

Antimikrobiální účinky kyseliny citrónové a octové na vybrané mikroorganismy izolované z potravin

Alena Bantová

Bakalářská práce
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství
akademický rok: 2006/2007

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Alena BANTOVÁ**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Antimikrobiální účinky kyseliny citrónové a octové na vybrané mikroorganismy izolované z potravin.**

Zásady pro vypracování:

1. **Kyselina citrónová, kyselina octová – vlastnosti, využití v potravinářství, antimikrobiální účinky.**
2. **Skupina gramnegativních nefermentujících, gramnegativní fermentujících tyčinek a grampozitivních koků.**
3. **Praktická část– testování účinků kyseliny citrónové a octové na vybrané zástupce bakterií izolovaných z kuřecího povrchu.**

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

VELÍŠEK, J., Chemie potravin 3, Tábor, 1999. ISBN 80-902391-5-3.

DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J., Chemie potravin, 1. vyd. Praha, 1983.

BLACKBURN, CLIVE de W., Food spoilage microorganisms, Woodhead Publishing, 2006

PHILLIPS, C. A., DUGGAN J. (2002). The effect of temperature and citric acid, alone, and in combination with nisin, on the growth of Arcobacter butzleri in culture. Food Control, 13: 463-468.

STIVARIUS, M. R., POHLMAN, F. W., McELYEA K. S., APPLE J. K. (2002). The effect of acetic acid, gluconic acid and trisodium citrate treatment of beef trimmings on microbial, color and odor characteristics of ground beef through simulated retail display. Meat Science 60: 245-252

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Magda Doležalová

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

22. listopadu 2007

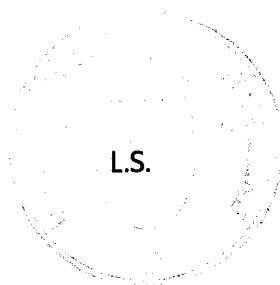
Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2007

Ve Zlíně dne 12. května 2008



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Kyselina citrónová a octová jsou organické kyseliny, lehce rozpustné, kyselé chuti, dobře známé svými antimikrobiálními účinky. Tyto kyseliny jsou přirozenou součástí ovoce a zeleniny, v potravinářství se využívají hlavně jako konzervanty. V této práci byl sledován vliv kyseliny citrónové a octové na tři bakteriální kmeny *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi* a *Staphylococcus aureus* izolované z potravin. Byly zjišťovány minimální inhibiční koncentrace (MIC) obou kyselin. MIC kyseliny citrónové pro *E. coli* je 0,5 % (w/v), u *P. fragi* je 0,1 % (w/v). Růst bakterií *S. aureus* byl zcela inhibován 0,025% (w/v) kyselinou citrónovou. MIC kyseliny octové pro *E. coli*, *P. fragi* a *S. aureus* je 0,025 % (v/v).

Klíčová slova: kyselina citrónová, kyselina octová, MIC, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Citric acid and acetic acid are organics acid, well soluble, of sour taste, well known by its antimicrobial effects. These acids are natural part of the fruits and vegetables and they are used as preservative in food-processing industry. The paper contains the observation of the effect of citric acid and acetic acid on three bacterial strains: *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi* and *Staphylococcus aureus* isolated from food. The minimum inhibitory concentration (MIC) of both acids was determined. MIC of the citric acid on *E. coli* is 0,5 % (w/v), on *P. fragi* is 0,1 % (w/v). The growth of *S. aureus* was stopped completely by the application of 0,025 % (w/v) of citric acid. MIC of the acetic acid on *E. coli*, *P. fragi* and *S. aureus* is 0,025 % (v/v) of acetic acid.

Keywords: citric acid, acetic acid, MIC, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi*,

Staphylococcus aureus

Ráda bych poděkovala Mgr. Magdě Doležalové za odborné rady, konzultace a čas, který mi věnovala při sestavování této bakalářské práce, bez nichž by nevznikla. Dále bych chtěla poděkovat Doc. Marku Koutnému za půjčení přístroje. Za emociální a ekonomické zázemí děkuji svým rodičům.

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

Ve Zlíně

.....
Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 ADITIVA	10
1.1 LÁTKY PRODLUŽUJÍCÍ ÚDRŽNOST	10
1.1.1 Antimikrobiální látky	11
1.2 KYSELINA CITRÓNOVÁ	11
1.2.1 Vlastnosti.....	12
1.2.2 Výroba	12
1.2.3 Využití v potravinářství.....	12
1.3 KYSELINA OCTOVÁ.....	12
1.3.1 Vlastnosti.....	13
1.3.2 Výroba	13
1.3.3 Využití v potravinářství.....	13
2 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY KYSELIN	14
2.1 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY KYSELINY CITRÓNOVÉ	14
2.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY KYSELINY OCTOVÉ.....	14
2.2.1 Kyselina octová	14
2.2.2 Kyselina peroctová	15
3 VYBRANÉ DRUHY MIKROORGANIZMŮ	16
3.1 GRAMNEGATIVNÍ FERMENTUJÍCÍ BAKTERIE	16
3.1.1 <i>Escherichia coli</i>	16
3.2 GRAMNEGATIVNÍ NEFERMENTUJÍCÍ BAKTERIE	17
3.2.1 <i>Pseudomonas fragi</i>	17
3.3 GRAMPOZITIVNÍ KOKY.....	17
3.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	18
4 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	19
II PRAKTICKÁ ČÁST	20
5 METODIKA	21
5.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY:	21
5.2 KULTIVAČNÍ PŮDY.....	22
5.2.1 Masopeptonový bujón (MPB).....	22
5.2.2 Masopeptonový agar (MPA).....	22
5.3 CHEMIKÁLIE.....	23
5.4 POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KMENY	24
5.5 STANOVENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE	25
5.6 STANOVENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE METODOU V MIKROTITRAČNÍ DESTIČCE.....	25
5.6.1 Příprava suspenzí mikroorganismů.....	25

5.6.2	Příprava mikrotitrační destičky	25
5.7	STANOVENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE ZKUMAVKOVOU METODOU.....	26
5.7.1	Příprava zkumavek.....	26
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	28
6.1	MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE KYSELINY CITRÓNOVÉ NA <i>ESCHERICHIA COLI</i>	28
6.2	MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE KYSELINY CITRÓNOVÉ NA <i>PSEUDOMONAS FRAGI</i>	29
6.3	MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE KYSELINY CITRÓNOVÉ NA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> SUBSP. <i>AUREUS</i>	30
6.4	MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE KYSELINY OCTOVÉ NA <i>ESCHERICHIA COLI</i>	31
6.5	MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE KYSELINY OCTOVÉ NA <i>PSEUDOMONAS FRAGI</i>	32
6.6	MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE KYSELINY OCTOVÉ NA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> SUBSP. <i>AUREUS</i>	33
	ZÁVĚR	35
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	37
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	40
	SEZNAM OBRÁZKŮ	41
	SEZNAM TABULEK.....	42
	SEZNAM PŘÍLOH.....	43

ÚVOD

Alimentární onemocnění a kažení potravin zůstávají živě diskutovanými problémy i v současné době. Podle charakteru mikroorganismu vyvolávajícího onemocnění a podle mechanismu jeho účinku se onemocnění dělí na alimentární intoxikaci a alimentární infekci. Onemocnění se nejčastěji projevují zvracením, průjmami a bolestmi břicha. Kažením potravin rozumíme nechtěné pomnožení mikroorganismů způsobujících rozklad a následně nepoživatelnost potravin. Konzervací potravin docílíme prodloužení jejich trvanlivosti a zpomalení pomnožení mikroorganismů.

Mezi nejběžnější konzervační látky patří slabé organické kyseliny. Přírodní organické kyseliny se využívají nejen ke konzervaci ovoce a zeleniny, ale i k ošetření povrchu masa a drůbeže. Kyselina citrónová i kyselina octová jsou přírodní látky, běžně se vyskytující v potravinách. V případě jejich použití při dekontaminaci např. chlazené drůbeže, by bylo účelné zjistit jejich minimální inhibiční koncentraci pro bakterie vyskytující se na povrchu drůbeže.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ADITIVA

Aditiva jsou látky, které se bez ohledu na jejich výživovou hodnotu zpravidla nepoužívají samostatně ani jako potravina, ani jako charakteristická potravní přísada. Přidávají se do potravin při výrobě, balení, přepravě nebo skladování, čímž se samy stávají součástí konečné potraviny [26].

Nejčastěji se podle účelu používání rozeznává šest hlavních skupin aditivních látek [20]:

- látky prodlužující údržnost
- látky upravující aroma
- látky upravující barvu
- látky upravující texturu
- látky zvyšující biologickou hodnotu
- další aditivní látky.

Obecné podmínky použití přídatných látek jsou popsány ve vyhlášce č. 4/2008 Sb., která zpracovává příslušné předpisy Evropských společenství, zároveň navazuje na přímo použitelné předpisy Evropských společenství a upravuje množství a druhy přídatných látek, požadavky na jejich čistotu a podmínky jejich použití do potravin, v nichž se mohou tyto látky vyskytovat. Přídatné látky lze použít v případech, kdy ve stanovených množstvích nepředstavují riziko pro spotřebitele, při jejich použití zůstává zachována výživová hodnota potravin a pokud prodlužují trvanlivost potravin nebo zlepšují organoleptické vlastnosti [28].

V další kapitole bude věnována pozornost pouze skupině látek prodlužující údržnost.

1.1 Látky prodlužující údržnost

Rozdělují se na 2 základní skupiny látek prodlužujících údržnost potravin:

- antimikrobiální látky, konzervační prostředky nebo-li konzervanty používané k ochraně proti nežádoucím mikroorganismům;
- antioxidanty, které chrání některé složky potravin před oxidací [20].

1.1.1 Antimikrobiální látky

Antimikrobní látky jsou sloučeniny prodlužující údržnost potravin tím, že je chrání před znehodnocením způsobeným nežádoucími mikroorganismy.

Antimikrobiální účinky má velké množství přírodních složek potravinářských materiálů. Řada dalších látek je do potravin záměrně přidána [20].

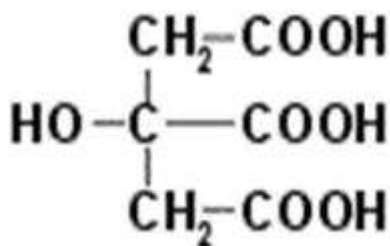
Jako konzervanty se používají některé organické kyseliny a jejich soli, či anorganické kyseliny, jejich soli a estery. Jako fungicidy se používají některé fenoly. Zvláštní použití mají také antibiotika a enzym lysozym. Z anorganických sloučenin se používají dusičnany a dusitany [20].

Konzervační účinky mají také jiné organické i anorganické látky, které se formálně řadí do jiných skupin potravinářských aditiv (např. kyselina octová) nebo se do aditiv nezahrnují (sacharóza, chlorid sodný) [20].

Mezi nejpoužívanější konzervační látky patří kyselina benzoová, která se používá jako antimykotické činidlo, kyselina sorbová, která má inhibiční účinek proti řadě plísní, kvasinek a některým druhům bakterií. Kyselina mravenčí má ze všech mastných kyselin nejvyšší antimikrobiální účinnost. Mezi další organické kyseliny využívané jako látky prodlužující údržnost patří kyselina propionová, octová, fumarová, mléčná a citrónová [20].

1.2 Kyselina citrónová

Kyselina citrónová je slabá trikarboxylová hydroxykyselina (Obr.1). Hojně se vyskytuje v citróněch, kde tvoří 7 až 9 % sušiny, v menším množství je obsažena v ostatním ovoci, v rybízu, v malém množství i v bramborech a v obilí, ve stopách i v mléce a mase [3].



Obr. 1: Vzorec kyseliny citrónové.

1.2.1 Vlastnosti

Kyselina citrónová je při pokojové teplotě bílá krystalická látka. Vyskytuje se jako bezvodá nebo jako monohydrát. Rozpouští se snadno ve vodě, metanolu, etanolu a podobných polárních rozpouštědlech. Z chemického hlediska má kyselina citrónová vlastnosti jako ostatní karboxylové kyseliny [3].

1.2.2 Výroba

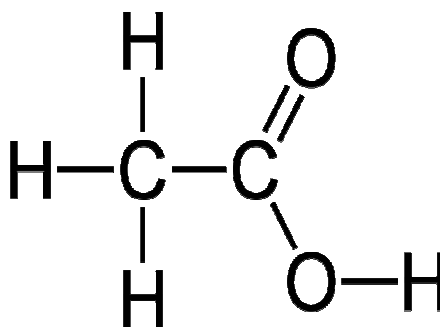
Průmyslově se vyrábí nepravou fermentací sacharidů pomocí plísně *Aspergillus niger*, který při kvašení produkuje kyselinu citrónovou. Po kvašení je kultura zfiltrována a kyselina je z výsledného roztoku vysrážena hydroxidem vápenatým. Samotná kyselina citrónová se ze vzniklé soli získává za pomoci kyseliny sírové [24].

1.2.3 Využití v potravinářství

Kyselina citrónová se používá jako potravinářská přísada kvůli své příjemné kyselé chuti a je označena číselným kódem E 330. Používá se např. v konzervářské praxi, ke snížení pH, působí jako antioxidant, je stabilizátorem ve výrobcích z ovoce, umožňuje tvorbu některých pektinových gelů a zabraňuje tvorbě krystalů v cukrovinkách [26].

1.3 Kyselina octová

Kyselina octová je nejběžnější karboxylovou kyselinou v potravinách (Obr.2). Vyskytuje se běžně v rostlinách, a to jak volná kyselina, tak ve formě solí (octanů). Jako následný fermentační produkt přeměny sacharidů je obsažena v kvasícím ovoci, ve větším množství [22].



Obr. 2: Vzorec kyseliny octové.

1.3.1 Vlastnosti

Kyselina octová je za normálních podmínek bezbarvá kapalina ostrého zápachu, dokonale mísitelná s vodou, s etanolem i dimethyléterem. Je hygroskopická, takže pohlcuje vzdušnou vlhkost. Její vodný roztok o koncentraci přibližně od 5 do 8 % se nazývá ocet [22].

1.3.2 Výroba

Pro potravinářské účely se vyrábí z vína. Zředěný vodný roztok kyseliny octové se získává také biologickou oxidací etanolu pomocí octové bakterie rodu *Acetobacter* [23].

1.3.3 Využití v potravinářství

Kyselina octová se používá jako potravinářská přísada a je označena číselným kódem E 260. Používá se jako okyselující prostředek, působí také proti kvasinkám a bakteriím [26]. V konzervárenství se kyselina octová používá ke snížení pH. Např. zelený hrášek zalitý 2% solným nálevem vykazuje pH kolem 6,1. Přidáme-li do solného nálevu 0,1% kyselinu octovou, poklesne pH na 4,8 [14].

2 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY KYSELIN

2.1 Antimikrobiální účinky kyseliny citrónové

Antibakteriální účinek kyseliny citrónové byl testován na mikroorganismus *Yersinia enterocolitica* na živných půdách. Byly použity koncentrace od 1 do 20 % s různou teplotou kultivace (4, 20, 40 °C). Výsledky ukázaly, že při teplotách 4 °C a 20 °C nebyly prokázány žádné bakteriostatické účinky. Naopak při teplotě 40 °C kyselina citrónová významně redukovala počty *Yersinia enterocolitica* [21].

Kyselina citrónová byla také testována na *Arcobacter butzleri*. Kyselina citrónová byla použita v koncentracích 0,5 %, 1 % a 2 %. Kyselina ve všech koncentracích inhibovala růst *Arcobacter butzleri* v čisté kultuře při 30 °C. Kyselina citrónová byla velmi účinná, jelikož se ani po 8 hodinách při nejnižší koncentraci (0,5 %) neobjevily životaschopné buňky [11]. V jiné studii byl sledován vliv této kyseliny v kombinaci s nisinem na *A. butzleri*. Zde byly použity koncentrace 1, 20, 50 a 100 mM kyseliny citrónové s a bez nisinu. U všech koncentrací byla prokázána redukce *A. butzleri*, ale pouze u 100 mM kyseliny citrónové byl vyšší účinek při aplikaci s nisinem [12].

Kyselina citrónová byla testována na mikroorganismus *Pseudomonas fragi* na živných půdách po dobu 10-12 hodin při 32 °C. Bylo prokázáno, že 100 mM kyselina citrónová má redukující účinek na tuto bakterii [13].

Organické kyseliny se také využívají k alternativní koncepci výživy selat bez antibiotických stimulátorů růstu. Krmná aditiva se přidávají do krmiv selat za účelem stejného antimikrobiálního účinku jako při podání antibiotik. Kyselina citrónová neměla při testování výraznější účinky a tudíž byla pro použití k těmto účelům prakticky nevhodná [27].

2.2 Antimikrobiální účinky kyseliny octové

2.2.1 Kyselina octová

Antibakteriální účinky kyseliny octové byly testovány na kuřecím masu. Kuřecí maso má normální pH 5,5-6. Při hodnotě nad pH 6 je maso považováno za nevhodné pro vakuové balení kvůli jeho snížené údržnosti. 1% roztok kyseliny octové byl aplikován na kuřecí prsa. Bylo zjištěno, že u lactobacilů nebyly žádné inhibiční účinky po prvních dnech apli-

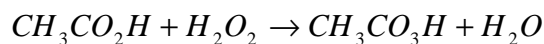
kace, ale od sedmého dne kyselina octová redukovala počty lactobacilů. U pseudomonád a čeledi *Enterobacteriaceae* byly zřetelné redukující účinky po celých 22 dní [7].

Na eliminaci patogenů z hovězího mletého masa byla použita 5% kyselina octová. Výsledky ukázaly, že došlo k redukcii o 1 log CFU/g *Escherichia coli* a o 1,5 log CFU/g u *Salmonella typhimurium* [16].

1% kyselina octová byla použita ve formě spreje na jatečné hovězí maso ve dvou provozních závodech. Bylo prokázáno, že tato koncentrace neměla žádný vliv na redukcii patogenů vyskytujících se na mase. Na redukcii *Escherichia coli* nemělo také vliv oplachování hovězího masa 2% roztokem kyseliny octové. Po ošetření povrchu masa 3% kyselinou octovou došlo k redukcii o 1,5 log. V literatuře bylo také prokázáno, že stejnou účinnost jako 74 °C teplá voda na patogeny inokulované na vepřové maso má 2% kyselina octová [15].

2.2.2 Kyselina peroctová

Kyselina peroctová vzniká při reakci kyseliny octové s peroxidem vodíku (Obr.3). Kyselina peroctová patří k reaktivním dezinfekčním účinným látkám. Její mikrobicidní účinek se zakládá na oxidačních reakcích, vedoucích mimo jiné k degradaci buněčných bílkovin [8].



Obr. 3: Vznik kyseliny peroctové.

Kyselina peroctová se ukázala jako nejúčinnější ze 23 dezinfekčních prostředků proti *Bacillus thermoacidurans*. Kyselina peroctová při 0,001 % je baktericidní, při 0,003 % fungicidní a při 0,3 % sporocidní. Dezinfekční aktivita této kyseliny může být řazena tímto způsobem: bakterie > viry > bakteriální spory [8].

3 VYBRANÉ DRUHY MIKROORGANIZMŮ

V této práci bylo pracováno s bakteriemi, které byly izolovány z povrchu chlazeného drůbežího masa. Obecně se na povrchu drůbežího masa vyskytují zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, dále nefermentující bakterie (*Pseudomonas*), *Campylobacter*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Brochothrix*, *Listeria* [6].

3.1 Gramnegativní fermentující bakterie

Mezi gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky řadíme čeledi *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Pasteurellaceae* a některé rody, nezařazené do čeledi [17].

Čeď *Enterobacteriaceae* zahrnuje gramnegativní střevní tyčinky, které mají velký význam z hygienického hlediska. Jde o nesporotvorné tyčinky, peritrichní nebo bez bičíku, které mají respirační i fermentační metabolismus. Z hygienického hlediska je nejdůležitější rod *Escherichia*, jehož jednotlivé druhy jsou obyvateli střevního traktu různých živočichů. Někteří příslušníci rodu *Enterobacter*, rod *Escherichia* a některé další rody střevních tyčinek zkvašují laktózu. Všechny laktóza pozitivní bakterie označujeme jako „koliformní“, i když mají různou hygienickou hodnotu [17].

3.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli žije v tlustém střevě teplokrevných živočichů a vyskytuje se tedy i ve výkalech. Je jedním z nejdůležitějších zástupců střevní mikroflóry a její přítomnost je nezbytná pro správný průběh trávicích procesů ve střevě [25].

E. coli zkvašuje cukry (např. glukózu, laktózu, některé pentózy a alkoholické cukry) za intenzivní tvorby kyselin a plynu. Tvoří z těchto cukrů hlavně kyselinu mléčnou, pyrohroznovou, octovou a mravenčí, přičemž část kyseliny mravenčí rozkládá na oxid uhličitý a vodík [17].

V rámci druhu *E. coli* se vyskytuje mnoho patogenních kmenů. Rozdělujeme je na čtyři skupiny [9]:

1. **Enteropatogenní *E. coli* (EPEC)** – způsobuje novorozenské průjmy, při kterých dochází k velmi rychlé dehydrataci organismu. U tohoto kmenu nebyla prokázána tvorba enterotoxinů.

2. **Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC)** – při vstupu do trávicího ústrojí osídlují tenké střevo a způsobují průjemy u dětí a dospělých osob. ETEC mohou produkovat dva typy enterotoxinů: termolabilní a termostabilní enterotoxin.
3. **Enteroinvazivní kmeny *E. coli* (EIEC)** – pronikají do buněk a v nich se množí, u postižených vyvolávají dyzenterický syndrom.
4. **Enterohemoragické kmeny *E. coli* (EHEC)** – mají podobný způsob adherence jako kmeny enteropatogenní, vážou se ale především v tlustém střevě. Způsobují u člověka onemocnění typu dysenterie, často komplikované uremicko – hemoragickým syndromem.

3.2 Gramnegativní nefermentující bakterie

Jedná se o chemoorganotrofní bakterie se zástupci z několika čeledí. Čeleď *Pseudomonadaceae* zahrnuje gramnegativní rody tyčinkovitých bakterií s aerobním metabolismem [18]. Pseudomonády jsou v přírodě velmi rozšířené. Nachází se v půdách, ve vodách a v exkrementech člověka i zvířat. Netvoří spory. Syntetizují katalázu a oxidázu, z kultivačního hlediska nemají vysoké nároky na živnou půdu [9].

3.2.1 *Pseudomonas fragi*

Pseudomonas fragi je proteolytická a lipolytická nefermentující tyčinka. Hraje klíčovou roli v kažení potravin živočišného původu. Tvoří často mikroflóru čerstvých a zkažených potravin z masa, drůbeže a ryb, ale vyskytuje se také v mléce a v mléčných výrobcích [1].

Podle literatury je až 61 % pseudomonád vyskytujících se na mase *P. fragi* a na vepřovém mase se vyskytuje *P. fragi* ze 76-79 %. Minimální pH pro růst *P. fragi* je 5,0 až 5,3. Koncentrace CO₂ nad 10 % způsobí inhibici růstu [1].

3.3 Grampozitivní koky

Tato skupina zahrnuje aerobní, fakultativně anaerobní i anaerobní chemoorganotrofní rody, které vyžadují řadu růstových látek pro svůj růst [17].

Rod *Staphylococcus* má schopnost zkvašovat cukry za tvorby kyselin. Může produkovat žlutý až oranžový pigment. Nejčastěji se vyskytuje na kůži a mukózních membránách teplokrevných zvířat a člověka např. v dutině ústní. Roste v rozmezí teplot 10–40 °C a dobře

snáší vysoké koncentrace chloridu sodného (až 10 %). Je také hostitelem řady bakteriofágů. Mezi patogenní druhy patří *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* [18].

3.3.1 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

S. aureus rozeznáváme od zbývajících druhů, které netvoří toxiny, na základě jeho schopnosti koagulovat krevní plazmu. Způsobuje angínu, hnisavé onemocnění kůže, hnisání ran a hnisavé onemocnění poraněných kostí. *S. aureus* produkuje enterotoxin, který se vyskytuje v šesti antigenních formách A až E. Enterotoxin vyprodukovaný za vhodných podmínek v potravině vyvolává alimentární intoxikaci. Za většinu stafylokokových otrav je odpovědný enterotoxin A. Intoxikace se projevuje typickými příznaky, jako je zvracení, křeče v krajině břišní, průjemy, bolesti hlavy a dehydratace. Po 24 hodinách příznaky rychle odeznívají, ale pro děti, lidi nemocné a staré může být tato alimentární intoxikace smrtelná. K otravě dochází obvykle tehdy, je-li koncentrace buněk *S. aureus* 10^5 až 10^7 /g [19].

4 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo:

1. v teoretické části charakterizovat kyselinu citrónovou a octovou, popsat jejich vlastnosti, využití v potravinářství a jejich antimikrobiální účinky;
2. charakterizovat gramnegativní nefermentující bakterie *Pseudomonas fragi*, gramnegativní fermentující bakterii *Escherichia coli* a grampozitivní koky *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*;
3. v praktické části stanovit minimální inhibiční koncentrace kyseliny citrónové a octové na vybrané bakteriální kmeny.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 METODIKA

5.1 Použité přístroje, zařízení a pomůcky:

- Aseptický očkovací box
- Biologický termostat 37 °C, 30 °C - Laboratorní přístroje Praha
- Plynový kahan
- Parní sterilátor – autokláv -H+P Varioklav
- Váhy – KERN 440.47N
- Chladnička - Elektrolux
- Laboratorní sklo
- UV zářič
- Spekol
- Mikroplate leader Tecan, SUNRISE s SW Magellan, verze 3,11, Tecan, Australia
- Spektrofotometr s diodovým polem, Libra S6
- Mikrotitrační destička
- Mikropipety – 1 – 100 µl BIOHIT
- Multikanálová pipeta - 100 µl

5.2 Kultivační půdy

5.2.1 Masopeptonový bujón (MPB)

Látka	Množství (g/l)	
	MPB	2xMPB
Masový výtazek.....	3,0.....	6,0
Pepton.....	5,0.....	10,0
NaCl.....	3,0.....	6,0

Příprava půdy:

Jednotlivé složky bujónu byly naváženy do 1000,0 ml destilované vody a byly rozpuštěny. Konečné pH bylo upraveno na 6,8-7. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

5.2.2 Masopeptonový agar (MPA)

Látka	Množství (g/l)
Masový výtazek.....	3,0
Pepton.....	5,0
Agar.....	15,0
NaCl.....	3,0

Příprava půdy:

Jednotlivé složky byly naváženy do 1000,0 ml destilované vody a byly rozpuštěny. Konečné pH bylo upraveno na 6,8-7. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

5.3 Chemikálie

Fyziologický roztok

- Chlorid sodný (dodavatel Ing. P. Lukeš)

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

Kyselina citrónová

- Potravinářská E330 (dodavatel Miroslav Parnský)

Kyselina octová

- Kyselina octová čistá (Lachemo n.p. Brno)

5.4 Použité bakteriální kmeny

Použité bakteriální kmeny byly poskytnuty Ústavem potravinářského inženýrství FT UTB ve Zlíně. Bakteriální kmeny byly izolované z chlazených nebalených kuřat od firmy Racio-la Jehlička s.r.o., v období únor - březen 2006. V Tabulce 1 jsou uvedeny biochemické charakteristiky vybraných kmenů.

Tabulka 1: Biochemická charakteristika vybraných kmenů.

		MIKROORGANIZMUS		
		<i>Escherichia coli</i> č. 66	<i>Pseudomonas fragi</i> č. 19	<i>Staphylococcus aureus</i>
Reakce	Živná půda	VRBA	ENDO	PCA
	Kultivační teplota	37°C	30°C	37°C
	Gram	-	-	+
	Fermentace glukózy	+	-	+
	Plyn z glukózy	+	-	-
	Fermentace laktózy	+	NT	NT
	OXI	-	+	-
	KAT	+	+	+
	SCI	-	NT	NT
	ONP	+	-	NT
	H₂S	-	NT	NT
	VPT	NT	-	+
	Žlutý pigment	-	-	+

NT – netestováno, +/- pozitivní/negativní reakce

5.5 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Při sledování antimikrobiálních účinků kyseliny citrónové a octové byla zjišťována minimální inhibiční koncentrace (MIC). MIC je nejmenší množství látky (v našem případě organické kyseliny) při které došlo k zastavení viditelného růstu bakteriální populace v inokulu. Minimální baktericidní koncentrace (MBC), udává množství látky, které nedovolilo přežít žádné bakteriální buňce z původního inokula [10].

5.6 Stanovení minimální inhibiční koncentrace metodou v mikrotitrační destičce

Při stanovení minimální inhibiční koncentrace v mikrotitračních destičkách byl hodnocen vizuální zákal a měřeny hodnoty absorbance během 24 hodinové kultivace ve spektrofotometrickém přístroji Tecan.

U *Staphylococcus aureus* byly použity 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,025 % koncentrace kyseliny octové a citrónové. U *Pseudomonas fragi* a *Escherichia coli* byly použity koncentrace u kyseliny octové 4 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 % a u kyseliny citrónové 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %.

5.6.1 Příprava suspenzí mikroorganismů

Pro přípravu bakteriální suspenze byla použita 24hodinová kultura z bujónu. Kultura byla zředěna s fyziologickým roztokem tak, aby zákal při 550 nm byl roven hodnotě 0,05.

5.6.2 Příprava mikrotitrační destičky

Do mikrotitrační destičky bylo sterilně napipetováno do příslušných jamek 80 µl dvojnásobně koncentrovaného MPB. Poté byla jamka doplněna 100 µl kyseliny v příslušné koncentraci. Nakonec bylo přidáno 20 µl dané suspenze mikroorganismů (Tabulka 2). Destička byla uzavřena víčkem a vložena do přístroje Tecan, kde byla 24 hodin měřena absorbance. Po měření destičky byl proveden vizuální odečet.

Tabulka 2: Ukázka testování a plán pipetování.

	1	2	3
10% kyselina citrónová	80 µl bujónu 50 µl 20% kyseliny 50 µl H ₂ O 20 µl MO	80 µl bujónu 50 µl 20% kyseliny 50 µl H ₂ O 20 µl MO	80 µl bujónu 50 µl 20% kyseliny 50 µl H ₂ O 20 µl MO
8% kyselina citrónová	80 µl bujónu 40µl 20% kyseliny 60 µl H ₂ O 20 µl MO	80 µl bujónu 40µl 20% kyseliny 60 µl H ₂ O 20 µl MO	80 µl bujónu 40µl 20% kyseliny 60 µl H ₂ O 20 µl MO
Kontrola 0%	80 µl bujónu 100 µl H ₂ O 20 µl MO	80 µl bujónu 100 µl H ₂ O 20 µl MO	80 µl bujónu 100 µl H ₂ O 20 µl MO
Kontrola steri- lity bujónu	80 µl bujónu 120 µl H ₂ O	80 µl bujónu 120 µl H ₂ O	80 µl bujónu 120 µl H ₂ O

5.7 Stanovení minimální inhibiční koncentrace zkumavkovou metodou

Při stanovení minimální inhibiční koncentrace zkumavkovou metodou byl hodnocen vizuální zákal a měřeny hodnoty absorbance po 20 hodinové kultivaci v termostatu při vlnové délce 550 nm.

U kyseliny citrónové byly použity koncentrace 2%, 1%, 0,1%, 0,05% a 0,025% pro bakterie *Pseudomonas fragi* a *Escherichia coli*. U bakterie *Staphylococcus aureus* byly použity koncentrace 0,1%, 0,05%, 0,025% ,0,02%, 0,015%, 0,01% a 0,005%.

U kyseliny octové byly použity koncentrace 0,1%, 0,05%, 0,025%, 0,02%, 0,015% a 0,005% u všech tří bakterií. Jako kontrolní bylo provedeno stanovení s destilovanou vodou a byla taktéž provedena kontrola sterility zkumavky pouze s bujónem.

5.7.1 Příprava zkumavek

Do zkumavek bylo sterilně napipetováno 2,5 ml dvojnásobně koncentrovaného MPB. Poté byla jamka doplněna 2,5ml kyseliny v příslušné koncentraci. Nakonec bylo přidáno

10 μ l 24 hodinové bakteriální kultury (Tabulka 3). Zkumavky byly kultivovány za odpovídajících teplot.

Tabulka 3: Ukázka koncentrací a plán pipetování.

Koncentrace kyselin	K sterilitě bujónu	0%	2%	1%	0,5%	0,1%
Bujón [ml]	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Kyselina citrónová [ml]	0	0	0,25	0,125	0,063	1,25
Destilovaná voda [ml]	2,5	2,5	2,25	2,375	2,438	1,25
Bakterie [μ l]	0	10	10	10	10	10

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

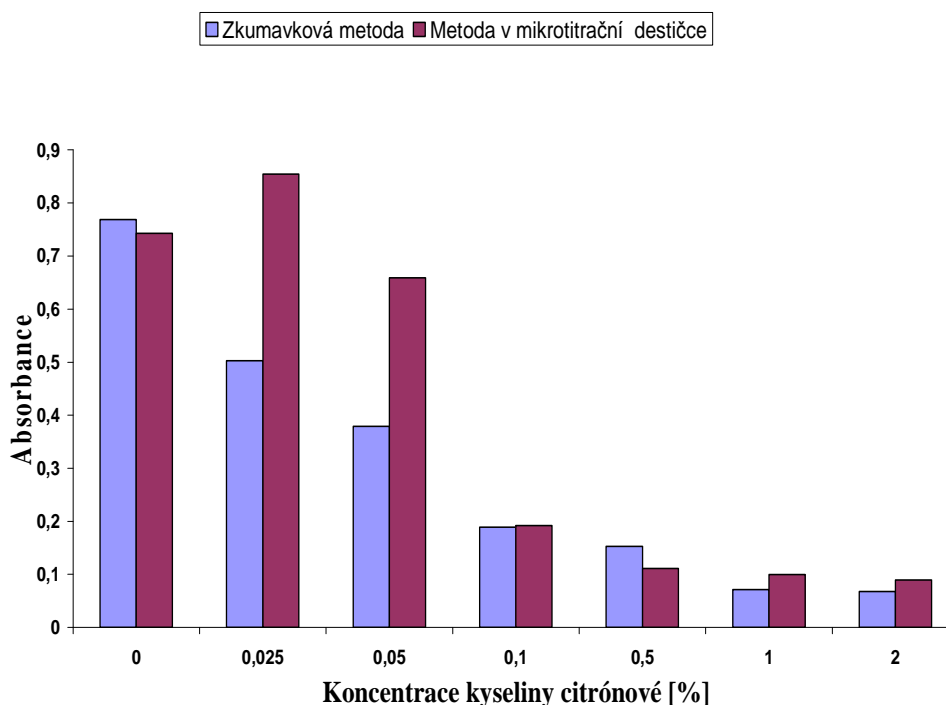
6.1 Minimální inhibiční koncentrace kyseliny citrónové na *Escherichia coli*

U *E. coli* byly použity koncentrace 10 %, 8 %, 6 %, 4 %, 2 %, 1 % a 0,5 %. Bylo zjištěno, že u všech koncentrací došlo k inhibičnímu účinku. Při druhém opakování byly použity koncentrace 4%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% a 0,025% kyseliny citrónové. Podle grafu (Příloha 1) je zřetelné, že koncentrace 0,1 %, 0,05 % a 0,025 % již nemají antibakteriální účinek. Koncentrace 0,05 % měla na začátku měření při metodě v mikrotitrační destičce hodnotu absorbance 0,0947. Během měření byl sledován nárůst absorbance (0,1109), který nebyl dostatečný k tomu, aby byl růst viditelný. Koncentraci 0,5 % kyseliny citrónové můžeme tedy pokládat za MIC (Obr.4).

Účinek kyseliny citrónové na bakterii *E. coli* byl ověřován zkumavkovou metodou. Zde byly použity koncentrace 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,025 %. Z grafu (Obr. 4) vyplývá, že kyselina citrónová měla na *E. coli* obdobný vliv jako při první metodě a byla potvrzena MIC 0,5 % kyseliny citrónové.

Vliv kyseliny citrónové byl dříve studován na některých zástupcích čeledi *Enterobacteriaceae*. *Yersinia enterocolitica* byla testována při 4 °C, 20 °C a 40 °C. Bylo zjištěno, že 1% kyselina citrónová nebyla účinná ani při 40 °C [21]. V další studii byla testován vliv na *Escherichia coli*. Zde se ukázalo, že kyselina citrónová neměla významný inhibiční účinek. Při aplikaci 2,6% kyseliny citrónové došlo k redukci *E. coli* pouze o 0,5 log CFU/ml [4].

Kyselina citrónová byla testována také na *Arcobacter butzleri*, kde byla prokázána účinnost při 0,5 % [12].



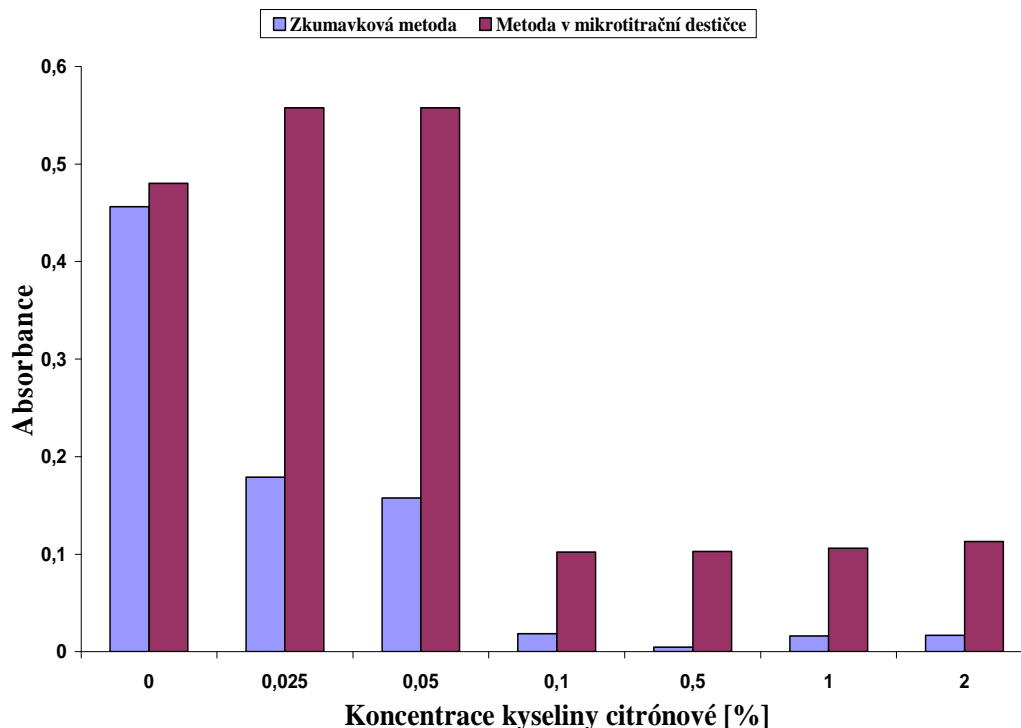
Obr. 4: Inhibiční účinek kyseliny citrónové na *E. coli*, porovnání dvou metod po 20 hod kultivace u zkumavkové metody při 37 °C a u metody v mikrotitrační destičce při 25 °C.

6.2 Minimální inhibiční koncentrace kyseliny citrónové na *Pseudomonas fragi*

Při sledování antibakteriálního účinku kyseliny citrónové na kmen *Pseudomonas fragi* v mikrotitrační destičce byly použity koncentrace stejné jako u *E. coli*. Při prvním pokusu bylo zjištěno, že kyselina citrónová v koncentracích od 10 % do 0,5 % má inhibiční účinek, proto byly při druhém opakování použité koncentrace opět sníženy. Podle grafu (Příloha 2) je zřetelné, že kyselina citrónová má na *P. fragi* antibakteriální účinek při 0,1 %. Počáteční hodnota absorbance byla 0,0963, hodnota absorbance v průběhu měření opět velmi mírně vzrostla, ale bez viditelného růstu (0,1018).

Při metodě zkumavkové byly použity koncentrace opět stejné jako u *E. coli* (2 % – 0,025 %). Minimální inhibiční koncentrace byla potvrzena při 0,1 % (Obr. 5). Rozdílné hodnoty absorbance u metod jsou způsobeny odlišnou teplotou kultivace, jelikož *P. fragi* je psychrotrofní bakterie, která roste rychleji při nižších kultivačních teplotách.

Při testování účinku 100 mM kyseliny citrónové vůči *P. fragi* v teplotě 32 °C byl zjištěn výrazný inhibiční účinek in vitro [13]. Studie je ve schodě s dosaženými výsledky v této práci.



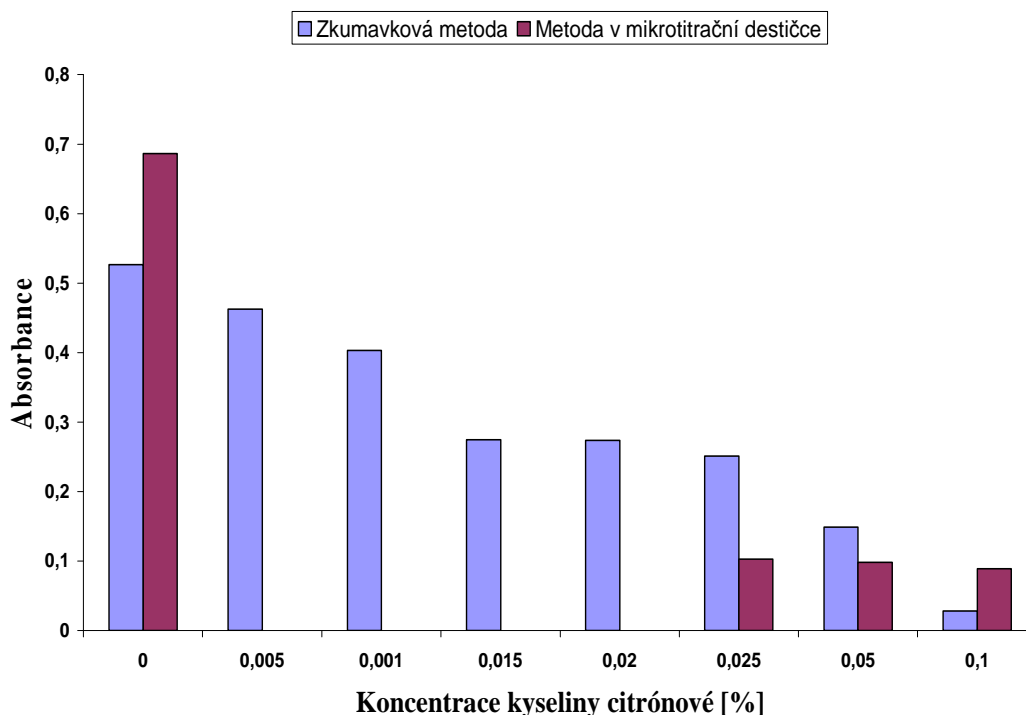
Obr. 5: Inhibiční účinek kyseliny citrónové na *P.fragi*, porovnání dvou metod po 20 hod kultivace u zkumavkové metody při 30 °C a u metody v mikrotitrační destičce při 25 °C.

6.3 Minimální inhibiční koncentrace kyseliny citrónové na *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

U sledování antibakteriálního účinku kyseliny citrónové na kmen *S. aureus* v mikrotitrační destičce měla i nejnižší použitá koncentrace 0,025 % inhibiční účinek. Absorbance počátečního inokula byla 0,0919 a i přes mírný nárůst absorbance na 0,1113 nebyl zřetelný viditelný růst (Příloha 3).

U zkumavkové metody měla kyselina citrónová výrazný inhibiční účinek v koncentraci 0,1 %. Rozdílné výsledky u srovnávaných metod jsou zřejmě způsobeny různou teplotou kultivace (Obr. 6). *S. aureus* jako humánní patogen roste rychleji při vyšší teplotě, tedy při zkumavkové metodě, kde byla použita kultivační teplota 37 °C.

Studie při kterých byla aplikována sůl kyseliny citrónové na *S. aureus* ukázaly, že MIC byla 12,5 mg/ml [41], což je jiný výsledek než v této práci.



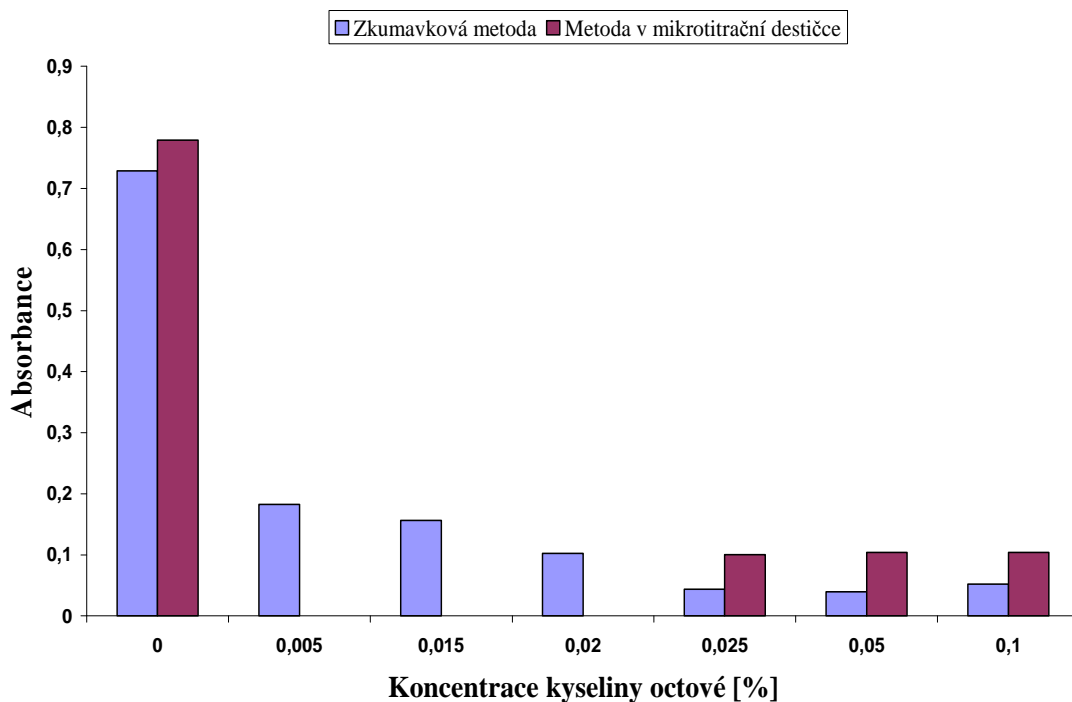
Obr. 6: Inhibiční účinek kyseliny citrónové na *S. aureus*, porovnání dvou metod po 20 hod kultivace u zkumavkové metody při 37 °C a u metody v mikrotitrační destičce při 25 °C.

6.4 Minimální inhibiční koncentrace kyseliny octové na *Escherichia coli*

Kyselina octová byla testována obdobně jako kyselina citrónová. Byly použity koncentrace od 4 % do 0,025 %. Vliv kyseliny na *E. coli* byl zaznamenán do grafu (Příloha 4). Kyselina octová měla u všech koncentrací u metody v mikrotitrační destičce významný antibakteriální účinek. Počáteční hodnota absorbance (0,0997) se po 24 hodinách kultivace téměř nezměnila (0,1002), což znamená, že prostředí s kyselinou octovou nebylo vhodné pro množení bakterií *E. coli*. Při zkumavkové metodě byly opět použity nižší koncentrace. Z důvodu nárůstu absorbance (0,1021) při koncentraci 0,02% u zkumavkové metody by mohla být potvrzena MIC na hodnotě 0,025 % (Obr. 7).

Existují studie, které se zabývají účinkem octové kyseliny na bakterie *E. coli* přímo na povrchu masa. Odborná studie prokázala, že 5% kyselina octová snížila počty *E. coli*

o 1 log CFU/g hovězího masa [16]. Při aplikaci 0,02% kyseliny peroctové se počet buněk *E. coli* snížil o 0,45 log CFU/g hovězího masa [5].



Obr. 7: Inhibiční účinek kyseliny octové na *E. coli*, porovnání dvou metod po 20 hod kultivace u zkumavkové metody při 37 °C a u metody v mikrotitrační destičce při 25 °C.

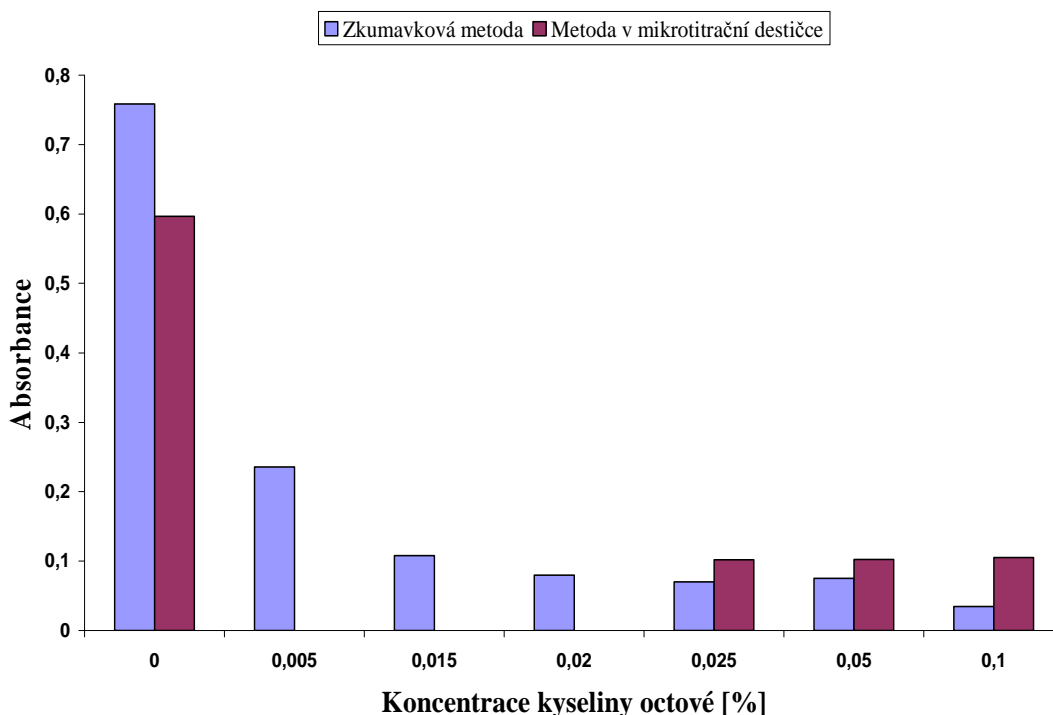
6.5 Minimální inhibiční koncentrace kyseliny octové na *Pseudomonas fragi*

Při sledování účinků kyseliny octové na *P. fragi* byly opět použity koncentrace od 4 % do 0,025 %. Bylo zjištěno, že kyselina octová měla ve všech koncentracích inhibiční účinek (Příloha 5). Při nejnižší koncentraci 0,025 % byla počáteční hodnota absorbance 0,0909 a v průběhu měření se téměř nezměnila (0,1001).

Při zkumavkové metodě byly koncentrace sníženy až na 0,005 % (Obr.8). V nižších koncentracích než 0,025 % byl ve zkumavce viditelný nárůst, proto by mohla být koncentrace 0,025 % považovaná za MIC.

Vliv kyseliny octové byl také sledován na pseudomonády na kuřecím mase. 5% kyselina octová měla významné redukující účinky ještě po 14 dnech skladování [7]. V další studii

byla 3% kyselina octová aplikována sprejováním na kuřecí maso a opět došlo k redukci pseudomonád [1].



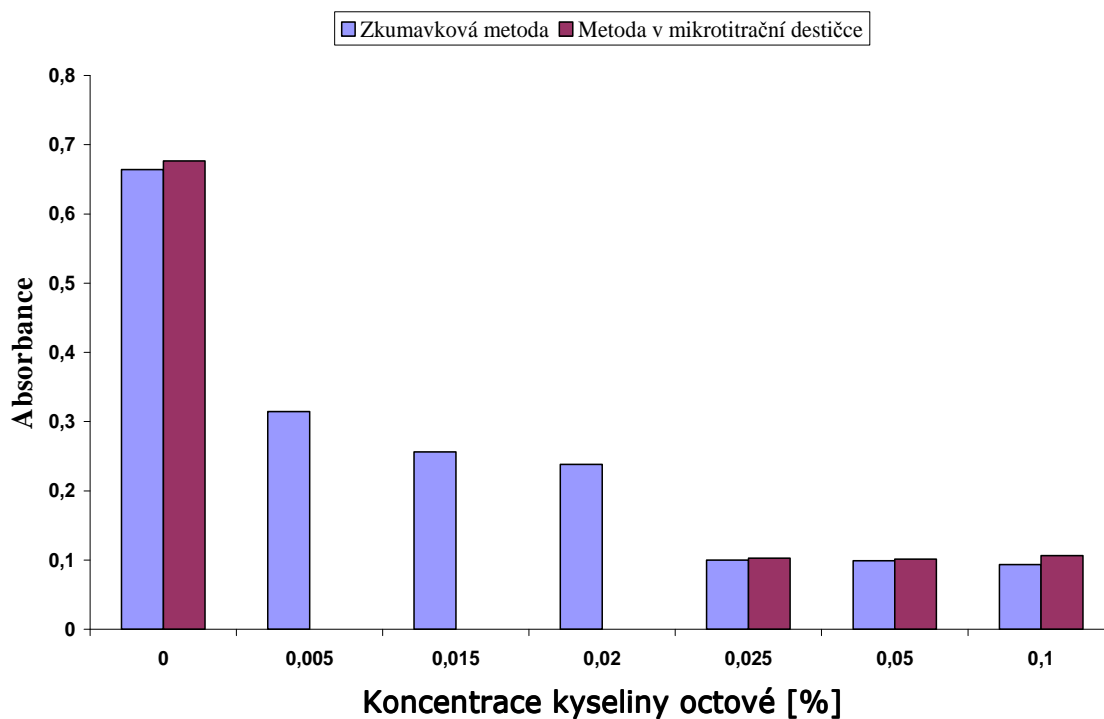
Obr. 8: Inhibiční účinek kyseliny octové na *P. fragi*, porovnání dvou metod po 20 hod kultivace u zkumavkové metody při 30 °C a u metody v mikrotitrační destičce při 25 °C.

6.6 Minimální inhibiční koncentrace kyseliny octové na *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*.

Při sledování účinků kyseliny octové na *S. aureus* byly použity koncentrace od 10 % do 0,025 %. Podle grafu (Příloha 6) je zřetelné, že i zde měla kyselina octová inhibiční účinky ve všech koncentracích. Hodnota absorbance při koncentraci 0,025 % byla 0,0935 a během měření byl velmi nízký nárůst absorbance na hodnotu 0,1023 bez viditelného zákalu.

U zkumavkové metody byly koncentrace opět sníženy, při koncentracích nižších než 0,025% došlo k viditelnému nárůstu ve zkumavkách, proto byla MIC stanovena na 0,025 % (Obr. 9).

Kyselina peroctová v kombinaci s hydroperoxidem byla testována na *Staphylococcus aureus* v koncentracích od 0,05 % do 4 %. Výsledky ukázaly, že *S. aureus* byl odolný vůči nižším koncentracím než 0,1 %. Tato a vyšší koncentrace již *S. aureus* redukovaly o 5 log CFU/ml [2].



Obr. 9: Inhibiční účinek kyseliny octové na *S. aureus*, porovnání dvou metod po 20 hod kultivace u zkumavkové metody při 37 °C a u metody v mikrotitrační destičce při 25 °C.

ZÁVĚR

V této práci byl dvěma metodami sledován vliv kyseliny citrónové a octové na vybrané druhy bakterií izolované z drůbežího masa. U obou metod byly použity bakterie *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi* a *Staphylococcus aureus*.

První metoda byla metoda v mikrotitrační destičce, kde byly použity koncentrace u všech tří bakterií od 0,025 % do 10 % kyseliny citrónové. U kyseliny octové byly použity koncentrace od 0,025 % do 4 % u bakterií *Escherichia coli* a *Pseudomonas fragi*, u *Staphylococcus aureus* byly použity koncentrace od 0,025 % do 10 %. Koncentrace pro zkumavkovou metodu byly zváženy dle předchozích výsledků a účelně sníženy. U obou metod se měřila hodnota absorbance a pozoroval se vliv kyselin oproti absorbanci kontroly. Rozdílné hodnoty absorbance u metod jsou zřejmě způsobeny různou teplotou kultivace. U destičkové metody při 25 °C rostly bakterie *Pseudomonas fragi* výrazně rychleji než u zkumavkové metody. U bakterií *Staphylococcus aureus*, kterým lépe vyhovuje vyšší teplota, byl zaznamenán rychlejší nárůst u zkumavkové metody při 37 °C. U *Escherichia coli* byly také rozdílné hodnoty absorbancí, ale nebyly tak výrazné jako u *Pseudomonas fragi* či *Staphylococcus aureus*. Zde je zřejmě rozdílnost dána rozmezím experimentální chyby a biologickými vlastnostmi bakterií.

Kyselina citrónová měla totální inhibiční účinek na *Escherichia coli* při 0,5 %. Tato hodnota se shodovala jak při metodě v mikrotitrační destičce, tak i při zkumavkové metodě. U *Pseudomonas fragi* byla minimální inhibiční koncentrace 0,1 %. Zde se výsledky opět shodovaly u obou metod. *Staphylococcus aureus* byl v mikrotitrační destičce inhibován kyselinou citrónovou i při nejnižší koncentraci 0,025 %. U metody zkumavkové byl při této koncentraci zaznamenán růst, což mohlo být dáno vyšší teplotou kultivace.

Kyselina octová narozdíl od kyseliny citrónové měla výraznější antibakteriální účinek. U metod v mikrotitrační destičce byly všechny koncentrace u *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi* a *Staphylococcus aureus* inhibiční. U zkumavkové metody byly koncentrace sníženy a u všech tří sledovaných bakterií došlo k výraznému nárůstu absorbance u koncentrace 0,02 %. Z toho důvodu můžeme pokládat hodnotu 0,025 % za minimální inhibiční koncentraci.

Závěrem lze konstatovat, že kyselina citrónová měla inhibiční účinky na sledované bakterie v rozmezí 0,025 % - 0,5 %. Kyselina octová měla antibakteriální vliv už při velmi nízké

koncentraci (0,025 %). Na gramnegativní bakterie měla kyselina octová větší inhibiční vliv než kyselina citrónová. Proto bude pro ošetření masa vhodnější kyselina octová, jelikož většinu mikroflóry povrchu drůbežího masa tvoří gramnegativní bakterie. Grampozitivní bakterie byly inhibovány oběma kyselinami v koncentraci 0,025 %. Prokázané antimikrobiální účinky kyseliny citrónové a octové potvrzují jejich možné použití k ošetření povrchu drůbežího masa.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BLACKBURN, CLIVE de W., *Food spoilage microorganisms*, Woodhead Publishing, 2006.
- [2] BRIÑEZ, W. J., ROIG-SAGUÉS, A., X., HERRERO, M. M. H., LÓPEZ-PEDEMONTE, T., GUAMIS, B. (2006). Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus spp.*, *Listeria spp.* and *Escherichia coli*, *Science Direkt*. vol. 17: 516-521.
- [3] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J., *Chemie potravin*, 1. vyd. Praha, 1983.
- [4] ESWARANANDAM, S., HETTIARACHCHY, N. S., JOHNSON, M. G. (2004). Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella gaminara*. *Journal of Food Science*, vol. 69, nr. 3.
- [5] GILL, C. O., BADONI, M. (2004). Effects of peroxyacetic acid, acidified sodium chlorite or lactic acid solutions on the microflora of chilled beef carcasses. *Int. J. of Food Mikrobiol.*, 99: 43-50.
- [6] ICMSF (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS), *Microorganisms in Foods 6*, New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher, 2005, ISBN 0-306-48675-X.
- [7] JIMÉNEZ, S. M., SALSI, M. S., TIBURZI, M. C., RAFAGHELLI, R. C., PIROVANI, M. E. (1999). Combined use of acetic acid treatment and modified atmosphere packaging for extending the shelf-life of chilled chicken breast portions. *Journal of Applied Microbiol.*, 87: 339-344.
- [8] KITIS, M., (2004). Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environment International*, 30: 47-55.
- [9] KLABAN, V., *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*, Praha, 2005.
- [10] LOCHMANN O., *Základy antimikrobní terapie*, Praha, 1999, ISBN 80-7254-005-X.

- [11] PHILLIPS, C. A. (1999). The effect of citric acid, lactic acid, sodium citrate and sodium lactate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri*. *Letters in Applied Microbiol.*, 29: 424-428.
- [12] PHILLIPS, C. A., DUGGAN J. (2002). The effect of temperature and citric acid, alone, and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture. *Food Control*, 13: 463-468.
- [13] PINHEIRO, A. J. R., LISKA, B. J., PARMELEE, C. E., Inhibitory effect of selected organic chemical on *Pseudomonas fragi*. *Journal of dairy science*, vol. 51, no. 2.
- [14] ROP, O., VALÁŠEK, P., HOZA, I., *Teoretické principy konzervace potravin I: hlavní konzervářské suroviny*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005.
- [15] SMULDERS, F. J. M., GREER, G. G. (1998). Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *Int. J. Food Microbiol.*, 44: 149-169.
- [16] STIVARIUS, M. R., POHLMAN, F. W., McELYEA K. S., APPLE J. K. (2002). The effect of acetic acid, gluconic acid and trisodium citrate treatment of beef trimmings on microbial, color and odor characteristics of ground beef through simulated retail display. *Meat Science*, 60: 245-252.
- [17] ŠILHÁNKOVÁ, L., *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, Praha, 2002, ISBN 80-200-1024-6, 2002.
- [18] ŠILHÁNKOVÁ, L., *Mikrobiologické zkoumání potravin*, Praha: VŠCHT, 1987.
- [19] TICHÁ, J., *Mikroorganismy a jiní škůdci v mlýnskopekárenském průmyslu a ochrana proti nim*, Praha, 1988, ISBN 04-833-88.
- [20] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin 3*, Tábor, 1999, ISBN 80-902391-5-3.
- [21] VIRTO, R., SANZ, D., ÁLVAREZ, I., CONDÓN, RASO, J. (2005). Inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* by citric and lactic acid at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, 103: 251-257.

- [22] *Acetic acid* [online]. [cit. 30.3.2008]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Acetic_acid>.
- [23] *Vysoká škola chemicko – technologická v Praze* [online]. [cit. 17.2.2008]. Dostupný z WWW: <http://www.vscht.cz/eds/knihy/uid_es-002/hesla/lysozym.html>.
- [24] *Citric acid* [online]. [cit. 30.3.2008]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Citric_acid>.
- [25] *Escherichia coli* [online]. [cit. 17.2.2008]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli>.
- [26] *Státní zdravotnický ústav: Přídavné látky v potravinách* [online]. [cit. 8.3.2008]. Dostupný z WWW: <<http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/pridatne-latky-v-potravinach-1>>.
- [27] RANFT, U., ROTHEL GmbH, *Alternativní koncepce výživy bez antibiotických stimulátoru růstu*, SRN, [online]. [cit. 8.3.2008]. Dostupný z WWW: <<http://kchpd.af.czu.cz/old/konference/02/index.html>>.
- [28] Vyhláška 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CFU	Colony forming units (kolonie tvořící jednotku – KTJ)
EHEC	Enterohemoragické <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
MBC	Minimální baktericidní koncentrace
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MPA	Masopeptonový agar
MPB	Masopeptonový bujón

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Vzorec kyseliny citrónové.	11
Obr. 2: Vzorec kyseliny octové.....	12
Obr. 3: Vznik kyseliny peroctové.	15
Obr. 4: Inhibiční účinek kyseliny citrónové na <i>E. coli</i> , porovnání dvou metod po 20 hod kultivace u zkumavkové metody při 37 °C a u metody v mikrotitrační destičce při 25 °C.	29
Obr. 5: Inhibiční účinek kyseliny citrónové na <i>P.fragi</i> , porovnání dvou metod po 20 hod kultivace u zkumavkové metody při 30 °C a u metody v mikrotitrační destičce při 25 °C.	30
Obr. 6: Inhibiční účinek kyseliny citrónové na <i>S. aureus</i> , porovnání dvou metod po 20 hod kultivace u zkumavkové metody při 37 °C a u metody v mikrotitrační destičce při 25 °C.	31
Obr. 7: Inhibiční účinek kyseliny octové na <i>E. coli</i> , porovnání dvou metod po 20 hod kultivace u zkumavkové metody při 37 °C a u metody v mikrotitrační destičce při 25 °C.	32
Obr. 8: Inhibiční účinek kyseliny octové na <i>P. fragi</i> , porovnání dvou metod po 20 hod kultivace u zkumavkové metody při 30 °C a u metody v mikrotitrační destičce při 25 °C.	33
Obr. 9: Inhibiční účinek kyseliny octové na <i>S. aureus</i> , porovnání dvou metod po 20 hod kultivace u zkumavkové metody při 37 °C a u metody v mikrotitrační destičce při 25 °C.	34

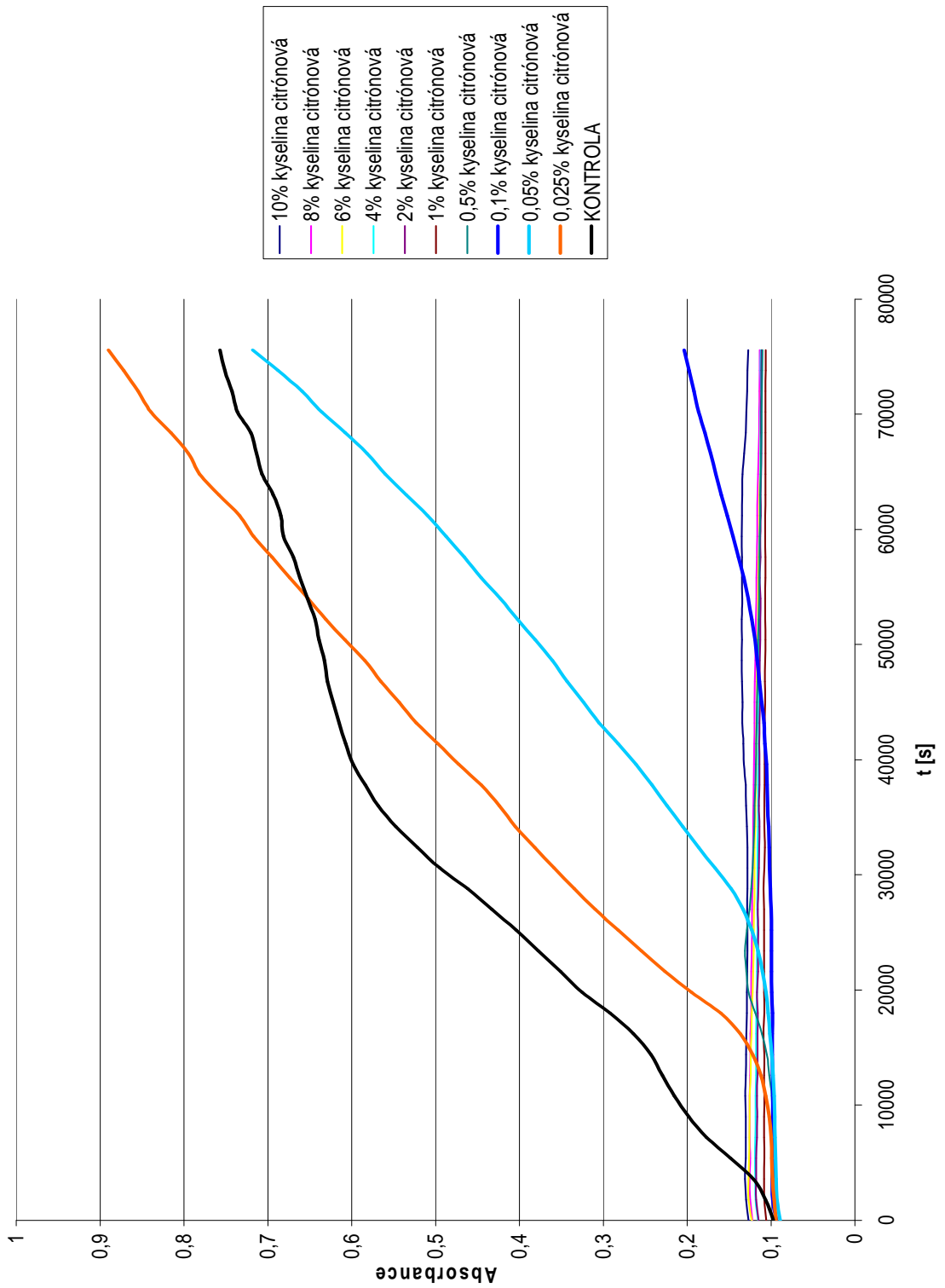
SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Biochemická charakteristika vybraných kmenů.	24
Tabulka 2: Ukázka testování a plán pipetování.	26
Tabulka 3: Ukázka koncentrací a plán pipetování.	27

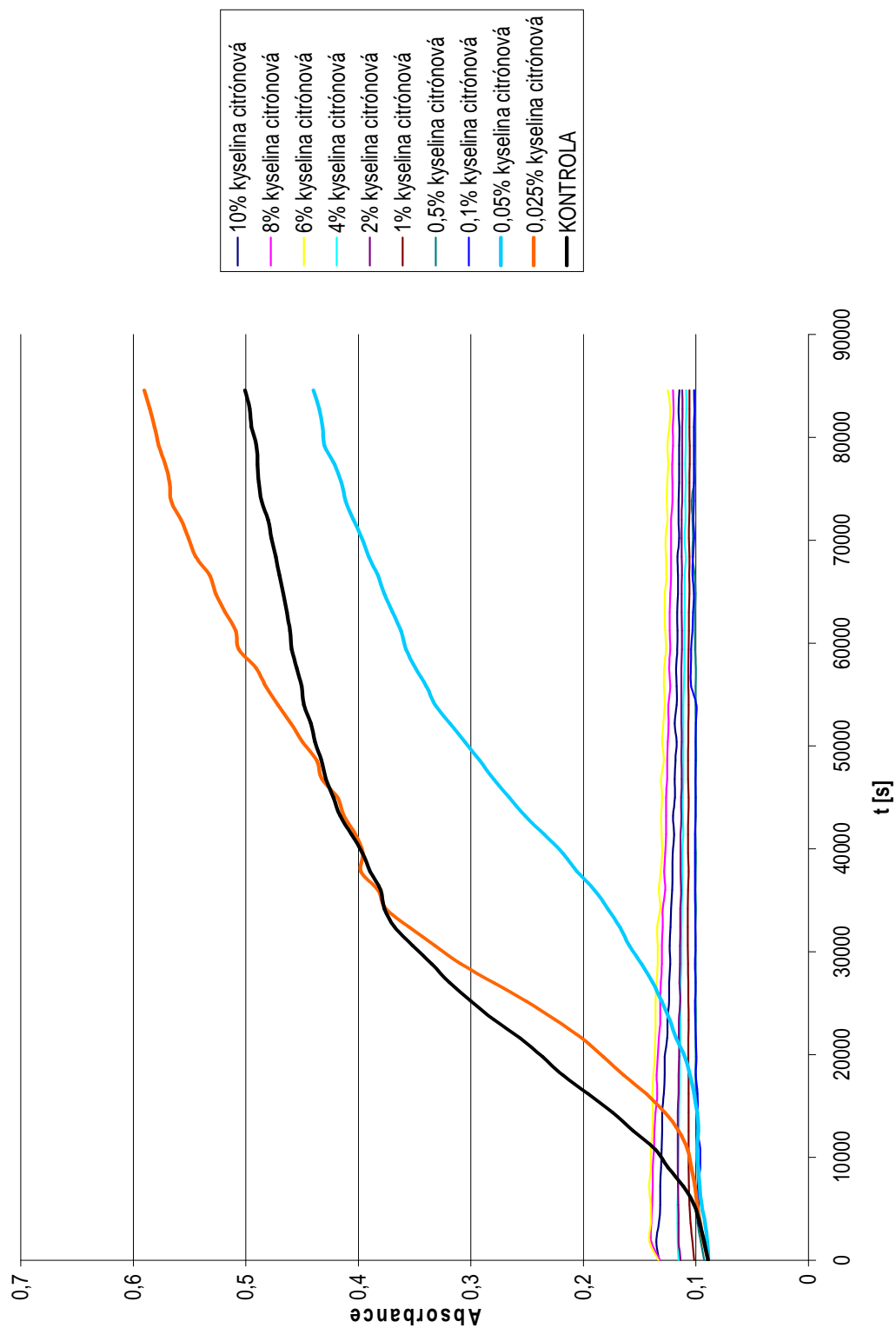
SEZNAM PŘÍLOH

- P. I. Vliv kyseliny citrónové na *Escherichia coli* v mikrotitrační destičce.
- P. II. Vliv kyseliny citrónové na *Pseudomonas fragi* v mikrotitrační destičce.
- P. III. Vliv kyseliny citrónové na *Staphylococcus aureus* v mikrotitrační destičce.
- P. VI: Vliv kyseliny octové na *Escherichia coli* v mikrotitrační destičce.
- P. V. Vliv kyseliny octové na *Pseudomonas fragi* v mikrotitrační destičce.
- P. VI. Vliv kyseliny octové na *Staphylococcus aureus* v mikrotitrační destičce.
- P. VII. Fotografická dokumentace metody v mikrotitrační destičce.
- P. VIII Fotografická dokumentace zkumavkové metody.

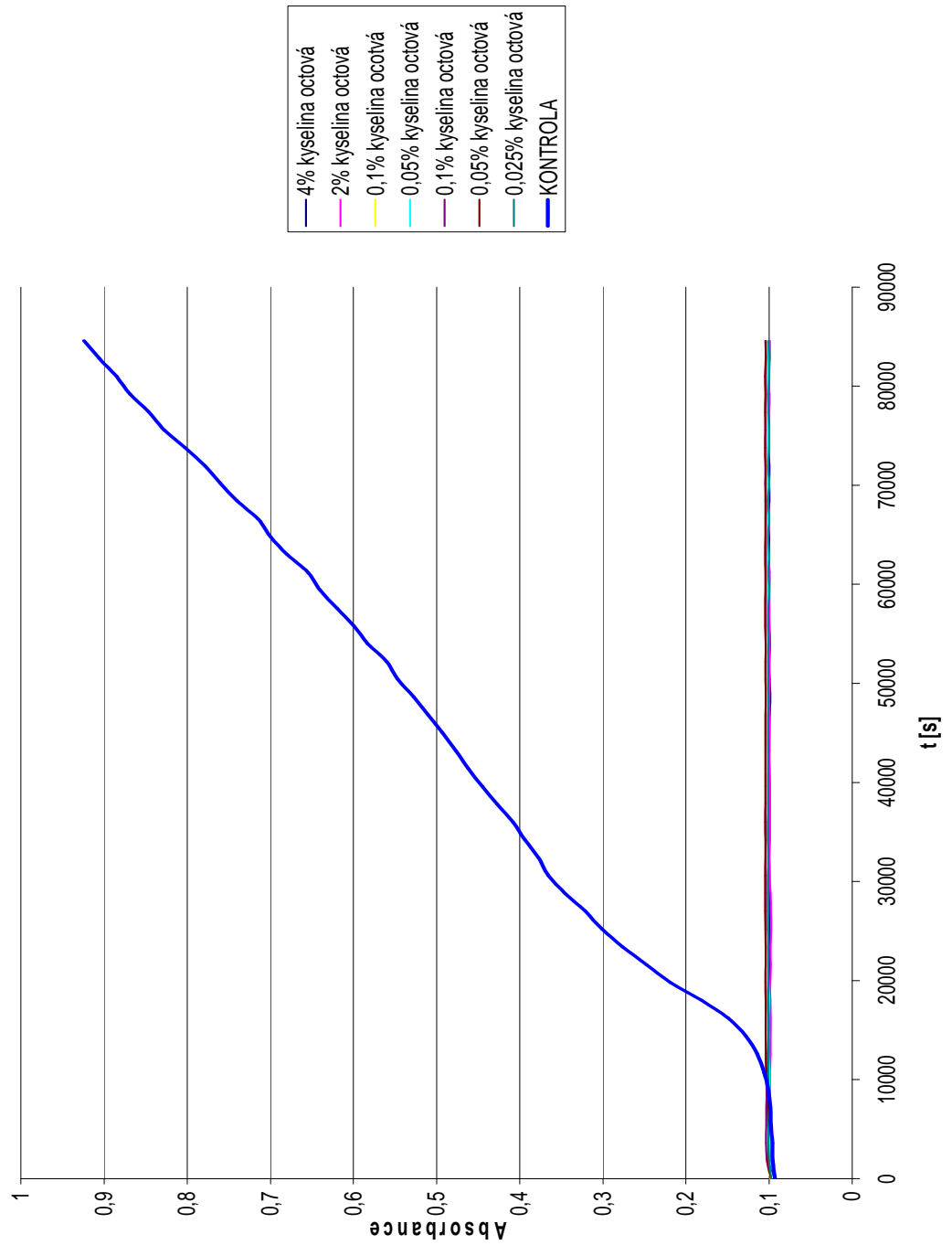
PŘÍLOHA PI: VLIV KYSELINY CITRÓNOVÉ NA *ESCHERICHIA COLI* V MIKROTITRAČNÍ DESTIČCE.



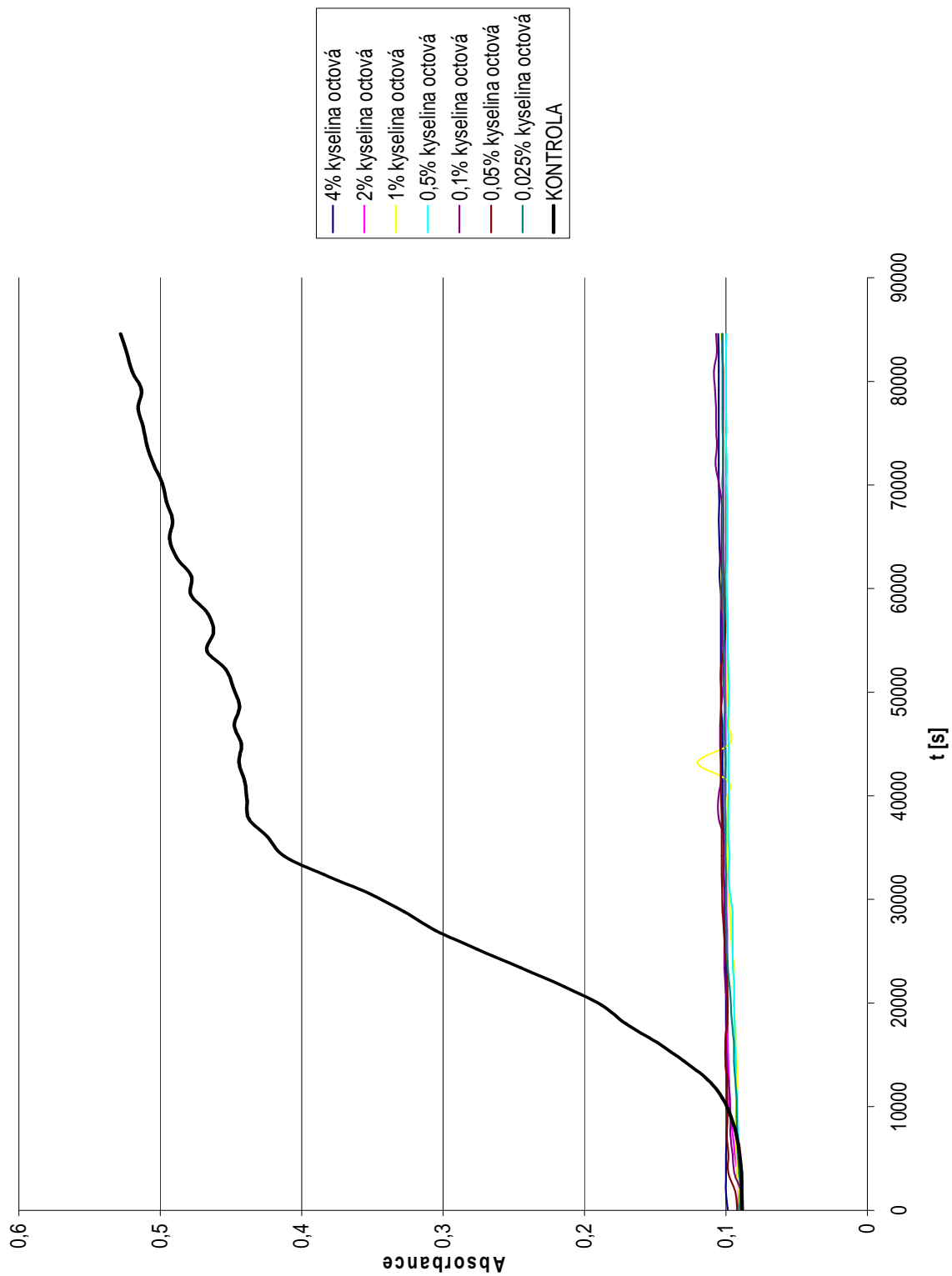
PŘÍLOHA P II: VLIV KYSELINY CITRÓNOVÉ NA *PSEUDOMONAS FRAGI* V MIKROTITRAČNÍ DESTIČCE.



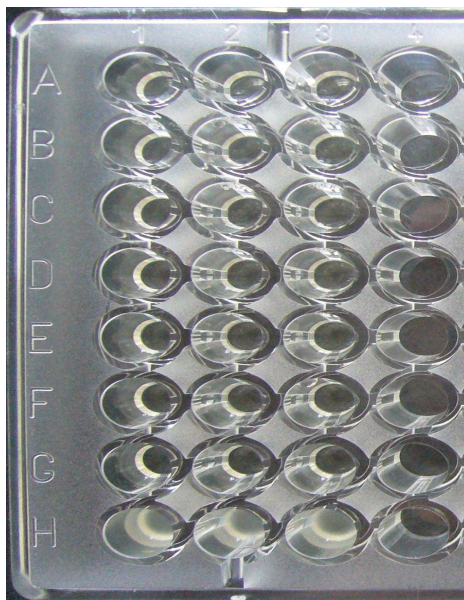
PŘÍLOHA P IV: VLIV KYSELINY OCTOVÉ NA *ESCHERICHIA COLI* V MIKROTITRAČNÍ DESTIČCE.



PŘÍLOHA P V: VLIV KYSELINY OCTOVÉ NA *PSEUDOMONAS FRAGI* V MIKROTITRAČNÍ DESTIČCE.



PŘÍLOHA P. VII: FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE METODY V MIKROTITRAČNÍ DESTIČCE



Kyselina citrónová – *Pseudomonas fragi*
Koncentrace od 0,5% - 10% + kontrola



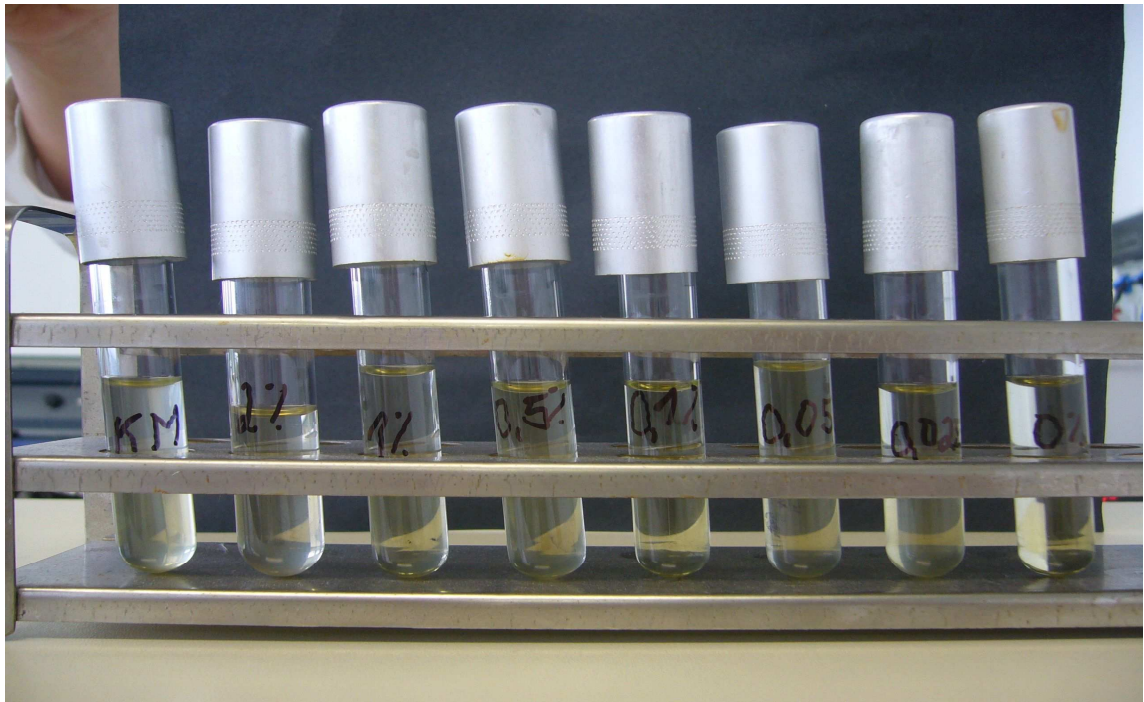
Kyselina citronová – *Staphylococcus aureus* – jamky A1 – A3

Koncentrace od 0,025% do 4% + kontrola

Kyselina citronová – *Staphylococcus aureus* – jamky A4 – A6

Koncentrace od 0,5% do 10% + kontrola

**PŘÍLOHA P. VIII: FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE
ZKUMAVKOVÉ METODY.**



Vliv kyseliny citrónové na bakterii *Escherichia coli*.