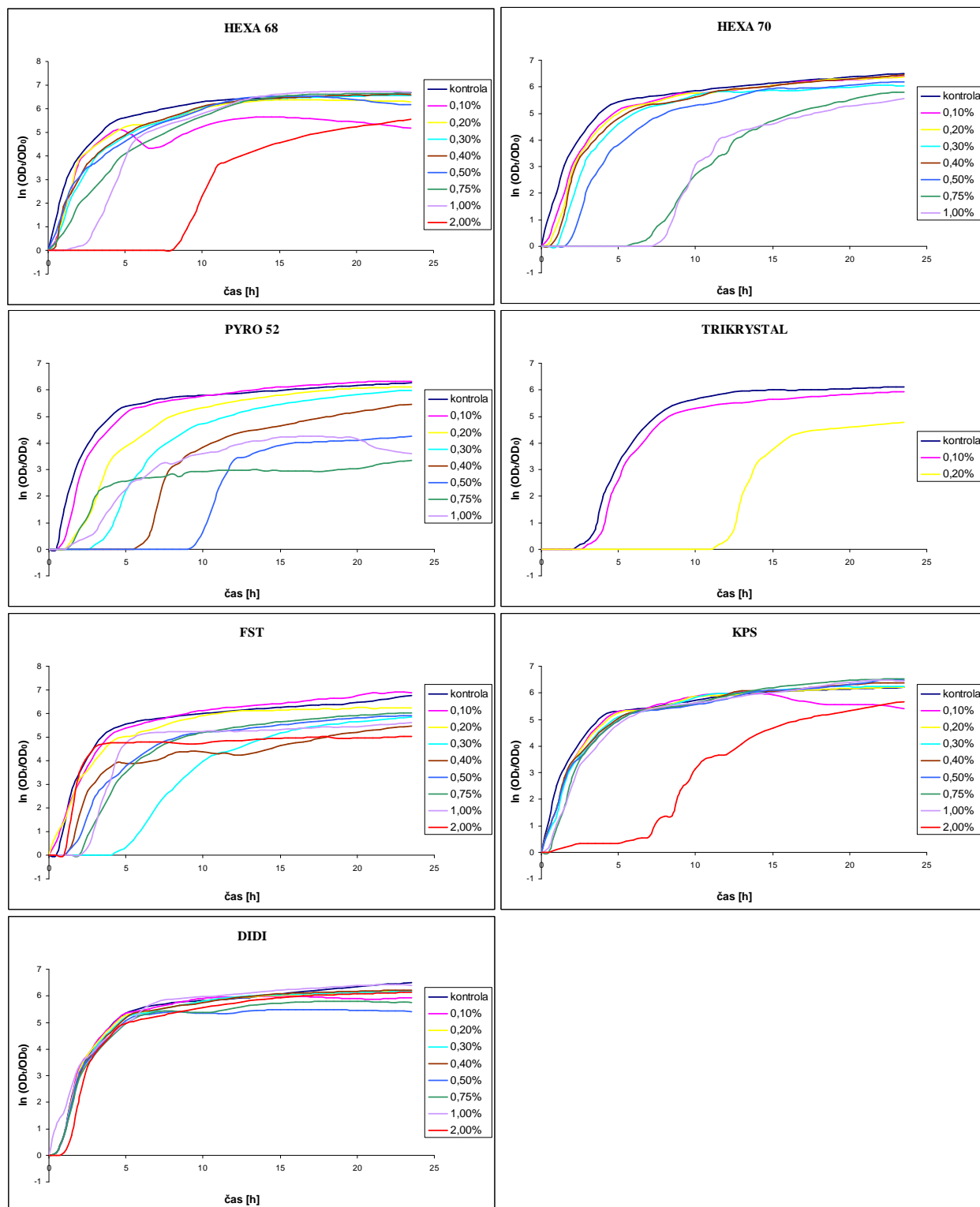
Obr. 11. Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze *Enterococcus faecalis* CCM 4224



Obr. 12. Vliv fosforečnanových solí na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224



Obr.14. Vliv fosforečnanových solí na růst *Escherichia coli* CCM 3954



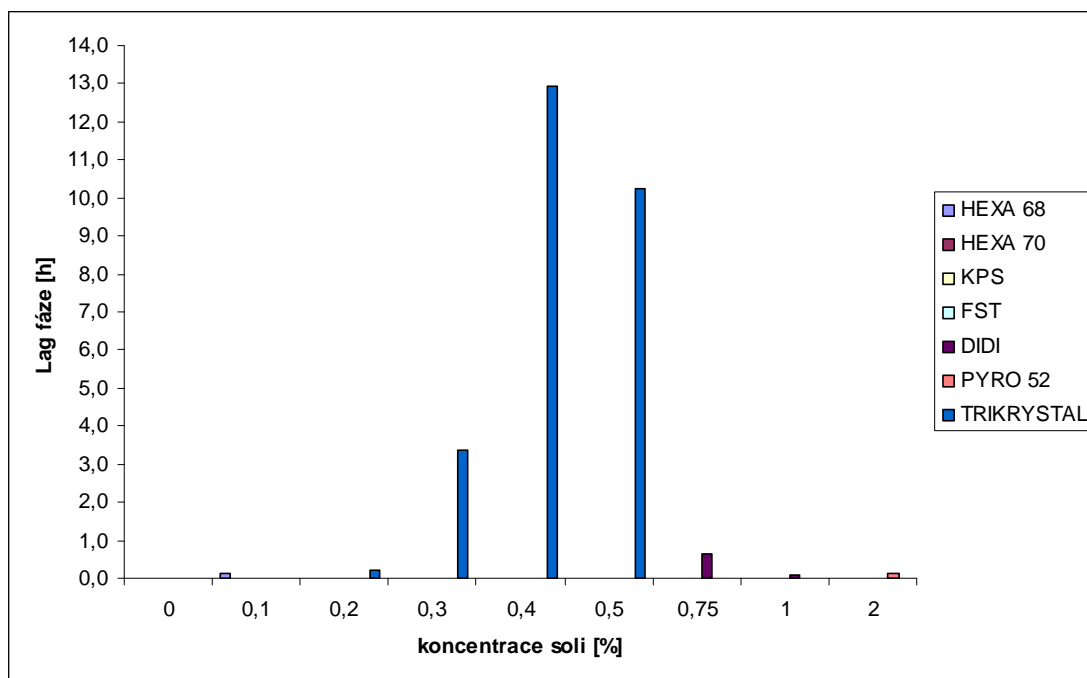
7.1.7 Vliv fosforečnanových solí na růst *Citrobacter freundii* CCM 7187

Citrobacter freundii CCM 7187 byl rezistentní vůči jakémukoliv působení většiny sledovaných fosforečnanových solí, a to i při nejvyšších testovaných koncentracích (Obr. 16). Výjimku tvořila sůl TRIKRYSTAL, která zcela znemožnila nárůst této bakterie již při 0,75% obsahu v kultivačním médiu (Obr. 16). Přičemž od 0,3% koncentrace bylo možné sledovat prodlužování doby lagu (Obr. 15) a snižování maximální hodnoty (příloha PI) či rychlosti růstu (příloha PII).

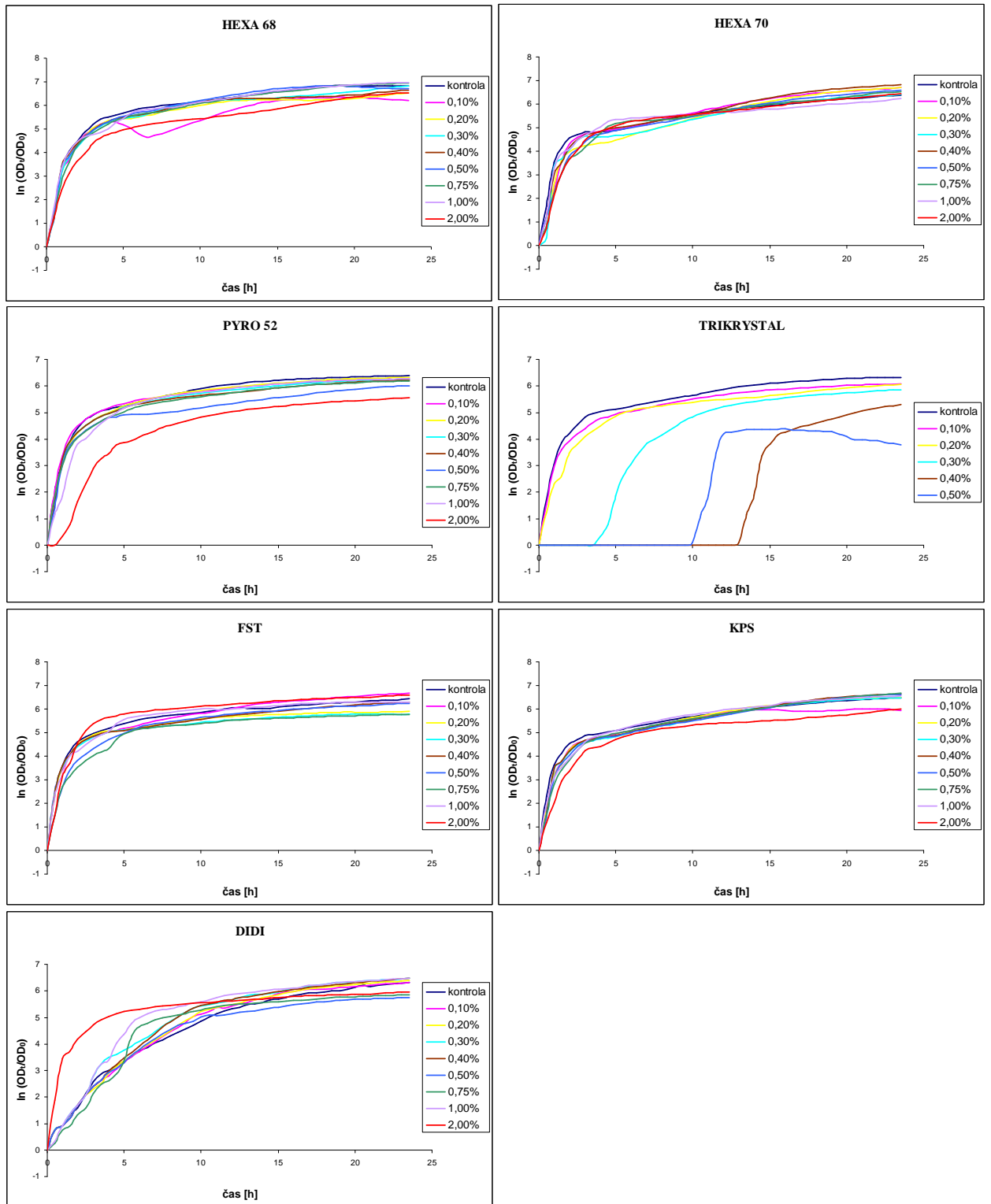
U 2% obsahu soli PYRO 52, pak došlo také k jistému negativnímu působení na rozvoj *Citrobacter freundii* CCM 7187, kdy byl oproti kontrole mírně potlačen nárůst (příloha PII, Obr. 16). Růstové parametry dané bakterie se výraznějším způsobem neměnily.

Růstová rychlost při použití soli HEXA 68 zaznamenala snížení v třech nejvyšších testovaných koncentracích (0,75-2 %) (příloha PII). Fosforečnan PYRO 52 pak způsobil rovněž jistý pokles růstové rychlosti, ale také prodloužil časový úsek potřebný pro zdvojení buněk (příloha PII).

Obr. 15. Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze *Citrobacter freundii* CCM 7187



Obr. 16. Vliv fosforečnanových solí na růst *Citrobacter freundii* CCM 7187

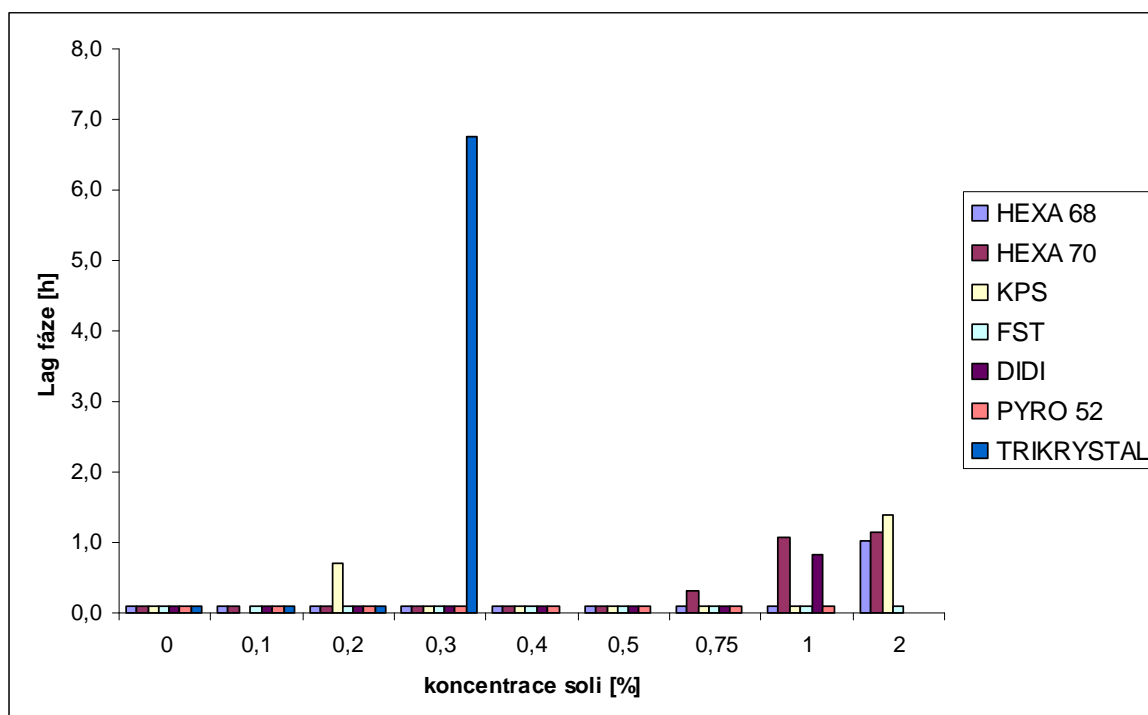


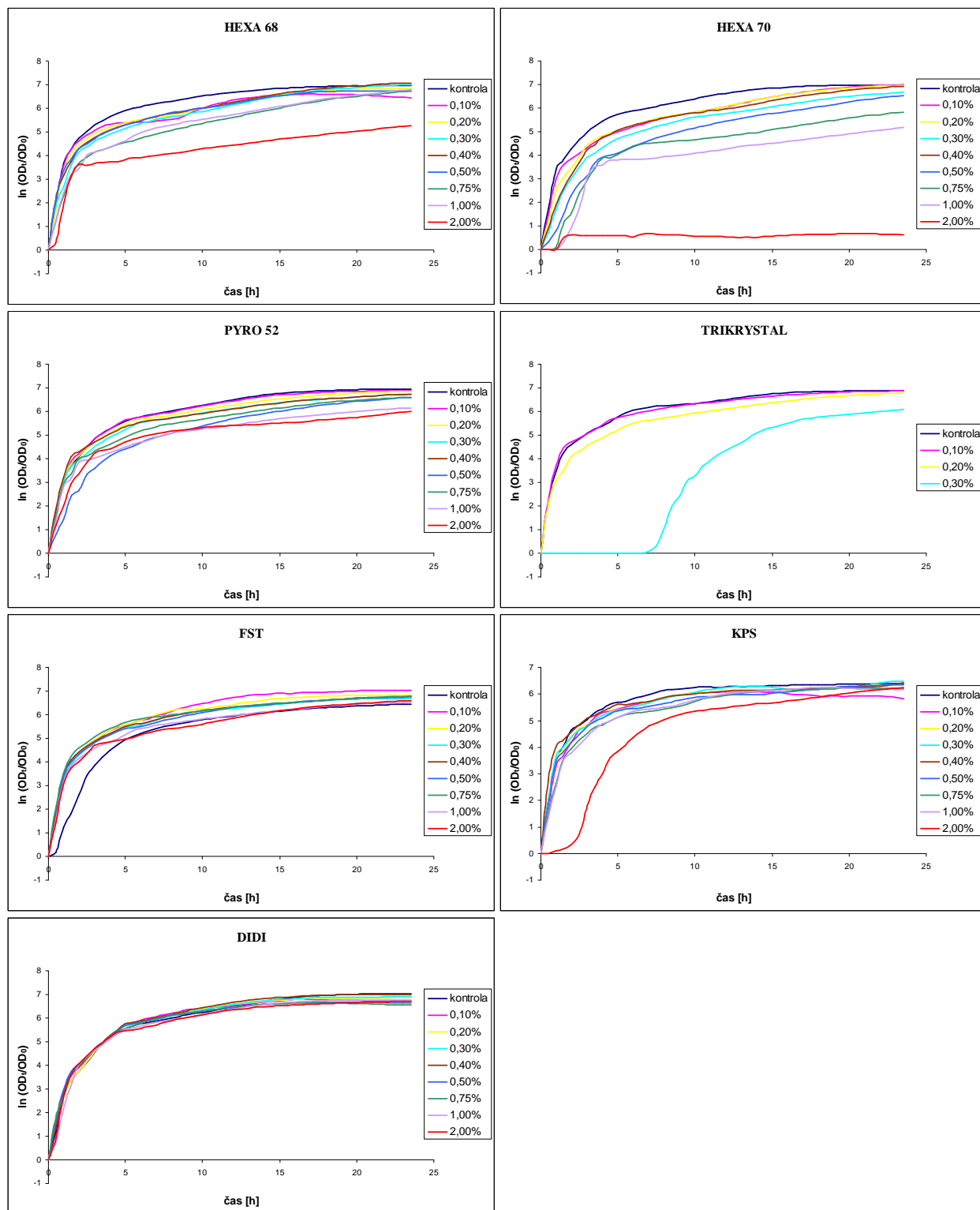
7.1.8 Vliv fosforečnanových solí na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188

Proteus mirabilis CCM 7188 byl již citlivější vůči působení fosforečnanů než výše zmíněný *Citrobacter freundii* CCM 7187. Polyfosforečnanové soli měly vliv na růst dané bakterie v intervalu koncentrací 0,75-2 % (Obr. 18). Do hodnoty 0,75% prakticky nebyla zjištěna doba lagu (Obr. 17). Dvouprocentní koncentrace se projevila nejen prodloužením lag fáze (Obr. 17), ale také snížením maximální dosažené hodnoty růstu (příloha PI). Růstový parametr rychlost růstu, zaznamenal s rostoucím množstvím HEXA 70 (do koncentrace 0,75 %) v prostředí postupné zpomalení (příloha PII). Pro HEXA 68 k významnějšímu ovlivnění růstové rychlosti docházelo až od 0,75% koncentrace (Obr. 17). Ani nejvyšší 2% koncentrace nepůsobila zcela inhibičně (Obr. 18).

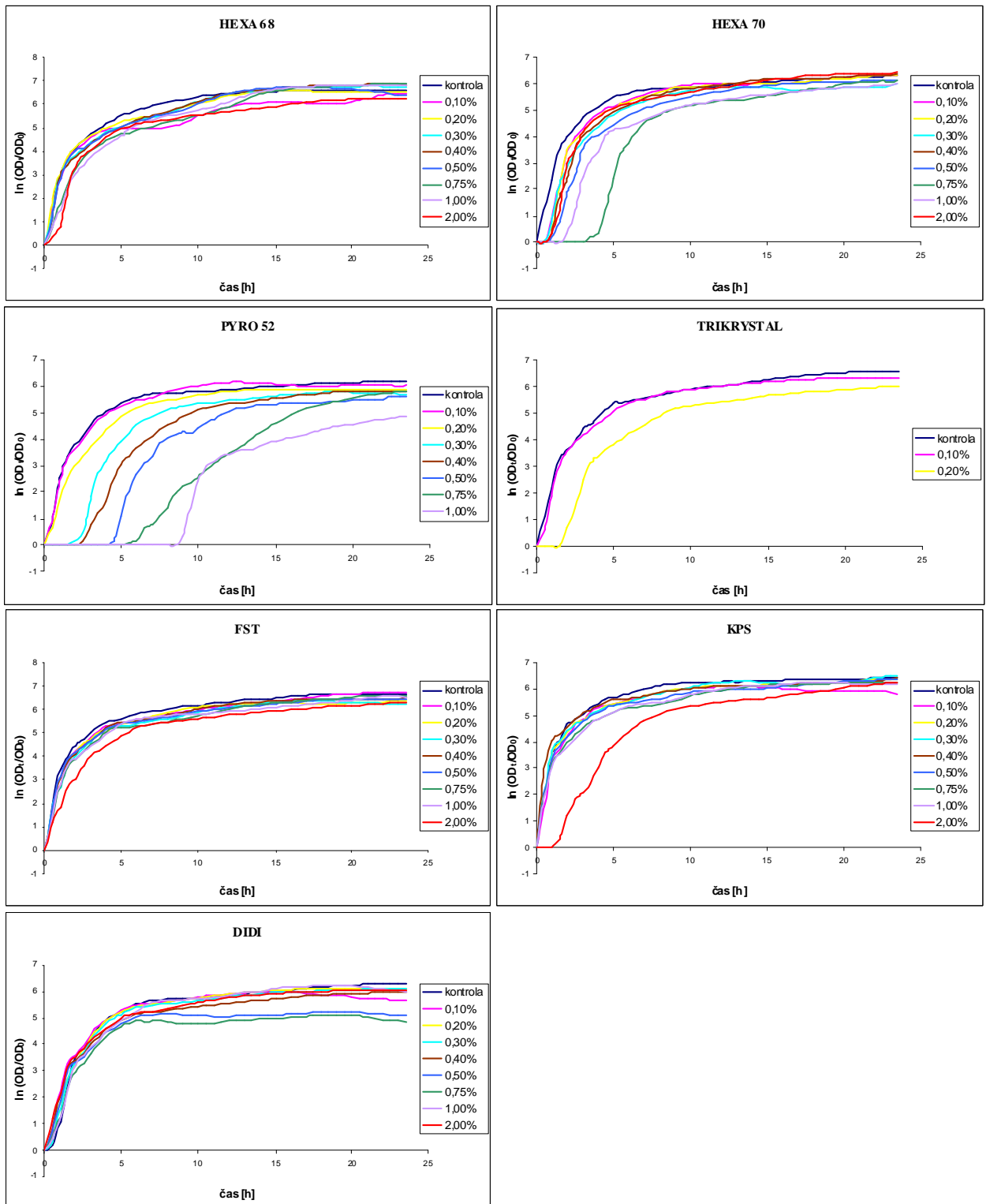
U fosforečnanů FST a DIDI opět nebyl sledován žádný inhibiční účinek (Obr. 18). Nejvíce na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188 působila silně zásaditá sůl TRIKRYSTAL, kdy od 0,4% koncentrace nebyla patrná žádná mikrobiální aktivita (Obr. 18). Již nižší obsah této soli (0,2 a 0,3%) způsobil podstatné zpomalení růstové rychlosti a prodloužení generační doby *Proteus mirabilis* CCM 7188 (příloha PII).

Obr. 17. Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze *Proteus mirabilis* CCM 7188



Obr. 18. Vliv fosforečnanových solí na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188

Obr. 20. Vliv fosforečnanových solí na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420



7.1.10 Vliv fosforečnanových solí na růst *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

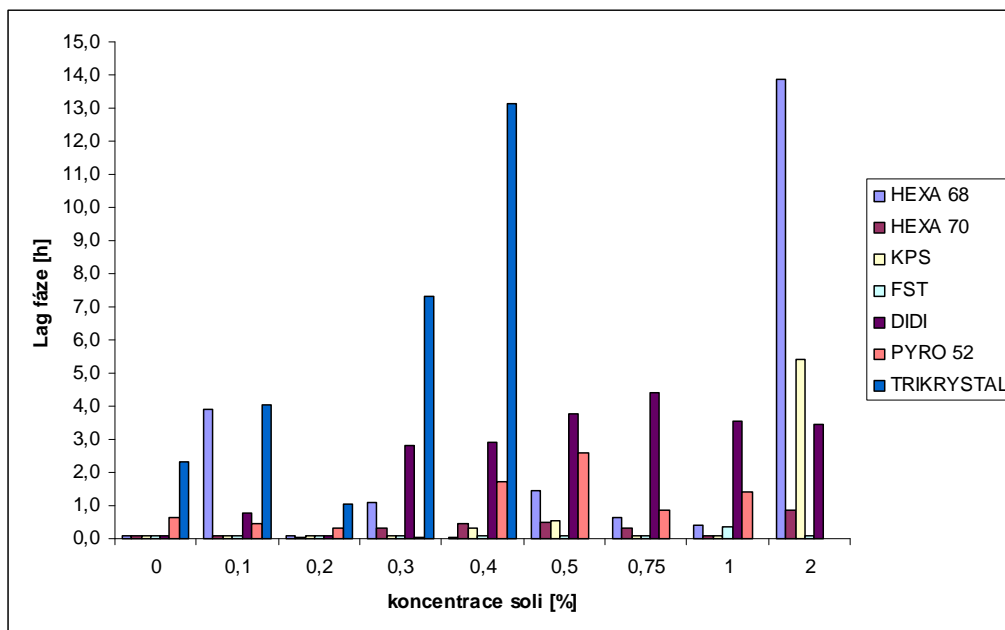
U solí HEXA 68, HEXA 70, KPS A PYRO 52 (bez ohledu na stupeň kondenzace) bylo na *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 možné pozorovat podobný trend účinků jako u výše testovaných bakterií (Obr. 22). Pouze 2% koncentrace způsobila zřetelnější prodloužení doby lagu (Obr. 21). Nižší obsah těchto fosforečnanů nijak významně nárůst *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 neovlivnil.

U solí PYRO 52 a DIDI mělo působení na délku lag fáze spíše charakter Gaussovy křivky, kdy střední hodnoty přídavek zapříčinily nejvýraznější změnu (Obr. 21).

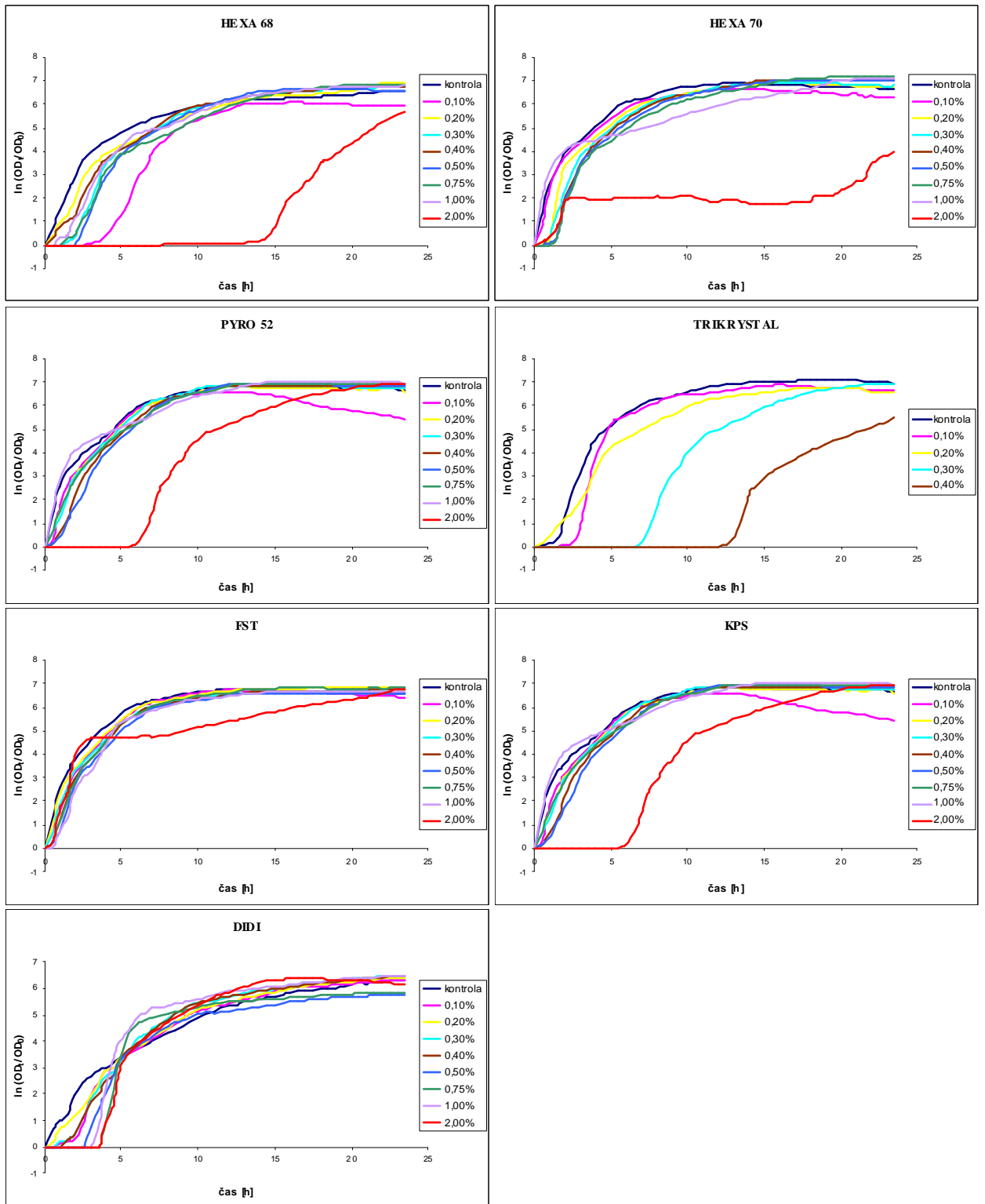
Malý vliv soli HEXA 68 lze spatřovat v tom, že s rostoucí koncentrací (od 0,2% obsahu) byla růstová rychlost oproti kontrole snižována a generační doba prodlužována (příloha PII).

Nejúčinněji opět působil fosforečnan TRIKRYSTAL, který při koncentracích 0,3 a 0,4 % účinně ovlivňoval lag fázi (Obr. 21) a při koncentracích vyšších znemožnil růst *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 (Obr. 22).

Obr. 21. Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955



Obr. 22. Vliv fosforečnanových solí na růst *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955



8 DISKUZE

Z dostupných literárních zdrojů bylo zřejmé, že je problematice inhibičního efektu fosforečnanových solí věnována zvýšená pozornost. Předmětem zájmu jsou hlavně polyfosforečnany, které efektivně inhibují růst většiny grampozitivních bakterií (u sporulujících i germinaci spor) a při vyšších koncentracích mohou negativně ovlivnit růst a množení i odolnějších gramnegativních bakterií. Fosforečnany s nižším kondenzačním stupněm byly celkově zhodnoceny autory studií jako podstatně méně účinné v boji proti nežádoucím mikroorganizmům. Současně byly sledovány i vlivy synergických faktorů, které efektivitu přidávaných solí zvyšovaly (např. změny pH, regulovaná atmosféra, přísady NaCl, lysozymu a nizinu).

Pokud porovnáme účinky jednotlivých fosforečnanů na *Bacillus cereus* CCM 2010, je zřejmé, že nejvyšší inhibiční efekt měly soli HEXA 68 a HEXA 70. Důvodem je, s největší pravděpodobností, vysoký stupeň kondenzace. U polyfosforečnanů je účinné potlačení růstu grampozitivních bakterií víceméně očekáváno. Jak již bylo úváděno v teoretické části, delší řetězec fosforečnanových solí disponuje zesílenou schopností vyvazovat divalentní kationty kovů a narušit tak integritu buněčných stěn či membrán, nebo zasáhnout do metabolismu bakterie. [4]

Druhý z výše zmíněného rodu *Bacillus*, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CCM 2216, byl účinně potlačován přísadkou 0,3 % polyfosforečnanů. Významně projevily svůj inhibiční efekt i zásadité soli (PYRO 52, TRIKRYSTAL), kdy v koncentraci 0,2 % snižovaly maximální dosažené hodnoty růstu. Překvapivě pak působily vyšší obsahy těchto solí (0,75%, 1%), kdy byl opět zaznamenán nárůst. Zdá se tedy, že při vyšších koncentracích uvedených fosforečnanů dochází k přizpůsobení bakterie daným podmínkám. Obdobný trend můžeme sledovat i při přísadce FST. 2% koncentrace ale dokonale znemožnily jakýkoliv nárůst.

Micrococcus luteus CCM 732 se projevil jako velmi citlivý na přítomnost polyfosforečnanů HEXA 68 a HEXA 70, kdy již od 0,3% koncentrací byl spolehlivě znemožněn jakýkoliv nárůst. Stejněho účinku bylo dosaženo i u soli PYRO 52 (od 0,4 %). TRIKRYSTAL opět způsobil celkovou inhibici *Micrococcus luteus* CCM 732 již při 0,5% koncentraci. Překvapivě účinkovala sůl FST, kdy v intervalu 0,3-0,75 % tripolyfosforečnanu v kultivačním médiu znemožnila růst, ale vyšší koncentrace ho povolovaly.

HEXA 68 od 0,5% obsahu vytvořila extrémně nevhodné podmínky pro rozvoj *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953. Proto mírně znepokojující byly výsledky soli HEXA 70. Byl předpokládán mnohem větší inhibiční efekt, a to na základě vysokého kondenzačního stupně. Přesné složení polyfosforečnanů HEXA 68 a HEXA 70 není známo (který z nich disponuje delším řetězcem, nebo zda jsou přítomny příměsi jiných solí). Proto není možné zdůvodnit odlišnost trendů inhibičních účinků těchto pravděpodobně podobných solí. Lze se z většiny dat pouze domnívat, že HEXA 68 má vyšší stupeň kondenzace než HEXA 70. I přesto se zjištěné výsledky pro *Staphylococcus aureus* a sůl HEXA 70 odklánějí od teorie, kdy byl zjištěn silný inhibiční účinek polyfosforečnanů (MIC do 1%). [26] V našem měření působila inhibičně až 2% koncentrace této soli v MPB. Naopak zásadité fosforečnany PYRO 52 a TRIKRYSTAL způsobily potlačení růstu *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 ve výsledku stejně efektivně jako polyfosforečnan HEXA 68 a dokonce ještě účinněji než HEXA 70. FST znemožnil dělení bakterie při koncentracích 0,75 % a vyšších. Výsledky pyrofosforečnanu se shodují s jedním ze zdrojů, kdy se MIC *Staphylococcus aureus* pohybuje okolo 0,5 %. [26]

V minulosti byly stafylokoky považovány za blízké příbuzné zástupcům rodu *Micrococcus* a byly řazeny do čeledi *Micrococcaceae*. Kvůli podobné morfologii a katalázové aktivitě byly často zaměňovány. [81] Právě zřejmě podobnost buněčné stavby zapříčinila podobný trend inhibičních účinků zkoušených solí. *Micrococcus* byl ale podstatně citlivější, než *Staphylococcus*. Stačily o mnoho nižší koncentrace pro vytvoření zcela nevhodného prostředí pro jeho kultivaci. Jednalo se o soli HEXA 68, PYRO 52 a TRIKRYSTAL. Stejných výsledků bylo dosaženo i u KPS, kdy nedošlo k žádnému významnému působení na růst těchto rodů. Odlišný trend bylo možné sledovat u soli HEXA 70, kdy *Staphylococcus* nebyl schopen růstu až při nejvyšší zkoušené koncentraci. *Micrococcus* navíc reagoval negativně na přítomnost soli DIDI, kdy při půlprocentní koncentraci nebyl schopen rozmnožování. Totožného účinku u stafylokoka bylo dosaženo působením 0,75% koncentrací soli FST.

Enterococcus faecalis CCM 4224 patřil mezi „problémové“ grampozitivní bakterie, jejichž růst nebyl v přítomnosti fosforečnanů předvídatelný. Polyfosforečnanové soli ani v 1% koncentraci nezpůsobily významnější inhibici. HEXA 68 v koncentraci 2 % pak vyvolala úplné omezení dané bakterie a nebyl tak sledován žádný nárůst. Stejný efekt vyvolaly i ostatní 2% přídatky solí PYRO 52, TRIKRYSTAL, FST, KPS a DIDI.

Z výsledků je patrné, že ve většině případů dosáhla sůl TRIKRYSTAL vysokého inhibičního účinku. Její přídavky znatelně zvyšují pH kultivačního prostředí. Důvodem je právě silně alkalické pH, které zřejmě způsobuje zvýšení citlivosti i gramnegativních bakterií na fosforečnanové anionty. Vliv změny pH v souvislosti s působením alkalického fosforečnanu byl již zkoumán u bakterie *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, kdy byl zaznamenán vysoký účinek dané soli od 1,5% obsahu v kultivačním prostředí (konkrétně TSP, ekvivalentní soli TRIKRYSTAL). [65] Rozdílnost koncentrací, které působily inhibičně (v našem měření MIC=0,3 %) může být dán způsobem inkubace dané bakterie, kdy ji vystavili účinkům TSP v destilované vodě. Rozdílnosti mohou být způsobeny dále zvolenou metodou sledování, kdy Sampathkumar a kol. použil metody elektronové mikroskopie. [65]

Rozpuštěné soli způsobují změny kyselosti kultivačního média, do něhož jsou vybrané bakterie očkovány. Tyto změny pak mohou přispět k inhibičnímu efektu daných solí. Proto v souvislosti s tímto faktem bylo námi provedeno měření pH kultivačního prostředí po přídavku fosforečnanů. Cílem bylo sledovat jednak samotnou hodnotu pH a také to, jestli se se stoupajícím množstvím fosforečnanové soli nějak výrazně změní pH (0,4% a 1% koncentrace) viz Tab. 1.

Soli DIDI a KPS u podstatné většiny testovaných grampozitivních i gramnegativních bakterií nezpůsobily žádný významnější pokles růstu. Výjimkou byl *Enterococcus faecalis* CCM 4224, kdy 2% koncentrace KPS v růstovém prostředí zabránila jakémukoliv projevu mikrobiální aktivity této bakterie. U ostatních sledovaných grampozitivních bakterií došlo při této nejvyšší koncentraci k prodloužení doby lag fáze a snížení maximální hodnoty růstu. Přídavek dihydrátu hydrogenfosforečnanu (di)sodného (DIDI) do kultivačního prostředí vyvolal pouze mírné zvýšení pH, které se pak pohybovalo v rozsahu neutrálních hodnot. Navíc nízký stupeň kondenzace může být, společně s nízkým obsahem snadno odštěpitelných sodných iontů, jednou z příčin nízkého inhibičního účinku. Kyselý pyrofosforečnan ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$), na rozdíl od zásaditého ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$), rovněž nezpůsobil žádnou výraznější inhibici převážně většině vybraných bakterií, u kterých byl účinek fosforečnanu zkoumán. Důvodem je zřejmě opět zmiňované pH, kdy alkalické hodnoty kultivačního prostředí významně zvyšují komplexotvornou schopnost fosforečnanů [4], [36].

Tripolyfosforečnan sodný (FST) působil výraznou inhibici růstu pouze u stafylokoka. U ostatních bakterií jsme se setkali s trojí situací, kdy se buď nižší koncentrace projevila

omezením růstu více, než když bylo do kultivačního prostředí přidáno větší množství FST (1 a 2%) např. u *Bacillus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Citrobacter*. Nebo nedošlo k žádnému významnému účinku (*Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*), či pouze 2% koncentrace byla schopna eliminovat bakteriální nárůst (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*).

Polyfosforečnany HEXA 68 a HEXA 70 velmi často efektivně potlačovaly růst u vybraných grampozitivních bakterií při koncentracích od 1%. Většina sledovaných gramnegativních bakterií významněji reagovala na přítomnost těchto solí až při nejvyšších zkoumaných koncentracích (1%, 2%) jednalo se o bakterie rodu *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas* (HEXA 68, HEXA 70) a *Salmonella* (pouze pro HEXA 70). V ostatních koncentracích se na růstu mikrobiální populace žádným výraznějším způsobem neprojevovaly. Jak již bylo zmíněno, silně zásaditý ortofosforečnan TRIKRYSTAL se projevoval striktní inhibicí gramnegativních bakterií. Jako jediný z fosforečnanů působil na *Citrobacter freundii* CCM 7187, kdy zcela znemožnil růst při 0,75 % této soli v prostředí. Velmi silně působil pak proti *Salmonella enterica* a *Escherichia coli*, kdy stejný striktně inhibiční vliv měla již 0,3% koncentrace. Na *Proteus mirabilis* účinkovala tato alkalická sůl od 0,4% obsahu v MPB, při němž nebyl sledován žádný nárůst. Poslední sledovaná gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* rovněž reagovala citlivě na přítomnost soli TRIKRYSTAL (od 0,5 % žádný nárůst).

V následující tabulce jsou uvedeny minimální inhibiční koncentrace, při kterých již nebyl zaznamenán žádný nárůst. Nejcitlivěji z grampozitivních bakterií reagoval *Micrococcus luteus* CCM 732. Podle klesající účinnosti solí na růst grampozitivních bakterií lze jako nejefektivnější označit sůl HEXA 68, dále soli PYRO 52 a TRIKRYSTAL. Méně účinná je HEXA 70 a FST. Nejmenší efekt byl pozorován při přídávku fosforečnanů KPS a DIDI. Z gramnegativních bakterií byla přídávku fosforečnanů nejvíce ovlivněna *Escherichia coli* CCM 3954 a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420. Na všechny gramnegativní bakterie působila sůl TRIKRYSTAL, která svou přítomností posouvala pH kultivačního prostředí do silně alkalické oblasti. Ze všech fosforečnanů působila nejvíce a to na 9 z 10 testovaných bakterií.

Tab. 2. Minimální inhibiční koncentrace zkoušených fosforečnanů

sledovaná bakterie	MIC pro danou sůl [%]						
	HEXA 68	HEXA 70	PYRO 52	TRIKRYSTAL	FST	KPS	DIDI
<i>Micrococcus luteus</i>	0,20%	0,40%	0,40%	0,50%	0,30 %*	>2,00%	>2,00%
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,50%	2,0%	0,50%	0,50%	0,75%	>2,00%	>2,00%
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,00%	>2,00%	2,00%	1,00%	2,00%	2,00%	>2,00%
<i>Bacillus cereus</i>	0,40%	0,30%**	2,00%	>2,00%	2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Bacillus subtilis</i>	2,00%	2,00%	2,00%	2,00%	>2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Escherichia coli</i>	>2,00%	2,00%	2,00%	0,30%	>2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Salmonella enterica</i>	>2,00%	>2,00%	2,00%	0,30%	>2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Proteus mirabilis</i>	>2,00%	>2,00%	>2,00%	0,40%	>2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Citrobacter freundii</i>	>2,00%	>2,00%	>2,00%	0,75%	>2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>2,00%	>2,00%	>2,00%	0,50%	>2,00%	>2,00%	>2,00%

kde: >2,00%.....ani nejvyšší zkoušená koncentrace nepůsobila striktní inhibicí

*.....pro *Micrococcus luteus* byl dále zaznamenán nárůst v koncentracích 1 a 2 %

**.....pro *Bacillus subtilis* byl dále zaznamenán nárůst v koncentracích 0,75 a 1 %

Striktní inhibici ani při nejvyšším množství nezpůsobila sůl DIDI, jejíž přídavek do kultivačního prostředí mírně zvýšil pH, které se pak pohybovalo v rozsahu neutrálních hodnot. Stejně jako u soli TRIKRYSTAL se jedná o ortofosforečnan. Logicky se lze tedy domnívat, že neutrální či mírně zásadité pH (7,5) nepodpoří tolik komplexotvornou schopnost fosforečnanů jako silně alkalické a tím pádem i inhibiční efekt daného fosforečnanu. Obdobné pH vytvářela v kultivačním médiu i sůl FST, šlo ale o tripolyfosforečnan s delším řetězcem, který mohl u většiny grampozitivních bakterií způsobit podstatně vyšší inhibici růstu než u fosforečnanu tvořeného jednou monomerní jednotkou. Stejně tak kyselý pyrofosforečnan KPS nepůsobil striktní inhibicí ani na podstatnou většinu grampozitivních bakterií na rozdíl od kyselých polymerních solí HEXA 68 a 70. Zajímavé je rozdílné působení kyselých fosforečnanů HEXA, nelze ho ale zcela zhodnotit, jelikož jejich přesný vzorec není znám.

Je nutné podotknout, že vyvozené závěry platí pro modelové podmínky *in vitro*. Zvláště pH potravin může významně ovlivnit antimikrobní působení fosforečnanů. V praxi jsou navíc většinou aplikovány směsi fosforečnanových solí o definovaných vlastnostech, jako je např. pH, které jsou určeny pro daný účel.

ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na sledování inhibičních účinků sedmi fosforečnanových solí v různém kondenzačním stupni na vybrané grampozitivní a gramnegativní bakterie. Fosforečnany, které byly pro měření praktické části vybrány a užity (HEXA 68, HEXA 70, FST, KPS, DIDI, PYRO 52, TRIKRYSTAL), jsou průmyslovými solemi, s kterými je možné se konkrétně setkat v technologii výroby tavených sýrů (z hlediska chemické struktury je možné aplikovat i na jiné skupiny potravin). Na základě získaných výsledků lze konstatovat následující fakta:

- Bylo prokázáno negativní působení sledovaných fosforečnanů v různém kondenzačním stupni na růst vybraných bakterií v podmínkách *in vitro*. Výjimkou byly soli KPS a DIDI, které se projeví jako nejméně účinné.
- Výrazně citlivější k přítomnosti fosforečnanových solí byly grampozitivní bakterie, přičemž nejcitlivěji se projevoval *Micrococcus luteus* CCM 732. U gramnegativních bakterií nebyl v převážné většině pozorován striktní inhibiční efekt. Výjimku tvořil přídatek zásaditého fosforečnanu TRIKRYSTAL.
- Na *Micrococcus luteus* a *Bacillus cereus* nejlépe působila sůl HEXA 68. Nejnižší MIC u bakterií *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis* měl fosforečnan TRIKRYSTAL. Stejně tak se u všech zkoušených gramnegativních bakterií projevil zásaditý ortofosforečnan sodný jako inhibičně nejefektivnější.
- Celkově nejúčinnější byly soli HEXA 68, PYRO 52 a TRIKRYSTAL. Lze tedy tvrdit, že inhibiční působení fosforečnanových solí rozhodně nespočívá jen v délce řetězce, ale také velmi závisí na pH.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J., *Chemie potravin*, I. díl, OSSIS 2009, , 467 s., ISBN 978-80-86659-15-2
- [2] NAIDU, A., *Natural Food Antimicrobial Systeme*, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data 2000, 725-739 s., ISBN 0-8493-2047-X
- [3] *Phosphoric acid* - Free Encyklopedia Articles at Questia.com Online Library-The Columbia Encyklopedia, Sixth Edition, [online] 2004, [cit. 2010-21-1]. Dostupný z WWW: <http://www.questia.com/library/encyclopedia/phosphoric_acid.jsp>
- [4] MOLINS, R., *Phosphates in Food*, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, CRC Press, Inc. 1991, ISBN 0-8493-4588-X
- [5] *Phosphate* - Free Encyklopedia Articles at Questia.com Online Library-The Columbia Encyklopedia, Sixth Edition, [online] 2009, [cit. 2010-21-1]. Dostupný z WWW: <<http://www.questia.com/PM.qst?a=o&d=117039188>>
- [6] *Phosphate* - Wikipedia, The free encyclopedia [online]. 2010, [cit. 2010-21-1]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Phosphate>
- [7] BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., Úloha tavicích solí při výrobě tavených sýrů, *Potravinářská revue* č. 1/2009, 13 s.
- [8] *Fosfor* - Chemický vzdělávací portál [online]. 2005 [cit. 2010-3-18]. Dostupný z WWW: <http://chemie.gfxs.cz/index.php?pg=prvek&prvek_id=15>.
- [9] RAO, M., Monomagnesium phosphate, trisodium diphosphate, Chemical and Technical Assessment (CTA), FAO 2004. Dostupný z WWW: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/cta/CTA_61_Phosphates.pdf>
- [10] AITKEN, A., *Polyphosphates in Fish Processing*, Ministry of agriculture, fisheries and food, TORRY RESEARCH STATION FAO, SIFAR 2001. Dostupný z WWW: <<http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5909E/x5909e00.htm>>
- [11] *Falešné plesnivění uzenin* - Informační centrum bezpečnosti potravin [online]. 2004, [cit. 2010-25-3]. Dostupný z WWW: <<http://www.bezpecnostpotravin.cz/Index.aspx?ch=552&typ=1&val=78523&ids=0>>
- [12] *Přídavné látky v potravinách* - SZÚ Winklerová, [online]. 2008, [cit. 2010-25-3]. Dostupný z WWW: <<http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/pridatne-latky-v-potravinach-1>>

- [13] *Chybějící údaj o fosforečnanech na šunce v SRN* - Informační centrum bezpečnosti potravin [online]. 2006, [cit. 2010-25-3].
<<http://www.bezpecnostpotravin.cz/Index.aspx?ch=552&typ=1&val=80899&ids=0>>
- [14] *Brewers Yeast: The Brewer's handbook* [online]. 2008, [cit. 2010-19-2]. Dostupný z WWW: <http://www.beer-brewing.com/beer-brewing/brewers_yeast/yeast_nutritional_requirements.htm>
- [15] *The health effects of Soft drinks*- Encyclopedia of Natural Medicine. Dostupný z WWW: <<http://www.ionizers.org/soft-drinks.html>>
- [16] *List Of Chemical Compounds In Frozen French Fries* [online]. 2008, [cit. 2010-12-2]. Dostupný z WWW: <<http://www.scumdoctor.com/nutrition/junk-food/french-fries/List-Of-Chemical-Compounds-In-Frozen-French-Fries.html>>
- [17] HARPER, A., FORSYTH, D., Relative value of Feedstuffs for Swine, *Pork information Gateway* 2003. Dostupný z WWW:
<http://vce.porkgateway.com/c/document_library/get_file?folderId=5&name=07-06-03g_c052006.pdf>
- [18] Sbíрка zákonů - vyhláška Ministerstva zdravotnictví. č. 4/2008 Sb. [online]. 2008, [cit. 2010-12-2]. Dostupná z WWW:
< <http://www.sagit.cz/pages/sbirkatxt.asp?zdroj=sb08004&cd=76&typ=r> >
- [19] VRBOVÁ, T., *Víme co jíme? aneb průvodce Ěčky v potravinách*, EcoHouse 2001, ISBN: 80-238-7504-3, 20, 26, 40-41, 134-137, 165-167 s.
- [20] *Přídavné látky v potravinách*, SZÚ [online]. 2008, [cit. 2010-12-2]. Dostupná z WWW:
<http://www.szu.cz/uploads/documents/czpz/vyziva/legislativa/E_kody.pdf >
- [21] *FOOD PHOSPHATES - Nutritional aspects*, The Food Nutrition Board of the National Academies [online]. 2008, [cit. 2010-20-1]. Dostupný z WWW:
<www.phosphatesfacts.org/.../Nutritional_Aspects_of_Food_Phosphates.pdf>
- [22] *Phosphoric acid and phosphate salts* - WHO Food Additives Series 17. IPCS INCHEM [online]. 2009, [cit. 2010-25-2]. Dostupný z WWW:
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je22.htm>

- [23] *Parathyroid Hormone* - WebMD [online]. 2008, [cit. 2010-20-1]. Dostupný z WWW: <<http://www.webmd.com/a-to-z-guides/parathyroid-hormone>>
- [24] *Phosphorus* - Complementary and Alternative Medicine Index [online]. 2009, [cit. 2010-26-2]. Dostupný z WWW: <<http://www.umm.edu/altmed/articles/phosphorus-000319.htm>>
- [25] MAIER, S., SHERER, S., LOESSNER M., Long-chain polyphosphate cause cell lysis and inhibits *Bacillus cereus* septum formation, which is dependent on divalent cations, *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, vol. 65(9):3942-3949
- [26] MATSUOKA, A., TSUTSUMI, M., WATANABE, F., Inhibitory Effect of Hexametaphosphate on the Growth of *Staphylococcus aureus*, *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 1995, no. 5, 588-594 s.
- [27] KAPRÁLEK, F., *Základy bakteriologie*, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum 1999. 92-110s. ISBN 80-7184-811-5
- [28] HUANG, K., MUKHOPADHYAY, R., WEN, B., GITAI, Z., WINGREEN, N., Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, 105(49): 19282–19287
- [29] POOL, R., *Advances in microbial physiology*, svazek 37, Academic press limited, London, 1995, vol. 54
- [30] SWOBODA, J., CAMPBELL, J., MEREDITH, T., WALKER, S., Wall Teichoic Acid Function, Biosynthesis and Inhibition, *ChemBioChem* 2010, vol. 11, 35-45 s.
- [31] BEVERIDGE, T., MURRAY, R., Uptake and Retention of Metals by cell Walls of *Bacillus subtilis*, *Journal of Bacteriology* 1976, 127(3): 1502–1518
- [32] LAMBERT, P., HANCOCK, I., BADDILEY, J., The Interaction of Magnesium Ions with Teichoic Acid, *Biochemical Journal* 1975, vol. 149(3), 519–524 s.
- [33] WEBB, M., The Influence of Magnesium on cell division, *Journal of General Microbiology* 1951, vol. 5, no. 3, 485-495 s.

- [34] KUNG, F., RAYMOND, J., GLASER, D., Metal Iont Content of Escherichia coli Versus Cell Age, *Journal of Bacteriology* 1976, 126(3): 1089-1095
- [35] ASBELL, M., EAGON, R., Role of Multivalent Cationts in the Organization, *Journal of Bacteriology* 1966, 92(2): 380-387
- [36] KNABEL, S., WALKER, H., HARTMAN, P., Inhibition of Aspergillus flavus and Selected Gram-positive Bakteria by Chelation of Essentials Metal Cationts by Polyphosphates, *Journal of Food Protection*, Vol.54, p.360-365, 1991
- [37] List of Procaryotic names with Standing in Nomenclature LPSN (Formely List of Bacterial names with Standing in Nomenclature) [online]. [cit. 2010-30-4]. Dostupný z WWW: <<http://www.bacterio.cict.fr/index.html>>
- [38] KLABAN, V., *Svět mikrobů*, Univerzita Hradec králové, GAUDEAMUS 2001, 39,40 s. ISBN 80-7041-687-4
- [39] BROCK, T., *Biology of microorganisms*, University of Wisconsin, Library of Congress Cataloging in Publication Data 1979, 600-700 s., ISBN 0-13-076778-6
- [40] SEDLÁČEK, I., *Taxonomie prokaryot*, Masarykova univerzita Brno 2007, ISBN 80-210-4207-9
- [41] *Bacillus cereus* - Miniatlaz mikroorgazmů [online]. [cit. 2010-12-3]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/bac-cer.htm>>
- [42] *Bacillus subtilis* - Miniatlaz mikroorganizmů [cit. 2010-12-3]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/bac-sub.htm>>
- [43] ZAHRADNICKÝ, J. a kolektiv, *Mikrobiologie a epidemiologie*, Avicenum zdravotnické nakladatelství 1987, 296 s.
- [44] ŠILHÁNKOVÁ, L., *Mikrobiologické zkoumání potravin*, VŠCHT Praha 1987, 104s.
- [45] *Staphylococcus aureus* - Miniatlaz mikroorgazmů [online]. [cit. 2010-12-3]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/staph-au.htm>>

- [46] *Enterococcus faecalis* - Miniatury mikroorganismů [online]. [cit. 2010-12-3]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatury/enterofa.htm>>
- [47] *Micrococcus luteus* - Miniatury mikroorganismů [cit. 2010-12-3]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatury/mikr>>
- [48] GERHARDT, P., MURRAY, R., COSTILOW R., NESTER, E., WOOD, W., KRIEG, N., PHILLIPS, G., *Manual of Methods for General Bacteriology*, American society for microbiology 1981, 87,191-197 s., ISBN 0-914826-29-8
- [49] *Micrococcus luteus* - Academic dictionaries and encyclopedias [online]. [cit. 2010-12-3]. Dostupný z WWW: <<http://en.academic.ru/dic.nsf/enwiki/950270>>
- [50] MAZZA, L., PEZZLO, T., SHIGEO, J., PETERSON, E., *Color atlas of medical bacteriology*, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, ASM Press 2004, 1 s., ISBN 1-55581-206-6
- [51] *Biotechnologické aplikace mikroorganismů*-syllabus VŠCHT, [online]. [cit. 2010-24-3]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/bam-mag.pdf>>
- [52] BROCK, T., *Biology of microorganisms*, University of Wisconsin, Library of Congress Cataloging in Publication Data 1979, 659, 660 s., ISBN 0-13-076778-6
- [53] *BioMed HTC - Proteus mirabilis* [online]. 2009 [cit. 2010-24-3]. Dostupný z WWW: <<http://www.biomedhtc.org.uk/ProteusMirabilis.htm>>
- [54] *GENUS: Escherichia, SPECIES: Escherichia coli* [online]. [cit. 2010-14-3]. Dostupný z WWW: <http://www.cvm.umn.edu/Academics/course_web/current/Cvm6202M/pdf_files/4-2_Ecolorevised.pdf>
- [55] *Escherichia coli* - MicrobiologyBytes [online]. [cit. 2010-14-3]. Dostupný z WWW: <http://www.microbiologybytes.com/video/Ecoli.html>

- [56] *Salmonella enterica* - Miniatlaz mikroorganizmů [online]. [cit. 2010-14-3]. Dostupný z WWW:
<<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/salm.htm>>
- [57] *Citrobacter ssp.* - *MicrobLog* [online]. [cit. 2010-14-3]. Dostupný z WWW:
<<http://microblog.me.uk/93>>
- [58] *Citrobacter freundii* - Miniatlaz mikroorganizmů [online]. [cit. 2010-14-3]. Dostupný z WWW:
<<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/citro.htm>>
- [59] *Hexametafosforečnan sodný* [online]. [cit. 2010-14-3]. Dostupný z WWW:
<www.piskac.cz/.../HEXAMETAFOSFOROCNAN%20SODNY.RTF>
- [60] LEE, R., HARTMAN, P., OLSON, D., WILLIAMS, F., Bactericidal and Bacteriolytic Effects of Selected Food-Grade Phosphates, Using *Staphylococcus aureus* as a Model System, *Journal of Food Protection*, vol. 57, num. 4, 1994, p. 276-383(8)
- [61] *Use of antimicrobial polyphosphates in food processing* - Patent US6509050 [online]. [cit. 2010-14-3]. Dostupný z WWW:
<<http://www.freepatentsonline.com/6509050.pdf>>
- [62] CARNEIRO DE MELO, A., CASSAR, C., MILES R., Trisodium Phosphate Increases Sensivity of Gram-Negative Bakteria to Lysozyme and Nisin, *Journal of food protection* 1998, 61(7):839-43.
- [63] JEONG-WEON, K., SLAVIK, M., PHARR, M., RABEN, D., LOBSINGER, CH., TSAI, S., Reduction of *Salmonella* on post-chill chicken carcasses by Trisodium phosphate (NA₃PO₄) treatment, *Journal of Food Safety* 2007, vol. 14, p. 9-17
- [64] MASNIYOM, P., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W., Synergistic antimicrobial effect of pyrophosphate on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 0157 in modified atmosphere packaged and refrigerated seabass slices, *LWT Food Science and Technology* 2006, vol. 39, p. 302-307
- [65] SAMPATHKUMAR, B., KHACHATOURIANS, G., KORBER, R., High pH during Trisodium Phosphate Treatment Causes Membrane Damage and Destruction of

- Salmonella enterica* ser. Enteritidis, *Food & Nutrition Press*, 1994, 2003, p. 122-129, Vol. 69, No. 1
- [66] SEWARD, R., LIN, C., MELACHOURIS, N., Heat-Sensitization of Salmonella by Polyphosphates, *Journal of Food Science*, Volume 51, Issue 2, p. 471-473, 2006
- [67] PATHANIA, A., MCKEE, S., BILGILI, S., SINGH, M., Antimicrobial activity of commercial marinades against multiple strains of Salmonella spp., *International Journal of Food Microbiology*, FOOD-05027, p. 4
- [68] SUÁREZ, V., CARRASCO, M., SIMONETTA, A., RIVERA, M., REINHEIMER, J., Phosphates as Inhibitor of Yeasts isolated from Food sources. *Ital. Journal of Food Science*, n.3, vol.19, 2007
- [69] LEBRON, C., MOLINS, R., WALKER, H., KRAFT, A., STAHR, H., Inhibition of Growth of Aspergilli in Medium Containing Phosphates, *Journal of food Protection*, Vol. 52, No. 1, p. 4-6, 2006
- [70] ČECHOVÁ, L., JANALÍKOVÁ, M., *Obecná mikrobiologie*. Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, 2007. 128-130s. ISBN 978-80-7318-516
- [71] *Růst bakteriální populace*- Wikipedie, otevřená encyklopedie [online]. 2010 [cit. 2010-14-3]. Dostupný z WWW:
<http://cs.wikipedia.org/wiki/R%C5%AFst_bakteri%C3%A1ln%C3%AD_populace>
- [72] *Turbidimetrie* - datový standard MZČR [online]. 2010 [cit. 2010-26-3]. Dostupný z WWW:
<<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200620/hypertext/BOJVABU.htm>>
- [73] ALUPOAEI, C., GARCIA-RUBIO, L., Growth behavior of microorganisms using UV-VIS spectroscopy, *Manuskript 03-336.R1 in Biotechnology and Bioengineering* 2003, vol. 86, p.163-167
- [74] SUTTON, S., Measurement of Cell Concentration in Suspension by Optical Density, *PMF Newsletter*, 2006. Dostupný z WWW:
<<http://www.microbiol.org/white.papers/WP.OD.htm>>

- [75] FUJITA, T., NUNOMURA, K., New Turbidimetric Device for Measuring Cell Concentrations in Thick Microbial Suspensions, *APPLIED MICROBIOLOGY*, Vol.16, No. 2, p. 212-215, 1968
- [76] JULÁK, J., *Identifikace Bakterií metodami instrumentální chemické analýzy*, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum 1998. 40-42s. ISBN 80-7184-451-9
- [77] *Spektrofotometr* - Wikipedia the free encyclopedia [online]. 2010 [cit. 2010-03-28]. Dostupné z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometr>>.
- [78] *Optická hustota* - Wikipedia the free encyclopedia [online]. 2010 [cit. 2010-03-28]. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Optick%C3%A1_hustota>
- [79] ZWIETERING, M., JOGENBURGER, I., ROMBOUTS, F., Modeling of the Bacterial Growth Curve, *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, no. 6, s. 1875-1881
- [80] KAPRÁLEK, F., *Fyziologie bakterií*, SPN Praha, 1986, 608 s.
- [81] *Taxonomie stafylokoků a příbuzných rodů čeledě Staphylococaceae* - Informační systém Masarykovy univerzity v Brně. Dostupný z WWW: <http://is.muni.cz/th/13197/prif_d/Uvod.pdf>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
E 339	ortofosforečnany sodné
E 340	ortofosforečnany draselné
E 341	ortofosforečnany vápenaté
E342	ortofosforečnany amonné
E 343	ortofosforečnany hořečnaté
E 450	difosforečnany
E 451	trifosforečnany
E 452	polyfosforečnany
PTH	parathormon, parathyroidní hormon
RDA	Recommended dietary allownces
SAPP	kyselý pyrofosforečnan sodný
MIC	minimální inhibiční koncentrace
TSP	fosforečnan trisodný
TSPP	pyrofosforečnan tetrasodný
SPG	polyfosforečnan sodný „glassy“
W-TA	stěnová forma teichoové kyseliny
L-TA	lipoteichoová kyselina
OD	optická denzita (hustota)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Kyselina fosforečná a její disociační stupně [6].....	12
Obr. 2. Růstová křivka bakterií [71].....	38
Obr. 3. Vliv fosforečnanů na délku lag fáze <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010.....	50
Obr. 4. Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010	51
Obr. 5. Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> CCM 2216	53
Obr. 6. Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> CCM 2216.....	54
Obr. 7. Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732.....	55
Obr. 8. Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732.....	56
Obr. 9. Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953.....	57
Obr. 10. Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953.....	58
Obr. 11. Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224.....	59
Obr. 12. Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224.....	60
Obr. 13. Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze <i>Escherichia coli</i> CCM 3954.....	61
Obr. 14. Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Escherichia coli</i> CCM 3954.....	62
Obr. 15 Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze <i>Citrobacter freundii</i> CCM 7187.....	63
Obr. 16 Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Citrobacter freundii</i> CCM 7187.....	64
Obr. 17 Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188.....	65
Obr. 18 Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188.....	66

Obr. 19 Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis CCM 4420.....	69
Obr. 20 Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis CCM 4420.....	70
Obr. 21 Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	67
Obr. 22 Vliv fosforečnanových solí na růst <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955.....	68

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Hodnoty pH kultivačního prostředí	49
Tab. 2. Minimální inhibiční koncentrace zkoušených fosforečnanů.....	74

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA PI: VLIV FOSFOREČNANOVÝCH SOLÍ NA DÉLKU LAG FÁZE A MAXIMÁLNÍ HODNOTU RŮSTU VYBRANÝCH BAKTERIÍ

PŘÍLOHA PII: VLIV RŮZNÝCH KONCENTRACÍ FOSFOREČNANŮ NA RŮSTOVOU RYCHLOST A GENERAČNÍ DOBU VYBRANÝCH BAKTERIÍ

PŘÍLOHA PI: VLIV FOSFOREČNANOVÝCH SOLÍ NA DÉLKU LAG FÁZE A MAXIMÁLNÍ HODNOTU RŮSTU VYBRANÝCH BAKTERIÍ

Příloha PI A: Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze *B. cereus* CCM 2010

Koncentrace soli	Lag fáze [h]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	0,187	0,689	0,978	2,082	x	x	x	x	x
HEXA 70	0,233	0,418	0,370	x	x	x	2,263	1,623	x
KPS	0,358	0,354	0,001	0,001	0,641	2,242	0,872	0,001	1,669
FST	0,111	0,001	0,158	0,417	0,290	0,228	1,295	0,001	x
DIDI	0,725	0,456	0,424	0,149	0,127	0,316	1,065	1,472	2,679
PYRO 52	0,287	0,490	2,749	5,117	4,488	11,508	0,852	0,001	x
TRIKRYSTAL	0,355	0,040	7,206	9,002	11,821	4,497	3,377	0,755	4,855

Příloha PI B: Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze *B. subtilis* subsp. *subtilis* CCM 2216

Koncentrace soli	Lag fáze [h]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	0,001	0,001	0,001	0,001	11,915	11,200	15,484	14,846	x
HEXA 70	0,092	0,577	0,386	2,031	1,283	3,094	1,830	2,049	x
KPS	0,433	0,339	0,573	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
FST	0,001	0,001	1,055	10,121	13,268	17,774	0,137	1,288	0,621
DIDI	0,437	0,462	0,514	0,001	0,001	0,751	0,336	1,788	2,271
PYRO 52	0,564	0,598	11,030	11,181	12,957	10,249	0,001	0,223	x
TRIKRYSTAL	1,489	1,754	10,258	13,015	15,024	1,278	1,511	1,506	x

Příloha PI C: Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze *Ent. faecalis* CCM 4224

Koncentrace soli	Lag fáze [h]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	0,492	2,364	0,548	1,340	0,706	1,300	1,444	1,416	x
HEXA 70	0,994	1,858	0,697	1,563	6,578	3,902	4,960	2,756	5,060
KPS	0,420	0,827	0,741	2,144	0,200	0,768	1,930	0,001	x
FST	0,454	0,852	0,774	0,884	0,001	0,353	3,337	5,507	x
DIDI	0,459	0,552	1,652	1,133	1,109	0,123	0,656	1,448	0,617
PYRO 52	4,850	0,454	1,661	1,540	1,717	1,504	2,525	4,286	x
TRIKRYSTAL	0,001	0,001	0,001	0,389	0,448	0,629	3,820	x	x

Příloha PI D: Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze *S. aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

Koncentrace soli	Lag fáze [h]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	0,001	0,001	0,001	0,343	6,843	x	x	x	x
HEXA 70	0,001	0,018	0,320	2,566	2,567	2,292	2,089	3,068	x
KPS	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	6,131	0,001	0,268
FST	0,001	0,001	0,001	1,766	2,611	3,118	x	x	x
DIDI	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,661
PYRO 52	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	x	x	x	x
TRIKRYSTAL	0,001	0,001	1,141	6,457	11,106	x	x	x	x

0,001....nebyla patrna žádná lag fáze, bakterie přecházely rovnou do fáze exponenciální

x.....žádný nárůst

Příloha PI E: Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze *M. luteus* CCM 732

Koncentrace soli	Lag fáze [h]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	0,001	0,001	0,001	x	x	x	x	x	x
HEXA 70	2,016	3,183	4,433	3,187	5,037	x	x	x	x
KPS	0,862	0,644	1,150	2,552	2,227	2,907	1,540	2,430	6,814
FST	1,908	0,001	1,301	x	x	x	x	0,946	1,113
DIDI	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,118	0,001	2,320
PYRO 52	0,001	0,001	0,001	1,523	0,001	0,001	0,576	x	x
TRIKRYSTAL	5,502	3,952	4,730	10,070	4,959	x	x	x	x

Příloha PI F: Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze *E. coli* CCM 3954

Koncentrace soli	Lag fáze [h]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	0,001	0,273	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	2,051	7,978
HEXA 70	0,001	0,001	0,196	0,704	0,233	1,114	6,489	7,412	x
KPS	0,001	0,337	0,286	0,331	0,308	0,354	0,252	0,599	5,559
FST	0,241	0,001	0,001	4,434	0,674	0,844	1,576	2,490	1,074
DIDI	0,271	0,363	0,275	0,239	0,236	0,440	0,321	0,001	0,711
PYRO 52	0,166	0,457	1,024	2,770	5,440	9,504	1,232	1,737	x
TRIKRYSTAL	2,702	3,151	12,733	x	x	x	x	x	x

Příloha PI G: Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

Koncentrace soli	Lag fáze [h]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
HEXA 70	0,001	0,228	0,280	0,147	0,286	0,415	3,493	1,195	0,426
KPS	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,823
FST	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
DIDI	0,001	0,794	0,020	1,026	1,162	2,053	3,525	2,786	2,942
PYRO 52	0,001	0,001	0,001	1,740	2,140	3,835	5,647	8,161	x
TRIKRYSTAL	0,001	0,001	0,910	x	x	x	x	x	x

Příloha PI H: Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze *Ps. aeruginosa* CCM 3955

Koncentrace soli	Lag fáze [h]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	0,001	3,917	0,001	1,081	0,043	1,477	0,657	0,422	13,881
HEXA 70	0,001	0,001	0,047	0,316	0,456	0,503	0,314	0,001	0,875
KPS	0,001	0,001	0,001	0,001	0,329	0,549	0,001	0,001	5,399
FST	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,100	0,001	0,382	0,001
DIDI	0,001	0,794	0,001	2,837	2,901	3,757	4,406	3,550	3,451
PYRO 52	0,619	0,476	0,340	0,066	1,733	2,593	0,847	1,399	x
TRIKRYSTAL	2,319	4,034	1,039	7,322	13,118	x	x	x	x

0,001....nebyla patrna žádná lag fáze, bakterie přecházely rovnou do fáze exponenciální
x.....žádný nárůst

Příloha PI I: Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze *P. mirabilis* CCM 7188

Koncentrace soli	Lag fáze [h]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	1,033
HEXA 70	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,321	1,075	1,141
KPS	0,001	0,001	0,716	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	1,389
FST	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
DIDI	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,827	0,001
PYRO 52	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	x
TRIKRYSTAL	0,001	0,001	0,001	6,762	x	x	x	x	x

Příloha PI J: Vliv fosforečnanových solí na délku lag fáze *C. freundii* CCM 7187

Koncentrace soli	Lag fáze [h]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	0,001	0,144	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
HEXA 70	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
KPS	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
FST	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
DIDI	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,634	0,095	0,001
PYRO 52	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,126
TRIKRYSTAL	0,001	0,001	0,194	3,378	12,950	10,235	x	x	x

0,001....nebyla patrna žádná lag fáze, bakterie přecházely rovnou do fáze exponenciální

x.....žádný nárůst

Příloha PI K: Vliv fosforečnanových solí na maximální hodnotu růstu *B. cereus* CCM 2010

Koncentrace soli	Maximální hodnota								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	6,058	5,995	5,185	4,671	x	x	x	x	x
HEXA 70	5,648	6,090	6,032	x	x	x	3,893	4,823	x
KPS	6,047	5,882	6,072	6,211	5,987	5,932	6,066	6,053	5,848
FST	4,960	5,643	5,195	5,170	5,261	5,165	4,324	5,220	x
DIDI	5,987	5,945	6,062	6,055	6,153	6,177	5,947	6,269	5,573
PYRO 52	5,800	5,984	5,877	5,563	5,412	4,799	3,533	4,850	x
TRIKRYSTAL	5,617	6,056	5,797	5,337	5,139	2,663	3,751	4,558	3,545

Příloha PI L: Vliv fosforečnanových solí na maximální hodnotu růstu *B. subtilis* CCM 2216

Koncentrace soli	Maximální hodnota								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	6,531	6,543	6,639	5,872	6,044	5,924	6,123	6,183	x
HEXA 70	6,095	6,244	6,172	3,599	4,237	3,500	4,717	4,782	x
KPS	6,018	6,159	6,050	6,082	5,997	5,982	5,851	5,661	5,690
FST	6,013	5,964	5,707	5,131	5,250	4,761	4,215	4,749	4,752
DIDI	5,798	5,758	5,629	5,925	5,709	5,722	5,635	5,404	5,502
PYRO 52	6,156	5,756	5,181	5,024	5,131	5,317	3,988	4,766	x
TRIKRYSTAL	5,802	5,889	4,957	4,986	4,794	3,959	4,403	4,563	x

x....žádný nárůst

Příloha PI M: Vliv fosforečnanových solí na maximální hodnotu růstu *Ent. faecalis* CCM 4224

Koncentrace soli	Maximální hodnota								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	4,758	3,474	4,731	4,684	4,630	4,460	4,141	4,271	x
HEXA 70	4,975	4,831	4,772	4,920	4,308	4,904	4,250	4,553	3,752
KPS	5,148	4,564	5,141	4,739	4,725	4,892	4,487	4,484	x
FST	5,033	4,769	5,031	5,031	5,045	5,062	4,515	4,311	x
DIDI	5,908	5,157	5,313	5,259	5,270	5,814	3,836	5,127	3,925
PYRO 52	4,938	4,912	5,186	5,193	5,136	5,172	5,224	5,007	x
TRIKRYSTAL	5,354	5,143	5,155	5,234	5,137	5,000	4,740	x	x

Příloha PI N: Vliv fosforečnanových solí na maximální hodnotu růstu *S. aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

Koncentrace soli	Maximální hodnota								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	6,106	5,696	5,076	4,253	4,471	x	x	x	x
HEXA 70	6,056	5,970	5,742	4,284	4,745	4,358	3,889	4,241	x
KPS	5,989	5,882	5,860	5,766	5,879	5,905	5,554	5,883	5,838
FST	5,938	5,886	5,896	4,403	4,033	3,957	x	x	x
DIDI	6,056	6,305	6,152	6,196	6,115	6,127	6,152	6,122	5,823
PYRO 52	6,034	6,055	5,640	5,161	3,940	4,522	x	x	x
TRIKRYSTAL	6,051	5,954	5,946	5,599	5,186	x	x	x	x

Příloha PI O: Vliv fosforečnanových solí na maximální hodnotu růstu *M. luteus* CCM 732

Koncentrace soli	Maximální hodnota								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	6,195	5,539	3,614	x	x	x	x	x	x
HEXA 70	5,986	5,762	5,440	4,128	2,568	x	x	x	x
KPS	6,069	5,896	5,794	5,655	5,796	5,789	5,696	5,791	5,447
FST	4,998	4,038	3,764	x	x	x	x	4,710	3,797
DIDI	5,742	5,885	5,848	6,023	5,895	5,995	6,008	5,988	5,593
PYRO 52	6,145	6,166	5,772	4,250	0,714	1,316	0,850	x	x
TRIKRYSTAL	5,527	5,745	5,638	5,154	5,159	x	x	x	x

Příloha PI P: Vliv fosforečnanových solí na maximální hodnotu růstu *E. coli* CCM 3954

Koncentrace soli	Maximální hodnota								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	6,369	5,284	6,164	6,375	6,385	6,313	6,608	6,587	5,169
HEXA 70	6,097	6,050	6,048	5,855	6,053	5,917	5,702	5,178	x
KPS	5,918	5,708	5,978	6,028	6,033	6,022	6,155	6,085	5,539
FST	6,230	6,454	6,068	5,662	4,736	5,628	5,751	5,363	4,882
DIDI	6,085	5,882	5,953	5,975	6,002	5,417	5,644	6,194	5,840
PYRO 52	4,993	5,237	5,186	5,193	5,136	5,172	5,224	5,007	x
TRIKRYSTAL	5,992	5,706	4,517	x	x	x	x	x	x

x...žádný nárůst

Příloha PI Q: Vliv fosforečnanových solí na maximální hodnotu růstu *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

Koncentrace soli	Maximální hodnota								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	6,397	5,785	6,240	6,442	6,496	6,358	6,404	6,529	5,896
HEXA 70	6,002	6,026	6,009	5,786	6,086	5,897	5,689	5,626	6,050
KPS	6,191	5,890	6,027	6,061	6,004	5,943	5,899	5,943	5,866
FST	6,334	6,246	6,098	6,043	6,165	6,076	6,097	6,057	5,915
DIDI	6,000	5,781	5,943	5,874	5,655	5,106	4,935	5,999	5,792
PYRO 52	5,935	5,960	5,784	5,606	5,666	5,370	5,886	4,427	x
TRIKRYSTAL	6,200	6,074	5,723	4,495	4,500	5,054	2,785	4,412	x

Příloha PI R: Vliv fosforečnanových solí na maximální hodnotu růstu *Ps. aeruginosa* CCM 3955

Koncentrace soli	Maximální hodnota								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	6,218	5,996	6,472	6,549	6,617	6,578	6,718	6,604	5,958
HEXA 70	6,714	6,431	6,730	6,795	6,900	6,898	6,959	6,255	2,193
KPS	6,716	6,153	6,743	6,815	6,864	6,900	6,899	6,728	6,664
FST	6,691	6,707	6,511	6,464	6,513	6,438	5,651	5,327	x
DIDI	6,031	6,115	6,242	6,250	6,221	5,500	5,579	6,080	6,210
PYRO 52	6,691	6,707	6,511	6,464	6,513	6,438	5,651	5,327	x
TRIKRYSTAL	6,857	6,530	6,558	6,535	4,861	x	x	4,926	x

Příloha PI T: Vliv fosforečnanových solí na maximální hodnotu růstu *P. mirabilis* CCM 7188

Koncentrace soli	Maximální hodnota								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	6,619	6,135	6,272	6,302	6,374	6,245	5,869	5,976	4,478
HEXA 70	6,628	6,350	6,377	6,102	6,320	5,941	5,211	4,513	4,681
KPS	6,191	5,889	6,098	6,062	6,007	5,940	5,912	5,957	5,832
FST	6,844	6,670	6,451	6,300	6,320	6,253	6,291	6,003	5,971
DIDI	6,647	6,546	6,607	6,584	6,689	6,441	6,409	6,435	6,345
PYRO 52	6,565	6,494	6,351	6,209	6,139	6,014	6,009	5,528	x
TRIKRYSTAL	6,536	6,450	6,245	5,875	x	x	x	x	x

Příloha PI U: Vliv fosforečnanových solí na maximální hodnotu růstu *C. freundii* CCM 7187

Koncentrace soli	Maximální hodnota								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
HEXA 68	6,430	5,781	6,054	6,236	6,156	6,410	6,359	6,440	5,813
HEXA 70	5,743	6,021	5,966	5,721	6,058	5,924	5,892	5,727	5,870
KPS	5,870	5,697	5,917	5,854	5,917	5,903	5,970	6,037	5,488
FST	5,966	6,055	5,608	5,500	5,763	5,832	5,521	6,036	6,247
DIDI	6,044	6,161	6,211	6,222	6,270	5,582	5,719	6,194	5,630
PYRO 52	6,010	5,905	5,957	5,860	5,790	5,438	5,777	5,977	5,277
TRIKRYSTAL	5,882	5,675	5,611	5,616	4,937	4,199	x	x	x

x....žádný nárůst

PŘÍLOHA PII: VLIV RŮZNÝCH KONCENTRACÍ FOSFOREČNANŮ NA RŮSTOVOU RYCHLOST A GENERAČNÍ DOBU VYBRANÝCH BAKTERIÍ

Příloha PII A: Vliv různých koncentrací soli HEXA 68 na růstovou rychlost vybraných bakterií

Koncentrace soli	Růstová rychlost [h ⁻¹]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
<i>Micrococcus luteus</i>	1,798	1,570	1,188	x	x	x	x	x	x
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,666	1,608	1,937	3,392	1,773	x	x	x	x
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,387	2,975	2,097	1,341	1,192	2,491	1,485	1,373	x
<i>Bacillus cereus</i>	1,707	1,640	1,589	2,658	x	x	x	x	x
<i>Bacillus subtilis</i>	1,135	1,019	1,037	1,058	1,312	1,370	1,109	0,813	x
<i>Escherichia coli</i>	1,831	2,039	1,485	1,140	1,203	1,115	0,784	1,173	1,041
<i>Salmonella enterica</i>	1,904	2,027	1,908	1,487	1,426	1,507	1,090	1,053	1,328
<i>Proteus mirabilis</i>	2,677	3,194	2,578	1,943	2,168	2,386	1,578	1,591	7,870
<i>Citrobacter freundii</i>	2,241	2,612	2,657	2,288	2,650	2,235	2,196	1,934	1,826
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,190	1,257	0,844	0,963	0,818	0,979	0,744	0,851	0,816

Příloha PII B: Vliv různých koncentrací soli HEXA 70 na růstovou rychlost vybraných bakterií

Koncentrace soli	Růstová rychlost [h ⁻¹]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
<i>Micrococcus luteus</i>	1,233	1,453	1,202	1,303	3,109	x	x	x	x
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,978	1,783	1,822	4,582	4,734	5,930	7,296	3,912	x
<i>Enterococcus faecalis</i>	3,968	2,902	2,002	1,655	1,486	2,754	2,955	1,801	4,164
<i>Bacillus cereus</i>	1,585	1,581	1,334	x	x	x	1,097	1,684	x
<i>Bacillus subtilis</i>	1,137	1,072	1,147	3,408	2,259	4,546	1,946	2,732	x
<i>Escherichia coli</i>	1,668	1,295	1,298	1,264	1,191	0,954	0,686	1,018	x
<i>Salmonella enterica</i>	1,945	1,582	1,546	1,313	1,321	1,101	1,434	1,106	1,484
<i>Proteus mirabilis</i>	2,025	1,479	1,405	1,148	1,297	0,850	0,967	1,297	1,617
<i>Citrobacter freundii</i>	2,741	1,853	1,381	1,962	1,852	1,562	1,678	2,328	1,645
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,618	1,564	1,268	1,203	1,146	1,101	0,957	1,376	1,515

Příloha PII C: Vliv různých koncentrací soli PYRO 52 na růstovou rychlost vybraných bakterií

Koncentrace soli	Růstová rychlost [h ⁻¹]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
<i>Micrococcus luteus</i>	1,182	1,460	1,146	1,492	0,069	0,108	0,173	x	x
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,871	1,974	2,017	1,310	1,772	x	x	x	x
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,175	0,239	0,346	0,419	0,466	0,252	0,235	0,385	0,166
<i>Bacillus cereus</i>	1,712	1,505	1,113	1,007	0,815	1,326	0,707	2,841	x
<i>Bacillus subtilis</i>	1,406	1,283	2,240	1,167	1,697	0,774	1,923	4,726	x
<i>Escherichia coli</i>	1,668	1,458	0,942	0,846	0,987	1,450	0,995	0,647	x
<i>Salmonella enterica</i>	1,814	1,689	1,272	1,285	0,930	1,030	0,569	1,033	x
<i>Proteus mirabilis</i>	1,829	1,940	2,054	1,898	2,569	1,091	1,709	1,750	x
<i>Citrobacter freundii</i>	2,372	2,683	2,174	2,261	2,345	2,324	2,043	1,600	0,835
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,509	1,303	1,139	0,952	1,064	0,976	1,309	1,910	x

x...žádný nárůst

Příloha PII D: Vliv různých koncentrací soli TRIKRYSTAL na růstovou rychlost vybraných bakterií

Koncentrace soli	Růstová rychlost [h ⁻¹]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
<i>Micrococcus luteus</i>	0,868	0,859	0,794	1,036	0,975	x	x	x	x
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,089	2,444	1,687	2,377	0,840	x	x	x	x
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,788	1,805	1,528	1,379	1,450	1,282	1,825	x	x
<i>Bacillus cereus</i>	2,096	1,280	1,096	0,978	0,795	1,348	1,320	2,057	1,901
<i>Bacillus subtilis</i>	2,193	1,700	3,200	2,051	2,090	1,668	6,141	6,276	x
<i>Escherichia coli</i>	1,315	1,276	2,711	x	x	x	x	x	x
<i>Salmonella enterica</i>	1,582	1,537	0,858	1,224	0,652	1,124	2,263	1,624	x
<i>Proteus mirabilis</i>	2,369	2,626	1,779	0,955	x	x	x	x	x
<i>Citrobacter freundii</i>	2,260	1,962	1,607	1,023	1,950	3,073	x	x	x
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,330	11,438	1,069	1,411	1,310	x	x	4,301	x

Příloha PII E: Vliv různých koncentrací soli FST na růstovou rychlost vybraných bakterií

Koncentrace soli	Růstová rychlost [h ⁻¹]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
<i>Micrococcus luteus</i>	0,757	0,565	1,226	x	x	x	x	2,021	1,702
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,861	2,132	1,706	1,554	1,928	1,947	x	x	x
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,337	2,043	1,776	2,258	2,674	1,941	3,558	2,524	x
<i>Bacillus cereus</i>	2,187	1,966	0,891	1,892	1,727	1,471	2,201	1,601	x
<i>Bacillus subtilis</i>	1,796	1,345	1,565	1,029	1,033	1,414	1,313	2,079	2,608
<i>Escherichia coli</i>	1,809	1,391	1,334	0,732	1,171	0,936	0,969	2,313	3,909
<i>Salmonella enterica</i>	2,339	2,010	2,104	1,958	2,011	2,119	1,760	1,839	1,339
<i>Proteus mirabilis</i>	2,298	1,917	2,278	2,032	2,165	2,397	2,932	2,253	1,921
<i>Citrobacter freundii</i>	2,874	2,472	3,046	3,141	2,493	1,745	1,644	2,297	2,479
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,687	1,392	1,438	1,323	1,236	1,176	1,227	1,273	1,565

Příloha PII F: Vliv různých koncentrací soli KPS růstovou rychlost vybraných bakterií

Koncentrace soli	Růstová rychlost [h ⁻¹]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
<i>Micrococcus luteus</i>	1,100	0,981	0,970	1,179	1,002	1,052	0,820	1,100	1,452
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,744	1,998	1,826	1,603	1,540	1,228	1,302	1,170	0,897
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,137	2,094	1,739	1,386	1,701	1,963	1,928	1,214	x
<i>Bacillus cereus</i>	1,898	1,826	1,799	1,423	1,621	2,616	1,519	1,720	0,983
<i>Bacillus subtilis</i>	1,468	1,343	1,270	1,087	1,014	0,887	1,169	2,120	0,834
<i>Escherichia coli</i>	1,746	1,770	1,544	1,412	1,356	1,333	1,239	1,235	0,623
<i>Salmonella enterica</i>	2,584	2,344	2,451	2,466	3,299	2,291	1,948	1,804	0,909
<i>Proteus mirabilis</i>	2,593	2,364	1,562	2,464	3,232	2,311	1,857	1,724	1,037
<i>Citrobacter freundii</i>	2,765	2,318	2,051	2,102	2,119	1,917	1,743	1,865	1,553
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,448	1,406	1,233	1,208	1,160	1,125	1,107	1,456	0,980

x....žádný nárůst

Příloha PII G: Vliv různých koncentrací soli DIDI na růstovou rychlost vybraných bakterií

Koncentrace soli	Růstová rychlost [h ⁻¹]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
<i>Micrococcus luteus</i>	2,078	2,635	3,018	2,633	2,771	2,885	2,477	2,181	2,644
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,326	2,171	2,154	2,011	2,144	2,107	2,072	1,551	1,753
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,079	2,253	2,382	2,327	2,226	1,377	2,638	2,142	x
<i>Bacillus cereus</i>	1,297	1,694	1,491	1,475	1,415	1,485	1,772	2,078	1,475
<i>Bacillus subtilis</i>	1,521	1,652	1,626	1,398	1,519	1,331	1,259	1,351	1,893
<i>Escherichia coli</i>	1,559	1,710	1,559	1,456	1,423	1,714	1,460	1,337	1,532
<i>Salmonella enterica</i>	1,587	1,741	1,496	1,457	1,488	1,613	1,472	1,280	1,536
<i>Proteus mirabilis</i>	1,584	1,849	1,685	1,870	1,808	1,885	1,913	2,154	1,860
<i>Citrobacter freundii</i>	0,629	0,638	0,645	0,742	0,691	0,683	0,867	0,906	x
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,635	0,709	0,629	0,795	0,809	0,976	2,169	1,700	1,129

Příloha PII H: Vliv různých koncentrací soli HEXA 68 na generační dobu vybraných bakterií

Koncentrace soli	Generační doba [h]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
<i>Micrococcus luteus</i>	0,385	0,441	0,583	x	x	x	x	x	x
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,332	0,284	0,411	0,292	0,825	x	x	x	x
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,290	0,023	0,330	0,517	0,581	0,278	0,467	0,505	x
<i>Bacillus cereus</i>	0,406	0,423	0,436	0,261	x	x	x	x	x
<i>Bacillus subtilis</i>	0,611	0,680	0,668	0,655	0,528	0,506	0,625	0,853	x
<i>Escherichia coli</i>	0,378	0,340	0,467	0,608	0,576	0,621	0,884	0,591	0,665
<i>Salmonella enterica</i>	0,364	0,342	0,363	0,466	0,486	0,460	0,636	0,658	0,522
<i>Proteus mirabilis</i>	0,259	0,217	0,269	0,357	0,320	0,290	0,439	0,436	0,088
<i>Citrobacter freundii</i>	0,309	0,265	0,261	0,303	0,262	0,310	0,316	0,358	0,380
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,582	0,551	0,821	0,719	0,847	0,708	0,932	0,815	0,850

Příloha PII I: Vliv různých koncentrací soli HEXA 70 na generační dobu vybraných bakterií

Koncentrace soli	Generační doba [h]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
<i>Micrococcus luteus</i>	0,562	0,477	0,576	0,532	0,223	x	x	x	x
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,350	0,389	0,380	0,151	0,146	0,117	0,095	0,177	x
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,290	0,273	0,371	0,310	0,371	0,326	0,367	0,440	x
<i>Bacillus cereus</i>	0,437	0,438	0,520	x	x	x	0,632	0,411	x
<i>Bacillus subtilis</i>	0,610	0,646	0,604	0,203	0,307	0,152	0,356	0,254	x
<i>Escherichia coli</i>	0,415	0,535	0,534	0,548	0,582	0,726	1,010	0,681	x
<i>Salmonella enterica</i>	0,356	0,438	0,448	0,528	0,525	0,629	0,483	0,627	0,467
<i>Proteus mirabilis</i>	0,342	0,469	0,493	0,604	0,534	0,815	0,717	0,534	0,429
<i>Citrobacter freundii</i>	0,253	0,374	0,502	0,353	0,374	0,444	0,413	0,298	0,421
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,428	0,443	0,546	0,576	0,605	0,630	0,724	0,504	0,457

x....žádný nárůst

Příloha PII J: Vliv různých koncentrací soli PYRO 52 na generační dobu vybraných bakterií

Koncentrace soli	Generační doba [h]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
<i>Micrococcus luteus</i>	0,586	0,475	0,605	0,465	10,076	6,399	3,998	x	x
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,370	0,351	0,344	0,529	0,391	x	x	x	x
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,290	0,273	0,371	0,310	0,371	0,326	0,367	0,440	x
<i>Bacillus cereus</i>	0,405	0,460	0,623	0,688	0,851	0,523	0,981	0,244	x
<i>Bacillus subtilis</i>	0,493	0,540	0,309	0,594	0,408	0,895	0,360	0,147	x
<i>Escherichia coli</i>	0,416	0,475	0,735	0,820	0,702	0,478	0,696	1,072	x
<i>Salmonella enterica</i>	0,382	0,410	0,545	0,539	0,745	0,673	1,219	0,671	x
<i>Proteus mirabilis</i>	0,379	0,357	0,337	0,365	0,270	0,635	0,406	0,396	x
<i>Citrobacter freundii</i>	0,292	0,258	0,319	0,307	0,296	0,298	0,339	0,433	x
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,459	0,532	0,608	0,728	0,651	0,710	0,530	0,363	x

Příloha PII K: Vliv různých koncentrací soli TRIKRYSTAL na generační dobu vybraných bakterií

Koncentrace soli	Generační doba [h]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
<i>Micrococcus luteus</i>	0,799	0,807	0,873	0,669	0,711	x	x	x	x
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,332	0,284	0,411	0,292	x	x	x	x	x
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,388	0,384	0,453	0,503	0,478	0,541	0,380	x	x
<i>Bacillus cereus</i>	0,331	0,542	0,632	0,709	0,872	0,514	0,525	0,337	0,365
<i>Bacillus subtilis</i>	0,316	0,408	0,217	0,338	0,332	0,415	0,113	0,110	x
<i>Escherichia coli</i>	0,527	0,543	0,256	x	x	x	x	x	x
<i>Salmonella enterica</i>	0,438	0,451	0,808	0,566	1,063	0,616	0,306	0,427	x
<i>Proteus mirabilis</i>	0,293	0,264	0,390	0,726	x	x	x	x	x
<i>Citrobacter freundii</i>	0,307	0,353	0,431	0,677	0,355	0,226	x	x	x
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,297	0,061	0,648	0,491	0,529	x	x	0,161	x

Příloha PII L: Vliv různých koncentrací soli FST na generační dobu vybraných bakterií

Koncentrace soli	Generační doba [h]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
<i>Micrococcus luteus</i>	0,916	1,227	0,565	x	x	x	x	0,343	0,407
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,372	0,325	0,406	0,446	0,359	0,356	x	x	x
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,297	0,339	0,390	0,307	0,259	0,357	0,195	0,275	x
<i>Bacillus cereus</i>	0,317	0,352	0,778	0,366	0,401	0,471	0,315	0,433	x
<i>Bacillus subtilis</i>	0,386	0,515	0,443	0,673	0,671	0,490	0,528	0,333	0,266
<i>Escherichia coli</i>	0,383	0,498	0,519	0,946	0,592	0,740	0,715	0,300	0,177
<i>Salmonella enterica</i>	0,296	0,345	0,329	0,354	0,345	0,327	0,394	0,377	0,518
<i>Proteus mirabilis</i>	0,302	0,361	0,304	0,341	0,320	0,289	0,236	0,308	0,361
<i>Citrobacter freundii</i>	0,241	0,280	0,228	0,221	0,278	0,397	0,421	0,302	0,280
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,411	0,498	0,482	0,524	0,561	0,589	0,565	0,544	0,443

x...žádný nárůst

Příloha PII M: Vliv různých koncentrací soli KPS na generační dobu vybraných bakterií

Koncentrace soli	Generační doba [h]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
<i>Micrococcus luteus</i>	0,630	0,707	0,714	0,588	0,691	0,659	0,846	0,630	0,477
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,397	0,347	0,380	0,432	0,450	0,564	0,532	0,592	0,773
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,324	0,331	0,399	0,500	0,407	0,353	0,359	0,571	0,693
<i>Bacillus cereus</i>	0,365	0,380	0,385	0,487	0,427	0,265	0,456	0,403	0,705
<i>Bacillus subtilis</i>	0,472	0,516	0,546	0,637	0,683	0,782	0,593	0,327	0,831
<i>Escherichia coli</i>	0,397	0,391	0,449	0,491	0,511	0,520	0,559	0,561	1,112
<i>Salmonella enterica</i>	0,268	0,296	0,283	0,281	0,210	0,302	0,356	0,384	0,763
<i>Proteus mirabilis</i>	0,267	0,293	0,444	0,281	0,214	0,300	0,373	0,402	0,668
<i>Citrobacter freundii</i>	0,251	0,299	0,338	0,330	0,327	0,361	0,397	0,372	0,446
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,478	0,493	0,562	0,573	0,597	0,616	0,626	0,476	0,707

Příloha PII N: Vliv různých koncentrací soli DIDI na generační dobu vybraných bakterií

Koncentrace soli	Generační doba [h]								
	0.0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.75%	1.0%	2.0%
<i>Micrococcus luteus</i>	0,418	0,301	0,272	0,423	0,274	0,335	0,453	0,481	0,396
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,298	0,319	0,322	0,345	0,323	0,329	0,335	0,447	0,395
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,333	0,308	0,291	0,298	0,311	0,503	0,263	0,324	0,146
<i>Bacillus cereus</i>	0,534	0,409	0,465	0,470	0,490	0,467	0,391	0,334	0,470
<i>Bacillus subtilis</i>	0,456	0,419	0,426	0,496	0,456	0,521	0,551	0,513	0,366
<i>Escherichia coli</i>	0,445	0,405	0,445	0,476	0,487	0,404	0,475	0,518	0,452
<i>Salmonella enterica</i>	0,437	0,398	0,463	0,476	0,466	0,430	0,471	0,541	0,451
<i>Proteus mirabilis</i>	0,437	0,375	0,411	0,371	0,383	0,368	0,362	0,322	0,372
<i>Citrobacter freundii</i>	1,102	1,086	1,075	0,934	1,003	1,014	0,799	0,765	0,276
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,091	0,977	1,101	0,871	0,856	0,710	0,319	0,408	0,614

x....žádný nárůst