

Vliv kyseliny mléčné na potravinářsky významné mikroorganismy

Martina Lukešová



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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

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

Téma práce: **Vliv kyseliny mléčné na potravinářsky významné mikroorganismy**

Zásady pro vypracování:

1. v teoretické části popište formou literární rešerše testované druhy mikroorganismů, charakterizujte vlastnosti kyseliny mléčné a její průmyslové využití
2. testování účinku kyseliny mléčné na vybrané druhy mikroorganismů
3. zhodnocení antimikrobiálního účinku kyseliny mléčné a další doporučení pro její využití

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Dle doporučení vedoucího DP.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Leona Čechová, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství a chemie

Datum zadání diplomové práce:

10. října 2005

Termín odevzdání diplomové práce:

31. května 2006

Ve Zlíně dne 20. dubna 2006


prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

Souhlasím s tím, že s výsledky mé práce může být naloženo podle uvážení vedoucího diplomové práce a ředitele ústavu. V případě publikace budu uvedena jako spoluautor.

Prohlašuji, že jsem na celé diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala.

Ve Zlíně, 18. 05. 2006

.....

podpis diplomanta

Děkuji Mgr. Leoně Čechové, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení a připomínky při realizaci mé diplomové práce. Chtěla bych také poděkovat Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za pomoc a cenné rady při statistickém vyhodnocení výsledků. Nakonec bych také ráda poděkovala Bc. Olze Brázdilové a dalším zaměstnancům Ústavu potravinářského inženýrství za vytvoření příznivého pracovního prostředí při praktickém zpracování této diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala rodičům za všechnu podporu a trpělivost po celou dobu mého studia.

RESUMÉ

Velkým zdravotním problémem dnešní doby je výskyt onemocnění způsobených mikroorganismy kontaminující potraviny. Proto jsme sledovali antibakteriální účinek kyseliny mléčné na tyto mikroorganismy. Kyselina mléčná je přírodní organická kyselina, kyselé chuti, lehce rozpustná, vzniká mléčným kvašením cukrů a je běžně používaným prostředkem v potravinářské výrobě.

Sledovali jsme vliv kyseliny mléčné a její nejnižší inhibiční koncentrace na tyto mikroorganismy: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus cereus*. Stanovení bylo provedeno inkubací v bujonech, použité koncentrace kyseliny mléčné byly od 0,1 do 1 %, u *B. subtilis* a *B. cereus* do 3 %.

Bylo zjištěno, že již aplikací 0,1% kyseliny dochází ke snížení CFU/ml všech sledovaných mikroorganismů. K absolutní inhibici *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* a *Staphylococcus aureus* dochází 0,5% kyselinou mléčnou. Růst bakterií *Salmonella typhimurium* a *Micrococcus luteus* byl inhibován 0,25% kyseliny a *Serratia marcescens* již při 0,125% koncentraci. Růst bacilů byl pozorován i při koncentracích kyseliny mléčné přesahující 2 %.

Klíčová slova: kyselina mléčná
inhibiční koncentrace kyseliny mléčné
Bacillus cereus, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*,
Staphylococcus aureus, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*,
Salmonella typhimurium, *Micrococcus luteus*
patogenní mikroorganismus
kultivace

SUMMARY

There is a big problem with the occurrence of diseases caused by foodborne pathogens. That is the reason why we studied antibacterial effect of lactic acid.

Lactic acid is a natural organic acid of sour taste, dissoluble, originating by the process of lactic fermentation of sugar and is commonly used substance in the foodstuff production.

The effect of lactic acid and its minimal inhibition concentration of this acid on these microorganisms: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* were observed. Lactic acid was used in broth in concentration from 0,1% to 1%, in the case of *Bacillus sp.* up to 3%.

It was found that the application of 0,1% lactic acid decreased the CFU/ml of all examined microorganisms. The application of 0,5% lactic acid caused the total inhibition of *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* a *Staphylococcus aureus*. The growth of *Salmonella typhimurium*, *Micrococcus luteus* and *Serratia marcescens* was stopped by the application of 0,25% and 0,125% lactic acid, respectively. In addition, *Bacillus sp.* spores even survived more than 2% lactic acid.

Key words: lactic acid
 inhibition concentration of the lactic acid
 Bacillus cereus, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorecens*,
 Staphylococcus aureus, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*,
 Salmonella typhimurium, *Micrococcus luteus*
 pathogenic microorganisms
 cultivation

OBSAH

ÚVOD.....	10
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1.1 KONZERVAČNÍ LÁTKY V POTRAVINÁŘSTVÍ	11
1.1.1 Vlastnosti konzervačních látek.....	11
1.2 ORGANICKÉ KYSELINY	12
1.2.1 Mechanismus působení organických kyselin	12
1.2.2 Mechanismy rezistence	13
1.2.3 Konzervace organickými kyselinami	14
1.2.4 Antimikrobiální účinky organických kyselin	15
1.2.5 Použití organických kyselin ve výživě zvířat	16
1.3 KYSELINA MLÉČNÁ	17
1.3.1 Kyselina mléčná v surovinách živočišného původu.....	18
1.3.2 Tvorba kyseliny mléčné	19
1.3.3 Příprava kyseliny mléčné	19
1.3.4 Aplikace kyseliny mléčné na maso	20
1.3.5 Využití kyseliny mléčné v kosmetice.....	21
1.4 BAKTERIE	21
1.4.1 Morfologie bakterií	21
1.4.2 Struktura bakteriální buňky	22
1.5 VYBRANÉ DRUHY MIKROORGANISMŮ A JEJICH VLASTNOSTI.....	25
1.5.1 <i>Bacillus cereus</i>	25
1.5.2 <i>Bacillus subtilis</i>	26
1.5.3 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	27
1.5.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	28
1.5.5 <i>Serratia marcescens</i>	30
1.5.6 <i>Escherichia coli</i>	31
1.5.7 <i>Salmonella typhimurium</i>	34
1.5.8 <i>Micrococcus luteus</i>	36
1.6 LEGISLATIVA.....	37
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
2.1 PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY	38
2.2 KULTIVAČNÍ PŮDY.....	39
2.2.1 Endo Agar – (EA).....	39
2.2.2 Manitol salt agar – (MSA)	40
2.2.3 Plate Count Agar – (PCA).....	40
2.2.4 Masopeptonový bujón – (MPB).....	41
2.2.5 Masopeptonový agar – (MPA)	42
2.2.6 Mueller hinton agar – (MHA)	42
2.3 ROZTOKY A OSTATNÍ CHEMIKÁLIE	43
2.4 POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KMENY	44
2.5 POUŽITÉ METODY STANOVENÍ.....	45
2.5.1 Sledování účinku kyseliny mléčné metodou A	45
2.5.2 Sledování účinku kyseliny mléčné metodou B.....	46
2.5.3 Další použité metody stanovení	47
2.5.4 Metody identifikace bakteriálních kmenů.....	48
2.5.5 Statistické vyhodnocení účinků kyseliny mléčné na studované mikroorganismy.....	49
3 VÝSLEDKY A DISKUSE.....	50
3.1 VYHODNOCENÍ IDENTIFIKAČNÍCH TESTŮ.....	50

3.2	SLEDOVÁNÍ ÚČINKU KYSELINY MLÉČNÉ NA <i>ESCHERICHIA COLI</i>	50
3.3	SLEDOVÁNÍ ÚČINKU KYSELINY MLÉČNÉ NA <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i>	55
3.4	SLEDOVÁNÍ ÚČINKU KYSELINY MLÉČNÉ NA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	59
3.5	SLEDOVÁNÍ ÚČINKU KYSELINY MLÉČNÉ NA <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i>	62
3.6	SLEDOVÁNÍ ÚČINKU KYSELINY MLÉČNÉ NA <i>SERRATIA MARCESCENS</i>	63
3.7	SLEDOVÁNÍ ÚČINKU KYSELINY MLÉČNÉ NA <i>MICROCOCCUS LUTEUS</i>	64
3.8	SLEDOVÁNÍ ÚČINKU KYSELINY MLÉČNÉ NA <i>BACILLUS CEREUS</i>	66
3.9	SLEDOVÁNÍ ÚČINKU KYSELINY MLÉČNÉ NA <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	68
3.10	SROVNÁNÍ ANTIBAKTERIÁLNÍHO PŮSOBNÍ KYSELINY MLÉČNÉ NA SLEDOVANÉ MIKROORGANISMY	69
ZÁVĚR.....		72
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		74
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		78
SEZNAM OBRÁZKŮ		79
SEZNAM TABULEK		80
SEZNAM PŘÍLOH.....		81
PŘÍLOHY		82

ÚVOD

Kažení potravin je možno popsat jako jakoukoliv změnu, která má za následek, že daný produkt je nepřijatelný pro lidskou spotřebu. Na kažení potravin se také podílí řada kvasinek, plísní i bakterií. Vlivem samotné mikrobiální aktivity je zničena nejméně jedna čtvrtina celkové světové produkce potravin.

Onemocnění z potravin způsobená mikroorganismy (alimentární intoxikace a alimentární infekce), jsou vážným problémem ve většině rozvinutých zemí a jejich studium je řazeno mezi priority. Nákazy člověka těmito patogeny se projevují především průjmy, křečemi břicha a enteritidami.

V současné době technický vývoj umožňuje široké uplatnění moderních přístrojů v detekci a identifikaci mikroorganismů v potravinářství. Pro řadu patogenů, především v masném průmyslu, je zavedení těchto metod do praxe velmi nákladné a zdlouhavé. Proto je snaha omezit kontaminaci potravin na co možná nejmenší míru. Jednou z možností je ošetření povrchu masa roztoky organických kyselin a dalších antimikrobiálních látek.

Cílem této práce bylo zjistit vliv inhibičních koncentrací kyseliny mléčné na růst a rozmnožování těchto mikroorganismů: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis*.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Konzervační látky v potravinářství

Konzervační látka je chemickou sloučeninou, která je schopna zpomalit nebo zastavit růst mikroorganismů tak, aby nedošlo k procesům jako jsou fermentace, okyselení či rozložení substrátu. Tyto procesy by mohly vést ke zhoršení chuti, barvy, struktury, vzhledu a výživové hodnoty potravin. Konzervační látky se používají především k prodloužení skladovatelnosti, ke zvýšení výživové hodnoty a k zajištění zdravotní nezávadnosti potravin. K udržení kvality výrobku se tyto látky často používají v kombinaci s fyzikálními metodami (17).

1.1.1 Vlastnosti konzervačních látek

Pro látky, které se používají jako konzervační, je důležité, aby splňovaly následující vlastnosti (23):

- Jestliže vykazují antimikrobiální účinek, neměly by růst mikroorganismů pouze inhibovat, ale spíše je usmrcovat.
- Konzervační látky s bakteriostatickým účinkem by měly v potravině přetrvávat až do doby, než je potravina určena ke spotřebě. Jestliže je potravina dále zpracovávána, měla by tato konzervační látka vydržet v potravině ve všech krocích během zpracování.
- Konzervační látky by měly být přiměřeně tepelně odolné.
- Specifita konzervačních látek by měla odpovídat mikroorganismům, které potravinu kontaminují nebo v ní přežívají.
- Jestliže jsou konzervační látky používány jako náhrada tepelného ošetření, měly by být schopny zabezpečit potravinu před bakteriemi *Clostridium botulinum*.
- Nemělo by docházet k jejich ničení reakcemi v potravinách a nebo metabolickými produkty přítomných mikroorganismů.

- Důležitá je jejich zdravotní nezávadnost bez toxických a dráždivých účinků.
- Měly by být účinné již v nízkých koncentracích.

1.2 Organické kyseliny

Mezi nejběžnější klasické konzervační látky patří slabé organické kyseliny, například kyselina octová, mléčná, benzoová a sorbová. Molekuly těchto kyselin inhibují růst buněk bakterií a plísní (29).

1.2.1 Mechanismus působení organických kyselin

V roztoku existuje pro organické kyseliny rovnováha závislá na hodnotách pH mezi nedisociovaným a disociovaným stavem. Tyto konzervační látky mají optimální inhibiční efekt při nízkých hodnotách pH, které podporuje nedisociovaný stav molekuly. V tomto případě je molekula volně permeabilní přes plazmatickou membránu a je takto schopna vstupu do buňky. Následně v důsledku styku s vyšší hodnotou pH uvnitř buňky molekula disociuje. Vznikají anionty a protony, které nemohou projít plazmatickou membránou a hromadí se v buňce (29).

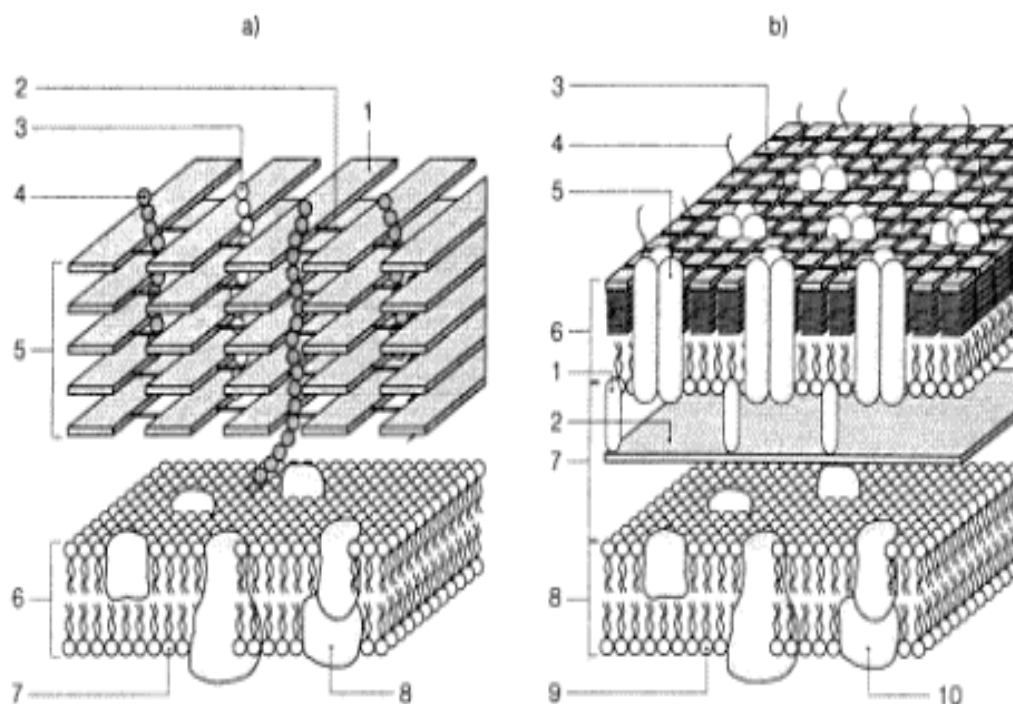
Inhibice bakteriálního růstu způsobená účinkem organických kyselin je zapříčiněna potlačením základních metabolických reakcí, zátěží na intracelulární homeostázu pH a akumulací toxických aniontů (29).

Molekula konzervační látky je uvnitř buňky rozptýlena až do dosažení rovnováhy vzhledem ke gradientu pH přes membránu. To má za následek nahromadění aniontů a protonů v buňce. K inhibici přispívají také další vlivy, jako je přerušení membrány, inhibice základních metabolických reakcí, nahromadění toxických aniontů a zátěž na intracelulární homeostázu pH (17).

1.2.2 Mechanismy rezistence

Mikrobiální rezistence na slabé organické kyseliny může zahrnovat řadu mechanismů. U bakterií jsou k dispozici vědomosti týkající se jejich vnitřní neindukovatelné rezistence na tyto sloučeniny (29).

Gram pozitivní bakterie nemají vnější membránu. Vnější membrána gramnegativních bakterií je součástí buněčné stěny a představuje ji dvojvrstva fosfolipidů a bílkovin, která je kotvená k peptidoglykanu buněčné stěny molekulami lipoproteinu (Obrázek č. 1) (29).



Obrázek č. 1: Schéma demonstrující rozdíly ve stavbě buněčné stěny gram pozitivní (vlevo) a gramnegativní (vpravo) bakterie. (Podle M.J. Polczara et al.)

a): 1 Peptidoglykanový řetízek; 2 Příčné propojení; 3 Polysacharid; 4 Teichoová kyselina; 5 Buněčná stěna; 6 Cytoplasmatická membrána; 7 Fosfolipid; 8 Protein.

b): 1 Lipoprotein; 2 Peptidoglykan; 3 Lipopolysacharid; 4 antigeny; 5 Porinové trimery; 6 Vnější membrána; 7 Periplasmový prostor; 8 Cytoplasmatická membrána; 9 Fosfolipid; 10 Protein.

Organické kyseliny mohou proto snadno vstupovat do nitra buněk gram pozitivních bakterií, jejich vnitřní rezistence je relativně nízká. Gramnegativní

bakterie mají díky složitější stavbě buněčné stěny komplikovanější rezistenční mechanismy. V některých případech jsou mikroorganismy schopné degradovat konzervační látky specifickými enzymy (29).

V poslední době byly studovány indukovatelné mechanismy rezistence mikroorganismů. U *Salmonella typhimurium* je známo, že buňky se střetávají ve svém prostředí s řadou stresových faktorů, např. extrémně nízké hodnoty pH v žaludku nebo přítomnost velkého množství částečně hydrofóbních organických kyselin ve střevě. Tato bakterie disponuje acidotolerancí, zahrnující komplex obranných systémů, které umožňují buňkám přežít v prostředí pH kolem 3. Rovněž u *Escherichia coli* O157:H7 byla pozorována rezistence na kyselinu benzoovou při hodnotě pH 2 (29).

Podobné mechanismy byly také nalezeny u plísní. U kvasinek se podílí na rezistenci ke kyselinám enzym ATPáza cytoplasmatické membrány. Obranné mechanismy jsou založené na transportu anionů z nitra buněk (29).

1.2.3 Konzervace organickými kyselinami

Konzervujícími organickými kyselinami se rozumějí kyseliny obsažené ve značnějším množství v ovoci nebo získávané ve velkém některými biologickými procesy – tedy kyselina citronová, vinná, jablečná octová a mléčná. Těmito kyselinami lze chránit potraviny před rozkladem pouze za určitých okolností a zpravidla na omezeně dlouhou dobu. Je nutné rozlišovat o jakou potravinu se jedná a jaké mikroorganismy v ní nebo na ní mohou růst (15).

Většina bakterií nesnáší pH nižší než 4,0 až 4,3, kdežto rozvoj kvasinek, plísní a některých acidofilních bakterií zastavuje teprve silnější až velmi silné okyselení. Přitom jsou organické kyseliny často ohroženy některými mikroorganismy, které je využívají a tak prostředí postupně odkyselují. K potlačení některých mikroorganismů tedy stačí prostředí okyselit, a to k pH asi 4,0, nebo i vyššímu (15).

Podle schopnosti potlačovat činnost běžné acidofilní mikroflóry, lze nejobvyklejší organické kyseliny seřadit takto: kyselina octová, kyselina mléčná,

kyselina citronová, kyselina vinná a jablečná (pořadí platí, pokud jde o pH i koncentraci kyseliny) (15).

Nejúčinnější je kyselina octová, která potlačuje mikroorganismy jednak tím, že reaguje s plasmatickou membránou, jednak tím, že konkuruje v enzymových reakcích zpracovávaným aminokyselinám. S klesajícím pH její účinnost roste. Vyšší než 4 až 6% koncentrace kyseliny octové působí na četné vegetativní formy bakterií smrtivě. Spory však snášejí i 6% koncentrace kyseliny octové, velmi dlouho (15).

1.2.4 Antimikrobiální účinky organických kyselin

Antimikrobiální účinky některých organických kyselin byly testovány na čerstvém mase a masných výrobcích.

Dekontaminaci jatečného hovězího masa zkoumali užitím 1% kyseliny octové Avans a kol. (3). Tato kyselina byla aplikována ve formě spreje v intervalu 61 týdnů ve dvou provozních závodech. Tato koncentrace neměla vliv na redukci patogenů vyskytujících se na mase. Zanedbatelný bakteriostatický efekt měla také 1,5% kyselina octová, spolu s citronovou a mléčnou na vepřovém mase (8).

Studie zabývající se vlivem kyseliny octové na přítomné patogeny při ošetřování povrchu masa, uvádějí pouze určitou redukci růstu, ale inhibiční koncentrace zjištěna nebyla (17).

Zcela bez efektu na *E. coli* O157:H7 bylo opláchnutí inokulovaného hovězího masa 2% kyselinou octovou (7). Neúčinnost antimikrobiální látky je způsobena schopností gramnegativních bakterií přichytit se na povrch masa.

Při použití 3% kyseliny octové jako sanitačního prostředku při ošetřování povrchu masa došlo k redukci na 1,5 log. Inhibice patogenních bakterií tedy také nebyla zaznamenána (Anderson a kol., 1987) (2). Stejného snížení bylo dosaženo i s 2% kyselinou mléčnou, která se v mase tvoří během procesu zrání (22). Van Netten (27) se ve své studii zabývali vlivem 2% kyseliny mléčné při 37 °C po dobu 30 až 90 sekund. Došli k závěru, že kyselina je schopna z povrchu vepřového masa eliminovat salmonelu, ale už ne *Listeria monocytogenes*.

Rozstříkem páry speciálními tryskami kombinované s následnou aplikací 2% roztoku kyseliny mléčné, na povrch poražených vepřových kusů, na konci porážecí linky, dochází po 5 dnech chladírenského skladování ke snížení CFU o 1 – 3 řády (19).

Použití kyseliny mléčné a horké vody na kontaminované hovězí maso během chladírenského skladování vedlo k redukci *Salmonella typhimurium* o 0,43 – 1,78 log a *Listeria monocytogenes* o 1,69 – 3,84 log, což může přispívat ke zvýšení bezpečnosti na výrobních linkách (18).

Na eliminaci patogenů z povrchu masa má také vliv teplota, při které dochází k aplikaci antimikrobiální látky. Roztok 3% kyseliny mléčné redukoval růst *E. coli* O157:H7 (klinický izolát) o řád cfu/ml při teplotě 55 °C při ponoření na 15 s. Tento roztok byl ale bez účinku při použití 20 °C (10).

Ze sensorického důvodu se k dekontaminaci povrchu masa může použít 1 – 2% kyselina mléčná nebo octová. Tyto koncentrace byly shledány limitními na udržení sensorické kvality. Českou legislativou není určeno, jakou kyselinou a v jakém množství lze ošetřovat povrch masa. Čeští technologové používají 1 – 3% kyselinu mléčnou nebo mléčnan spíše než kyselinu octovou (17).

1.2.5 Použití organických kyselin ve výživě zvířat

Zatím největšího uplatnění doznalo použití organických kyselin ve výživě prasat. Tsiloyiannis a kol. zkoušeli několik organických kyselin (mléčnou, propionovou, mravenčí, jablečnou, fumarovou, citronovou) v množství 1,0 – 1,6 % v krmné směsi selat. Přídavek organických kyselin snížil výskyt průjmů, enterotoxigenních kmenů *Escherichia coli* a zvýšil přírůstky hmotnosti selat. Pro kontrolu průjmů se nejvíce osvědčila kyselina mléčná. V této souvislosti lze rovněž uvést, že kyselina mléčná zvyšuje permeabilitu vnější buněčné membrány a činí buňku citlivější vůči účinku antimikrobiálních látek (1).

1.3 Kyselina mléčná

Kyselina mléčná $\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$, je přírodní organická látka, kyselé chuti, lehce rozpustná ve vodě. Vzniká mléčným kvašením cukrů, například v mléce, sýrech, kyselém zelí (20).

Kyselina mléčná je nejdůležitějším zástupcem monokarboxylových hydroxykyselin. Má jeden asymetrický uhlíkový atom, a může se tedy vyskytovat ve dvou opticky aktivních formách. L-mléčná kyselina je pravotočivá a bývá přítomna v mase a vnitřnostech, kde vzniká při tělesné námaze z glykogenu. Tvoří se také při mléčném kvašení cukrů, například mikroorganismem *Lactobacillus bulgaricus* (6).

Levotočivá D-mléčná kyselina vzniká při kvašení cukrů jinými mikroorganismy (například: *Bacterium aerogenes*). Opticky inaktivní D,L-mléčná kyselina (racemická) se rovněž tvoří během kvašení za určitých podmínek. Technicky se získává působením mikroorganismu *Lactobacillus delbruckii* (6).

Pro své vlastnosti:

- vysoká izomerní čistota,
- fyziologický ráz a netoxičnost,
- kapalná forma,
- mírná a příjemná chuť i vůně,
- konzervační vlastnosti

se kyselina mléčná stala běžně používaným prostředkem v potravinářské výrobě. Jejími hlavními funkcemi je okyselování, dodávání příchuti a konzervace. Používá se v pekařství, pivovarnictví, koželužství, k přípravě limonád a při barvení a zušlechťování textilií. Pro své antiseptické vlastnosti se také používá v mastech, ústních vodách a jako prostředek k ošetřování vlasů (20).

V posledním desetiletí je kyselina mléčná jednou z nejčastěji používaných přísad, které mají zvýšit výrobní jistotu, prodloužit údržnost a zvýšit zdravotní nezávadnost potravin. V potravinách zajišťuje přirozenou údržnost. Na této údržnosti se účastní jak působení mléčnanového iontu, tak snížením hodnoty pH a aktivity vody (20).

Kyselina mléčná je přirozená složka masa. Vzniká v průběhu postmortálních změn. Enzymovou přeměnou svalového glykogenu v anaerobním prostředí. Zdrojem pro vznik je glykogen přirozeně přítomný ve svalovině, ze kterého vzniká glukoso-6-fosfát, jenž přes řadu meziproductů přechází na kyselinu pyrohroznovou redukující se na kyselinu mléčnou. Množství kyseliny mléčné, které se tak vytvoří, závisí na koncentraci glykogenu, a tedy na fyzickém stavu jatečných zvířat těsně před porážkou (12).

Přirozená kyselina mléčná se ve svalovině vyskytuje ve formě L(+), tj. pravotočivé, zatímco syntetická kyselina mléčná obsahuje oba optické izomery, je to tedy racemát, směs kyseliny L(+) a D(-). Do potravin je možné přidávat jen její přirozenou formu (12).

1.3.1 Kyselina mléčná v surovinách živočišného původu

Maso a jiné konzervářské suroviny živočišného původu jsou ve zcela čerstvém stavu velmi málo kyselé (pH = 6,6 až 7,2). V zápětí po porážce se kyselost masa zvýší díky přechodnému zvýšení hladiny kyseliny mléčné. Toto přirozené okyselení nedosáhne kyselosti v technologickém smyslu (pH < 4), je však důležitým faktorem, brzdícím nepříznivé rozkladné procesy v době tzv. zrání masa (15).

V živých svalech vzniká kyselina mléčná jako produkt štěpení, resp. anaerobní fáze oxidace sacharidů. Její případné nahromadění v unaveném svalstvu bývá jen krátkodobé, neboť se při odpočinku rychle, z části aerobně, spaluje a zčásti regeneruje zpět na glykogen. Po zabití a vykrvení zvířete se přeruší přívod kyslíku do svalové tkáně a ochromí se činnost enzymů aerobní fáze dýchání, takže produkce mléčné kyseliny podstatně převyšuje její odbourávání a tkáň se okyseluje (15).

Je-li zvíře v době porážky v normální kondici a neunavené, zvýší se obsah kyseliny mléčné ve svalovině z původních asi 0,5 – 2 g/kg až na 7 - 12 g/kg, pH klesne v několika hodinách z původní hodnoty 7,2 - 6,8 asi na 5,6. V mase zvířat, u nichž se glykogen z nějakého důvodu (např. únava) vyčerpal a kyselina mléčná

spotřebovala před porážkou, vznikne kyseliny mléčné méně až velmi málo a maso snáze napadají hnilobné mikroorganismy (15).

1.3.2 Tvorba kyseliny mléčné

Kyselina mléčná se vyskytuje ve dvou stereoizomerech L(+) a D(-). Tvorba čistých izomerů homofermentativními mléčnými bakteriemi je poměrně vzácná, častější je tvorba racemické směsi, v níž mohou být oba izomery zastoupeny různou měrou. Z hlediska fyziologických požadavků člověka je L(+)-mléčná kyselina, která je přirozeným metabolitem lidského těla vznikajícím ve svalech a zpracovávaným v játrech, hodnocena lépe. Její tvorba závisí nejen na druhu a kmeni mléčných bakterií, ale i na kultivačních podmínkách t.j. na složení kultivačního média, teplotě kultivace, redoxním potenciálu prostředí apod. Na změnu kultivačních podmínek reaguje kultura změnou chování a také změnou morfologie (35).

L(+)-mléčná kyselina je tvořena z pyruvátu, dodávaného glykolýzou. Produkce D(-)-mléčné kyseliny může patrně nastat z několika příčin. První z nich je, že buňky produkují racemasu, která katalyzuje izomeraci L(+)-izomeru na D(-), druhá, že buňky obsahují D-laktát dehydrogenasu a D(-)-izomer kyseliny mléčné vzniká po glykolýze z pyruvátu stejně jako L(+)-izomer a třetí možností je, že D(-)-izomer vzniká jinou metabolickou drahou než glykolýzou např. z aminokyselin (35).

1.3.3 Příprava kyseliny mléčné

Kyselina L(+)-mléčná se vyrábí přirozenou fermentací z cukru (sacharózy) činnostmi vhodně vybraných mléčných bakterií, a to speciálního kmene *Lactobacillus sp.* Pro stabilizaci pH během fermentace se přidává uhličitán vápenatý. Po fermentaci vzniká mléčnan vápenatý, z něho pak okyselením sádra a kyselina mléčná. Po neutralizaci a koncentraci jsou vyráběny různé deriváty kyseliny mléčné. Získat lze i příslušné soli – mléčnany (sodný, draselný, aj.), které pak mohou sloužit jako aditivum (12).

1.3.4 Aplikace kyseliny mléčné na maso

Použití organických kyselin snižuje bakteriální počty v povrchové vrstvě masa o 1-2 řády, v závislosti na typu a koncentraci kyseliny. Tímto ošetřením se sníží počáteční mikrobiální kontaminace základní suroviny vstupující do masné výroby, což přispívá k omezení nárůstu mikroorganismů v masných výrobcích (12).

Povrchový postřík kyselinou mléčnou má oproti jiným kyselinám tu výhodu, že je přirozenou složkou masa a neovlivňuje jeho organoleptické vlastnosti (4, 12).

Dochází nejen ke snížení pH povrchových vrstev masa na hodnoty okolo 3,5, což jsou hodnoty, které mají velmi účinný baktericidní efekt (9, 12), ale také ke specifickému účinku v nedisociované formě.

Aplikace kyseliny mléčné na povrch masa vede ke snížení počáteční četnosti mikroorganismů a prodloužení nástupu logaritmické fáze jejich růstu. Současně se sníží i obsah enterobakterií (12).

Kyselinu mléčnou je možné aplikovat na různých místech porážecí linky, optimální okamžik je co nejdříve, kdy většina mikroorganismů je dosud na povrchu a nepronikla do vnitřních vrstev (12). Ke kontaminaci dochází nejčastěji na povrchu.

Nanášení kyseliny mléčné na povrch masa je možné několika způsoby (12):

- postříkem roztokem kyseliny mléčné o teplotě blízké nebo vyšší než je teplota povrchu jatečně opracovaných kusů (u drůbeže např. 40 – 50 °C),
- přidavkem kyseliny mléčné do další oplachovací vody,
- namáčením jatečných těl drůbeže do roztoku kyseliny (15 – 60 s).

Kyselina mléčná se aplikuje ve formě 1 – 2% roztoku. Horní hranice koncentrace je omezena organoleptickými vlastnostmi potraviny, přičemž 2% roztok ještě tyto vlastnosti u čerstvého masa neovlivňuje. Uvádí se, že aplikace kyseliny mléčné na povrch drůbeže zlepšuje křehkost masa (12).

Aplikace 1% roztoku kyseliny mléčné na povrch masa způsobí snížení pH na 3,64 a výrazné snížení povrchové kontaminace. Podle dosavadních poznatků se nízké pH udržuje na povrchu masa přibližně 72 hodin, poté se začíná pozvolna vracet k původním hodnotám (12)

Postřik kyseliny mléčné na povrch drůbeže vede vedle snížení celkové četnosti mikroorganismů i k výraznému snížení výskytu salmonel, stafylokoků a pseudomonád, významně byly inhibovány i *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* a ostatní zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* (12).

1.3.5 Využití kyseliny mléčné v kosmetice

V kosmetickém průmyslu je kyselina mléčná populárně známá jako AHA kyseliny. Je široce využívaná jako jemnější alternativa kyseliny glykolové. Je využívána jako látka proti stárnutí, pro vypínání pleti. Snižuje poškození pleti sluncem, vylepšuje její strukturu a barvu, zlepšuje celkový vzhled pleti (32).

1.4 Bakterie

1.4.1 Morfologie bakterií

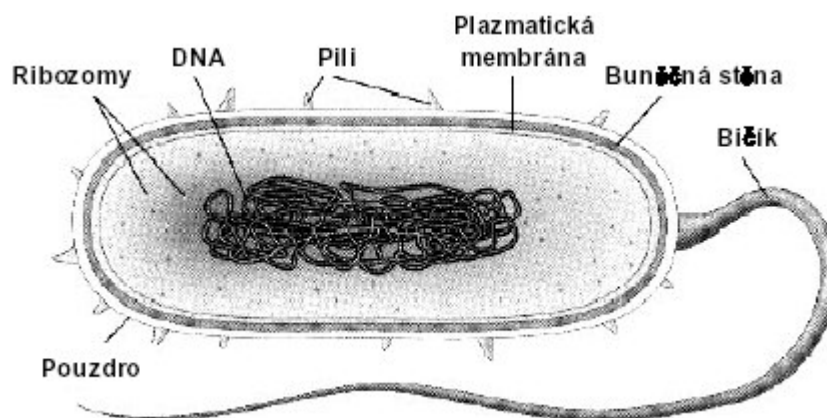
Tvar buněk bakterií je nejčastěji tyčinkovitý, méně často kulovitý. Vlákňitý tvar se vyskytuje u poměrně rozsáhlé skupiny půdních bakterií patřících do řádu *Actinomycetales*.

Tyčinkovité bakterie jsou buď rovné, zakřivené, tvaru pravidelné spirály nebo dlouhé nepravidelné spirály. Jejich délka se většinou pohybuje v rozmezí od 1 do 3 μm , závisí na fyziologickém stavu buňky. Šířka tyčinkovitých bakterií je poměrně stálá pohybuje se v rozmezí od 0,5 do 1,5 μm . Tyčinkovité bakterie se rozmnožují příčným dělením (24).

Kulovité vegetativní buňky bakterií se nazývají koky. Při rozmnožování dělením pouze v jedné rovině, tvoří řetízky. Při dělení ve dvou na sebe kolmých rovinách vytvářejí většinou tetrády, při dělení ve třech na sebe kolmých rovinách tvoří pravidelné balíčky po osmi až několika stech buňkách (tzv. sarciny) (24).

1.4.2 Struktura bakteriální buňky

Schématickou strukturu bakterií znázorňuje obrázek č. 2.



Obrázek č. 2: Struktura bakteriální buňky

1.4.2.1 Buněčná stěna

Buněčná stěna odděluje buňku od vnějšího prostředí, dává buňce tvar a chrání ji před mechanickými vlivy a před účinky osmotického tlaku vnějšího prostředí. V buněčné stěně jsou poměrně velké póry, kterými může volnou difuzí procházet většina chemických sloučenin. Pouze vysokomolekulární sloučeniny, jako jsou bílkoviny nebo polysacharidy, nemohou póry buněčné stěny procházet (24).

Pevnost a neohebnost buněčné stěny bakterií je výsledkem přítomnosti vrstvy peptidoglykanů, obsahujících polysacharidová vlákna, která jsou spojena prostřednictvím tetra- nebo pentapeptidů, a to peptidovou vazbou. Tloušťka peptidoglykanové vrstvy se u jednotlivých bakterií liší a představuje jednu obrovskou molekulu (24).

Další složky buněčné stěny jsou rozdílné u gramnegativních a gram pozitivních bakterií (Obrázek č. 1). Hlavní složkou buněčné stěny gram pozitivních bakterií je silná peptidoglykanová vrstva, která je vyplněna tzv. teichoovou kyselinou. Na peptidoglykan jsou také vázány polysacharidy složené z glukosy, galaktosy, mannosy a některých dalších monosacharidů (24).

Stěna gramnegativních bakterií se skládá z tenké vrstvy peptidoglykanů bez teichoové kyseliny a z tzv. vnější membrány, jež obsahuje fosfolipidy, strukturní i enzymové proteiny, lipoproteiny a lipopolysacharidy. Obsah lipidů ve stěně gramnegativních bakterií je příčinou jejich zvýšené odolnosti k aniontovým povrchově aktivním látkám, jako jsou mýdla, žlučové kyseliny nebo alkylsulfáty (24).

1.4.2.2 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána tvoří osmotické rozhraní buňky a vnějšího prostředí. Jejimi póry mohou volnou difuzí procházet pouze nízkomolekulární sloučeniny bez elektrického náboje (tj. nedisociované molekuly vody nebo nedisociované molekuly slabých kyselin, alkoholy, apod) (24).

Cytoplazmatická membrána bakterií je velmi jemná a tenká (tlustá asi 7 nm). Je složena z fosfolipidů a proteinů, přičemž proteiny představují 50 až 70 % její sušiny. Z cytoplazmatické membrány bakterií vybíhají do cytoplazmy vychlípeniny.

Cytoplazmatická membrána je sídlem dýchacích enzymů, systému oxidační fosforylace, enzymů syntézy a hydrolýzy fosfolipidů a fáze syntézy složek buněčné stěny a pouzdrových obalů.

V cytoplazmatické membráně bakterií jsou také přítomny bílkovinné přenašeče, nutné pro transport látek do buňky a z buňky (24).

1.4.2.3 Cytoplazma

Cytoplazma tvoří vnitřní obsah buňky. Skládá se z buněčné šťávy, což je v podstatě vodný roztok enzymů, meziproduktů metabolismu, rezervních látek a některých iontů. Obsahuje také ribozomy, v nichž probíhá syntéza bílkovin. Ribozomy bakterií jsou menší, než u eukaryotních mikroorganismů a tvoří až 40 % sušiny cytoplazmy. Tento vysoký obsah ribozomů umožňuje obrovskou rychlost syntézy buněčné hmoty bakterií (24).

Největší podíl cytoplazmy tvoří voda, která představuje 65 až 70 % obsahu buňky. Sníží-li se obsah vody v cytoplazmě pod určitou hladinu, metabolismus a všechny životní projevy se zastavují, ale nemusí dojít ke smrti buňky.

Cytoplazma některých bakterií obsahuje také různá barviva (nejčastěji karotenoidní a melanoidní) (24).

1.4.2.4 *Jaderný materiál bakterií*

Jaderný materiál bakterií tvoří deoxyribonuklová kyselina (DNA) umístěna přímo v cytoplazmě a doprovázená malým množstvím plazmidů. Molekula DNA bakterií tvoří chromozom, který má uzavřenou strukturu (kružnice), má tvar dvojité šroubovice. Je to polynukleotid obsahující dvě purinové báze (adenin a guanin) a dvě pyrimidinové báze (thymin a cytosin).

Určitý úsek DNA představuje informaci o složení určité molekuly bílkovin nebo ribonukleové kyseliny anebo má určitou regulační funkci a je označován jako gen (24).

1.4.2.5 *Orgány pohybu bakterií*

Některé tyčinkovité bakterie mají na svém povrchu jeden nebo více bičků, jež umožňuje jejich pohyb. Bičky jsou dlouhá tenká vlákna složená z bílkoviny flagelinu. Na dolní části mají háček a dvojici kotoučků, jimiž jsou zakotveny do cytoplazmatické membrány. Podle počtu a umístění bičků rozdělujeme bakterie na monotricha (mají bičk na jednom pólu buňky), lofotricha (mají svazek bičků na jednom nebo obou pólech buňky) a peritricha (mají bičky po celém povrchu buňky). Bakterie netvořící bičky se nazývají atricha (24).

Reakce pohyblivých bakterií na přítomnost určitých látek v prostředí, projevující se pohybem bakterií do oblastí optimální koncentrace těchto látek, se nazývá chemotaxe. Podobná reakce aerobních nebo anaerobních bakterií na kyslík se nazývá aerotaxe.

Na povrchu některých bakterií lze pozorovat zvláštní dutá vlákénka označovaná jako fimbrie, slouží ke spojování buněk.

Některé bakterie jsou schopny klouzavého pohybu bez zvláštních pohybových orgánů (24).

1.4.2.6 *Slizovitý obal bakterií*

Některé druhy bakterií tvoří kolem svých buněk slizovitý obal z polysacharidů (nejčastěji z dextranů) nebo polypeptidů. Tento obal chrání buňku

proti vysychání a proti dalším nepříznivým podmínkám, není však pro život buňky nezbytně nutný. Některé bakterie tvoří ze slizu ostře ohraničené vrstvy zvané kapsule (24).

1.5 Vybrané druhy mikroorganismů a jejich vlastnosti

V této kapitole budou popsány vlastnosti vybraných potravinářsky významných, potencionálně patogenních bakterií, na nichž byl v této práci sledován vliv kyseliny mléčné.

1.5.1 *Bacillus cereus*

1.5.1.1 *Morfologické a fyziologické vlastnosti*

Bacillus cereus je gram pozitivní sporulující tyčinka o velikosti 3 - 5 x 1,0 - 1,2 μm. Tyčinky se obvykle řadí za sebou a tvoří rozličné řetízky, často různě uspořádané. Endospory jsou oválné nezduřující buňku, jsou elipsoidní, centrální až subcentrální, jsou vůči teplotě velmi rezistentní. Buňky se rozmnožují dělením, jsou aerobní i anaerobní, optimální teplota jejich růstu je 30 °C. Mají chemoheterotrofní způsob výživy (28).

Bacillus cereus se rozmnožuje dělením. Buňky zkvašují glukosu, sacharosu, glycerol a salicin za tvorby kyseliny, ale netvoří plyn. Má silně proteolytické vlastnosti, při rozkladu bílkovin tvoří amoniak. Z dusičnanů tvoří dusitany a hydrolyzuje škrob (26).

1.5.1.2 *Kultivační vlastnosti*

Na agarové půdě tvoří nepravidelné, šedobílé kolonie. Želatinové půdy a krevní sérum ztekucuje. Na krevním agaru tvoří hemolýzu. Na agarové půdě s vaječným žloutkem tvoří bělavé až bezbarvé kolonie, velké až 7 mm v průměru, ploché, s nízkými, hrubě nerovnými nepravidelnými okraji (26).

1.5.1.3 Výskyt a uplatnění

Bacillus cereus je v přírodě velmi rozšířený, vyskytuje se v prachu, v půdě a v nejrozmanitějším rozkládajícím se materiálu.(26)

1.5.1.4 Onemocnění z potravin způsobené *Bacillus cereus*

Kromě emetického (zvracení vyvolávajícího) toxinu, tvořeného již v potravíně, produkuje až v trávicím traktu hostitele diuretický (průjem způsobující) toxin. Dále působí dalším produktem svého metabolismu, enzymem fosfolipázou C, která přeměňuje v potravíně přítomný lecitin na toxický lyzolecitin (který poškozuje červené krvinky) (14).

Z hlediska výskytu jsou rizikové následující potraviny (14):

- maso a masné výrobky, ryby a rybí výrobky, konzervy (převážně infekce diuretického typu)
- emetický typ intoxikace je nejčastěji způsoben konzumací kontaminované rýže a dalších škrobnatých potravin (brambory, těstoviny)
- směsné potraviny typu omáček, pudinků, polévek cukrářských výrobků a salátů
- mléko, zelenina, sušené potravinářské výrobky.

1.5.2 *Bacillus subtilis*

1.5.2.1 Morfologické a fyziologické vlastnosti

Bacillus subtilis je gram pozitivní pohyblivá tyčinka se zaoblenými konci, o velikosti 2 - 3 x 0,7-0,8 μm. Tyčinky jsou uspořádány do řetízků, spory jsou oválného tvaru, nezduřující buňku. *Bacillus subtilis* je aerobní, optimální teplota jeho růstu je 30 °C. Vyznačuje se chemoorganotrofním způsobem výživy (26, 28).

Buňky mají tvar tyčinek se zaoblenými konci. Jsou peritrichně obrveny. Spory jsou umístěny excentricky a jsou velké 0,8 až 1 μm x 1 až 1,5 μm. Buňky obsahují glykogen jako zásobní látku. *Bacillus subtilis* se rozmnožuje dělením. Roste v teplotním rozmezí 10 až 60 °C. Spory snášejí teplotu až 150 °C po dobu

6 hodin. *B. cereus* ztekucuje želatinu, hydrolyzuje škrob a z dextrinu tvoří kyselinu (26).

1.5.2.2 Kultivační vlastnosti

Na agarových půdách tvoří *B. subtilis* okrouhlé kolonie, krémově bělavé barvy, někdy slabě nahnědlé a vláknitě rozbíhavé. Bujón kalí za vzniku šedavé sedimenty. Dobře roste na bramboru (26).

1.5.2.3 Výskyt a uplatnění

Bacillus subtilis je v přírodě velmi rozšířen, vyskytuje se zejména v seně, v prachu a ve vodě. Je obávanou kontaminací v pekařském průmyslu, kde způsobuje nitkovitost pečiva a chleba, a také v mlékárenském průmyslu, kde je škůdcem pasterovaného i kondenzovaného mléka. Jako kontaminant se dále vyskytuje v konzervářském průmyslu, v masném průmyslu, v kvasném průmyslu aj. (26).

1.5.3 *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens se taxonomicky řadí do čeledi *Pseudomonadaceae*.

1.5.3.1 Morfologické a fyziologické vlastnosti

Pseudomonas fluorescens jsou gramnegativní rovné nebo nepatrně zakřivené tyčinky o velikosti 0,5-1 x 1,5-5,0 mikrometrů. Pohybují se pomocí několika bičků, jsou aerobní, optimální teplota jejich růstu je 25 – 30 °C. Pseudomonády mají chemoorganotrofní způsob výživy (26).

Buňky jsou tyčinkovitého tvaru, vyskytují se jednotlivě i v párech. Na konci buňky je bičík. Rozmnožují se dělením. Dusičnany redukují na dusitany a amoniak. Netvoří. Indol, z glukosy tvoří kyselinu (26).

1.5.3.2 Kultivační vlastnosti

Na želatinové půdě tvoří okrouhlé kolonie se zeleným středem. Želatinu ztekucuje a peptonizují, tvoří žlutozelenou fluorescenci. Krevní sérum ztekucují. Na agaru je okolí kolonie zbarveno olivově zeleně (26).

1.5.3.3 Výskyt

Pseudomonas fluorescens se vyskytuje převážně v odpadních vodách, v půdě a ve výkalech. Běžně také ve zkažené potravě (vejčička, ryby, mléko). Vyvolává hořknutí mléka a žluknutí másla (26).

1.5.4 *Staphylococcus aureus*

Buňky *Staphylococcus aureus* mají kulovitý tvar. Vyskytují se jednotlivě nebo ve dvojicích, dosahují velikosti 0,5-1,0 μm . Jsou grampozitivní, nepohyblivé, fakultativně anaerobní, s chemoorganotrofním způsobem výživy. Tvoří zlatožlutý pigment (26,28).

1.5.4.1 Fyziologické vlastnosti

Buňky se rozmnožují dělením, rostou dobře v širokém rozmezí teplot 10 – 42 °C, optimální teplota jejich růstu je 30 – 37 °C. *S. aureus* je jeden z nejodolnějších nesporelujících mikroorganismů. Buňky jsou usmrceny za 1 hodinu při teplotě 60 – 70 °C. Tvoří termorezistentní toxin, který snáší záhřev až na 100 °C (26) po dobu 20 min (14). Bývají původcem alimentárních otrav.

Stafylococcus produkuje několik faktorů virulence: enzymy stafylokinázu, hyaluronidiázu, fosfatázu, koagulázu a dále hemoliziny a termostabilní enterotoxin (14).

1.5.4.2 Kultivační vlastnosti

Staphylococcus aureus roste na běžných kultivačních půdách s obsahem bílkovin. Ve vpichu do želatiny ji ztekucuje a tvoří žlutý až oranžový sediment. Kolonie na agaru jsou kulaté, lesklé, husté, žlutě až oranžově zbarvené (28).

1.5.4.3 Výskyt a význam

Staphylococcus aureus je nejčastějším původcem hnisavých onemocnění postihujících kůži, podkoží a mléčnou žlázu. Častá jsou také onemocnění dýchacího traktu. Bývá původcem otrav z mléka i jiných potravinářských výrobků. Je však citlivý na vhodná antibiotika (26).

Stafylokoky se vyskytují ubikvitárně: ve vzduchu, vodě, prachu, splašcích, na povrchu zařízení a pracovních ploch, na potravinách, na kůži živočichů i člověka v jejich dutině ústní a dutině nosní (14).

1.5.4.4 Onemocnění z potravin způsobené *S. aureus*

Stafylococcus je potenciálně druh, vyvolávající široké spektrum onemocnění a intoxikací (abscesy, meningitidy, osteomyelitidy atd.) (28). Enterotoxiny produkované stafylokoky v potravine jsou bílkovinné povahy, některé z nich jsou inaktivovány dalším varem, a proto je nebezpečí otrav hlavně u těch potravin, které se již tepelně nepracovávají (majonézy, saláty, krémy v cukrářských výrobcích, zmrzliny apod.) (24).

S. aureus je původcem tzv. stafylokokové enterotoxikózy. Bezprostřední příčinou tohoto onemocnění je konzumace potravin obsahující stafylokokový enterotoxin.

Symptomy otravy stafylokokovým enterotoxinem jsou vyvolány již dávkou toxinu menší než 1 µg/kg potravin, pro vytvoření této dávky stačí množství 10 buňek *S. aureus* /1g potravin (14).

Bakterie tvoří toxin v rozmezí teplot 7 - 48 °C, pH 4 - 10 a a_w 0,83 - 0,99 (14). Příznaky otravy se projevují 1 až 6 hodin po požití potravin a trvají 1 až 2 dny. (24).

Na přenosu stafylokoků se významně podílí člověk, u kterého se vyskytují hnisavé procesy na kůži nebo záněty horních cest dýchacích. Při styku s potravinami pak může způsobit sekundární kontaminaci. Pokud tato potravina není uchována při teplotě vyšší než 60 °C nebo nižší než 7 °C dochází následně k pomnožení stafylokoka a tvorbě toxinu (14).

Negativním faktorem v epidemiologii onemocnění je uchovávání ohřáté potravin delší dobu při pokojové teplotě (14).

1.5.4.5 Příznaky onemocnění

Hlavními příznaky onemocnění způsobeného *Staphylococcus aureus* jsou: nevolnost, zvracení, silné břišní křeče, případně bolesti hlavy, svalové křeče a přechodné změny krevního tlaku a pulzu. Pocení a pokles teploty jsou příznaky stafylokokové intoxikace. Projevují se již po 2 - 3 hodinách po konzumaci potravin kontaminované enterotoxinem (14).

Léčení je možné jen klidem na lůžku a podáváním velkého množství nápojů pro udržení kapalinové rovnováhy v těle (24).

1.5.4.6 Rizikové potraviny

Každým rokem je ve světě hlášeno několik smrtelných případů otrav stafylokokovými toxiny, které bývají produkovány v těchto potravinách: (24).

- maso, masné výrobky, včetně masa mletého a solených nakládaných mas (šunky), zvěřina, drůbež, vejce
- saláty na bázi vajec, ryb, kuřecího masa, brambor a těstovin
- pekařské produkty, pečivo s náplní, cukrářské výrobky
- mléko včetně sušeného mléka, mléčné výrobky (14).

1.5.5 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens se taxonomicky řadí do čeledi *Enterobacteriaceae*

1.5.5.1 Morfologické a fyziologické vlastnosti

Buňky rodu *Serratia* mají tvar velmi krátkých tyčinek, někdy až kulovitého tvaru, průměru sotva 1 μm . Vyskytují se jednotlivě nebo v krátkých řetězcích. Jsou peritrichně obrveny a jsou gramnegativní.

Buňky se rozmnožují dělením. Optimální teplota jejich růstu je 25 °C až 37 °C. Jsou fakultativně anaerobní. Z glukosy a jiných cukrů tvoří CO_2 a H_2 , rovněž kyselinu octovou, mravenčí, jantarovou a 2,3-butylenglykol. Z dusičnanů tvoří dusitany. Jejich významnou vlastností je tvorba červeného pigmentu, tzv. prodigiosinu. Vyznačují se také amylolytickou a proteolytickou enzymovou činností (26, 28).

1.5.5.2 Kultivační vlastnosti

Serratia marcescens roste dobře na všech základních obecných půdách, zvláště dobře, přidáme-li k těmto půdám škrob (26).

1.5.5.3 Výskyt

Všechny bakterie rodu *Serratia* jsou v přírodě velmi rozšířeny. Vyskytují se v půdě, ve vodě, v zemědělských produktech. Velmi často se s nimi setkáváme při mikrobiologické kontrole v potravinářském průmyslu. Kontaminují především škrobnaté suroviny, škrob zcukerňují a zkvašují. Bývají hlavním původcem červených skvrn na různých potravinách s obsahem škrobu (mouky). (26)

1.5.6 *Escherichia coli*

Escherichia coli se taxonomicky řadí do čeledi *Enterobacteriaceae*

1.5.6.1 Morfologické a fyziologické vlastnosti

Buňky *Escherichia coli* tvoří krátké, tlusté tyčinky se zaoblenými konci 0,5 až 1 μm x 1 až 2,5 μm . Vyskytují se většinou jednotlivě, méně často po dvou nebo v krátkých řetězcích. Pohybují se pomocí bičků. Nikdy netvoří spory. Jsou gramnegativní (26).

Buňky se rozmnožují dělením. Jsou fakultativně anaerobní. Rostou v kyselém i alkalickém prostředí, optimální pH jejich růstu je 7,6 a teplota 37 °C. *E. coli* štěpí glukosu, laktosu, galaktosu, xylosu, arabinosu, manit i glycerol. Zkvašováním cukru tvoří plyn a kyselinu mléčnou, octovou, mravenčí i propionovou – patří mezi heterofementativní mléčné bakterie. Z dusičnanů tvoří dusitany. Vytváří fekální zápach (26). Vyznačují se chemoorganotrofním způsobem výživy (28).

1.5.6.2 Kultivační vlastnosti

V bujónu tvoří zákal s šedavým sedimentem. Na agaru tvoří bílé až žluté kolonie. K laboratornímu důkazu *Escherichia coli* se používají diagnostické půdy s laktosou a indikátorem nebo diagnosticko selektivní půdy (Endův agar, agar

s bromthymolovou modří a tryptoflavinem, laurylsulfát tryptosový bujón aj.). Na Endově agaru tvoří okrouhlé kolonie o průměru 2 až 3 mm, dobře ohraničené, krvavě červené, obvykle s kovovým leskem (26). Kmeny, které produkují polysacharidové pouzdro tvoří mukozní kolonie. Na médiu s přídavkem laktózy roste v sytě červených koloniích s kovovým leskem / EndoA, MacConkey agar /. Některé kmeny /EHEC/ jsou β -hemolytické (30).

1.5.6.3 Výskyt a uplatnění

Escherichia coli je střevní saprofyt. Tvoří přirozenou a užitečnou mikroflóru zažívacího traktu člověka i zvířat (všech teplokrevných živočichů). Je důležitým regulátorem střevní mikroflóry. Při snížené tělesné odolnosti může způsobovat různá onemocnění (záněty). Při mikrobiologické kontrole v potravinářském průmyslu je důležitým indikátorem fekálního znečištění a zanedbávání hygienických a sanitačních předpisů a nařízení (26).

1.5.6.4 Onemocnění způsobená patogenními kmeny bakterie *E. coli*

Escherichia coli je v současné době považována za jeden z největších mikrobiologických problémů výroby potravin. Důvodem závažnosti je především: (14)

- vysoká infekčnost pro člověka
- velice nízká infekční dávka (< 100 buněk)
- vznik vážného akutního onemocnění
- výskyt patogenu u skotu a v souvislosti s tím v půdě

E. coli je většinou neškodná součást mikroflóry trávicího traktu teplokrevných živočichů. Některé kmeny však působením bakteriofágů nebo plasmidů získaly speciální mobilní geny, které jim propůjčují nové faktory virulence. Příslušné kmeny *E. coli* jsou potom označovány jako: (14)

- ***E. coli* enteropatogení** (pro kojence): **EPEC** - jsou většinou spojeny s hromadným výskytem průjemových onemocnění v kojeneckých ústavech. Nereprodukují toxin.

- **Enterotoxigenní *E. coli*: ETEC** - produkují termolabilní toxin (LT), příbuzný choleroému enterotoxinu, nebo termostabilní (ST) toxin, případně oba.
- **Enteroinvazivní *E. coli*: EIEC** - způsobují zánětlivé změny ve střevní sliznici.
- **Enterohemoragické *E. coli*: EHEC** - produkují tzv. verotoxin, který je příbuzný toxinu *Shigella dysenteriae*. Způsobuje hemoragickou kolitidu, hemolytický uremický syndrom. Je většinou vázán na serotyp O157:H7 (30).
- **Enteroadgregační *E. coli*: EAEC**

1.5.6.5 Rezistence

Patogenní kmeny *E. coli* mohou růst v rozmezí teplot 7 – 46 °C, pH 4,4 – 9 a a_w nad 0,96. Rychle se množí při koncentraci NaCl 2,5 %, inhibovány jsou až při koncentraci 8,5% NaCl. V mletém hovězím mase přežívají při teplotě –20 °C více než 9 měsíců. Vůči vyšším teplotám jsou méně odolné. (14).

Výskyt EHEC

Primárně se *E. coli* vyskytuje ve střevním traktu člověka a ostatních teplokrevných živočichů. Infekce se přenáší ze zvířat, kontaktem mezi lidmi nebo potravinami. Zdrojem šíření infekce je také fekální kontaminace přírodního prostředí (půda, voda) prostřednictvím hospodářských nebo divoce žijících zvířat, také domácích zvířat a bacilonosičů (14).

Nejvýznamnější alimentárně přenosná enterohemoragická *E. coli* (EHEC) je ***E. coli* O157:H7**. Jejím hlavním rezervoárem je skot.

Cesty nakažení člověka z tohoto zdroje jsou: (14)

- fekálně orální přenos přímým kontaktem s infikovaným zvířetem
- fekální kontaminace zemědělských plodin (hnojení)
- fekální kontaminace vodních zdrojů
- fekální kontaminace těl poražených zvířat během porážení a eviscerace
- konzumace fekálně kontaminovaného syrového mléka nebo produktů z něj vyrobených.

1.5.6.6 Nejvýznamnější onemocnění způsobené patogenními kmeny *E. coli*

Mezi významná onemocnění způsobená patogenními kmeny *E. coli* patří především:

- hemoragická kolitida - těžký zánět střeva doprovázený krvavými průjmy
- hemolyticko-uremický syndrom – akutní selhání ledvin (nebezpečné u dětí do 5let). Dalšími projevy jsou: rozpad červených krvinek, poruchy srážení krve, přítomnost krve a bílkovin v moči. (14)

1.5.6.7 Rizikové potraviny

Potraviny ve kterých se patogenní kmeny *E. coli* vyskytují jsou:

- beefburgery – nedostatečně tepelně opracované
- výrobky ze sekaného nebo mletého hovězího masa
- nepasterované mléko a výrobky z něho
- fermentované tepelně neopracované masné výrobky
- hlávkový salát (14)

E. coli je nejprozkoumanějším mikrobiálním druhem, neboť slouží jako modelový organismus pro biochemické, genetické i fyziologické studie. Je prvním bakteriálním druhem, u něhož byla pozorována a prostudována konjugace buněk a výměna genetického materiálu. Chromozom byl podrobně zmapován a také bakteriofágy, které jej napadají, patří k nejprostudovanějším (24).

1.5.7 *Salmonella typhimurium*

Rod *Salmonella* náleží do čeledi *Enterobacteriaceae* (5).

1.5.7.1 Morfologické a fyziologické vlastnosti

Buňky tvoří drobné tlusté tyčinky velikosti 0,5 až 1 μm x 1 až 1,5 μm se zaoblenými konci. Jsou nesporotvorné, peritrichně obrvené. Jsou gramnegativní (26). Množí se dělením při teplotách 15 až 40 °C. Optimální teplota růstu je 37 °C. Jsou fakultativně anaerobní. Zkvašují řadu cukrů, nezakvašují laktosu – tím se liší od koliformních bakterií. Želatinu neztekucují, z dusičnanů tvoří dusitany (28).

1.5.7.2 Kultivační vlastnosti

Salmonely jsou poměrně nenáročné na živiny. Snášejí poměrně dobře přítomnost žlučových solí a brilantové zeleně (5). Růstově jsou poměrně málo náročné. Na agarových půdách tvoří hlenovité kolonie. Bujon rychle a silně kalí. K jejich diagnostice se používají selektivní půdy (sulfadiazinový agar s brilantovou zelení, MacConkey agar s brilantovou zelení – kolonie na něm jsou bezbarvé a průsvitné) (26).

1.5.7.3 Výskyt

Přirozenými hostiteli salmonel jsou zvířata, hlavně hlodavci a ptáci. Pro člověka jsou více nebo méně patogenní. Jsou původci břišního tyfu. Velmi rychle se pomnožují v některých potravinách, zvláště v mléce, vaječné melanzí, masných výrobcích (hlavně z mletého masa). Hojně se vyskytují v kachních vejcích.

Salmonely jsou většinou hlavní příčinou alimentárních infekcí, výskyt salmonelóz stoupá (5).

1.5.7.4 Klinické příznaky a epidemiologie

Infekce způsobená salmonelami může proběhnout v několika formách: akutní gastroenteritida, střevní tyfus (nejtěžší forma, původce *S. typhi*), netyfoidní bakteriémie s orgánovou manifestací a stav nosičství (4).

Pro vznik infekce má rozhodující vliv počet živých nebo uhynulých bakterií a jejich produktů v potravíně. Ochranou bariérou je normální acidita žaludeční šťávy. Podle velikosti infekční dávky a vnímavosti jedince probíhá onemocnění jako lehčí průjem nebo jako těžká gastroenteritida a enterokolitida s horečkami, zvracením a průjmy. Charakteristickým znakem je inkubační doba 6 až 48 hodin po požití potraviny. Běžná gastroenteritida zpravidla ustoupí do 3 dnů. Dnes se za infekční dávku považuje $10^1 - 10^5$ buněk (9).

Stoupající trend v počtu onemocnění byl zaznamenán i v České republice. K velkému nárůstu počtu onemocnění dochází od roku 1989, což je zřejmě spojeno s rozvojem soukromého podnikání v oblasti potravinářství. Po desetiletí zaujímala mezi salmonelózami první místo *S. typhimurium* (5).

1.5.7.5 *Salmonely v potravinách*

Člověk se infikuje salmonelami téměř výlučně orální cestou, a to potravinami, které se nezpracovávají za vyšší teploty (9). Živočišné produkty mohou být kontaminovány primárně, intravitálně (za života zvířete) nebo sekundárně. Do těla zvířat se salmonely dostávají krmivem, vdechováním, ze zamořených vod a jiných kontaminovaných zdrojů prostředí (5).

Nejvýznamnější faktory, které ovlivňují činnost salmonel jsou teplota, pH a podíl volné, využitelné vody (a_w). Optimální podmínky pro jejich činnost jsou v rozmezí teplot 30 - 40 °C, pH 6,5 až 7,2, a_w 0,97 – 1,0. Teplotami nad 60 °C jsou salmonely inhibovány, teplotami nad 75 °C jsou usmrcovány (9).

1.5.8 *Micrococcus luteus*

Rod *Micrococcus* náleží do čeledi *Micrococcaceae* (1).

1.5.8.1 *Morfologické znaky*

Buňky *Micrococcus luteus* mají kulovitý tvar velikosti 0,9 - 1,8 μm , nejčastěji jsou uspořádány do tetrad, jsou nepohyblivé, aerobní, gram pozitivní. Mají chemoorganotrofní způsob výživy (28). Optimální kultivační teploty se pohybují v rozmezí 25 – 37 °C

Rod *Micrococcus* je schopen růst v přítomnosti vyšší koncentrace soli, je proto často odpovědný za kažení nakládaných masných výrobků. Mnoho kmenů je schopno přežívat pasterační teploty a následně kazit takto ošetřené produkty (14).

Micrococcus se vyskytuje hlavně v solených potravinách, kde může tvořit žluté, oranžové až intenzivně růžové kolonie. Toto zbarvení je způsobeno nerozpustnými karotenoidními barvivy, přítomnými v jejich buňkách. Tato barviva chrání buňky před letálními účinky ultrafialové složky slunečního světla, a proto se vyskytují jako častá vzdušná kontaminace (24).

1.6 Legislativa

Od roku 2004 platí v České republice zákon č. 456/2004 Sb. O potravinách a tabákových výrobcích. Na tento zákon také navazují vyhlášky ministerstva zdravotnictví a zemědělství (33).

Vyhláška ministerstva zdravotnictví č. 132 ze dne 12. března 2004 O mikrobiálních požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení, stanovuje přípustné a nejvyšší mezní hodnoty počtu mikroorganismů pro jednotlivé kategorie potravin (33).

Ve vyhlášce č. 304/2004 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných a pomocných látek při výrobě potravin, jsou obecně, ale i konkrétně popsány „přídatné látky“, které mohou být povoleny pouze za předpokladu, že

- a) je prokázána jejich technologická potřeba a účelu nelze dosáhnout jinými ekonomickými nebo technologickými prostředky,
- b) v navrhovaných množstvích nepředstavují žádné zdravotní riziko pro spotřebitele,
- c) nemohou uvádět spotřebitele v omyl (11).

Mezi přídatné látky, které se dělí do 26 skupin, patří také konzervanty. Podle vyhlášky č. 304/2004 Sb. konzervanty rozumíme látky, které prodlužují údržnost potravin a které ji chrání proti zkáze způsobené činností mikroorganismů (34).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje, zařízení a pomůcky

Mikropipety - 100 – 1000 μ l BIOHIT

Mikrovlnná trouba - Electrolux

Parní sterilátor – autokláv - H + P Varioklav

Biologický termostat - 37 °C, 30 °C - Laboratorní přístroje PRAHA

Horkovzdušný sterilátor - Memmert – elektronicky regulovaná sušárna

Horkovzdušná sušárna - KBC G-100/250

Váhy - KERN 440.47N max. 2000g

Chladnička - Elektrolux

UV zářič - PROLUX GM55W

Laboratorní sklo

pH indikátory - Lachema

pH metr

Plynový kahan

Program k vyhodnocení Enterotestů a Staphytestů - TNW Lite, verze 5.6.

2.2 Kultivační půdy

2.2.1 Endo Agar – (EA)

Použití:

Pro detekci a rozlišení laktosa-positivních a laktosa-negativních koliformních bakterií.

Složení:

Látka	Množství (g/l)
Masový pepton	10,0
Laktosa	10,0
Siřičitan sodný	2,5
Hydrogenfosforečnan (di)draselný	3,5
Basický fuchsin	0,5
Agar	15,0
Konečné pH (při 25 °C) $7,5 \pm 0,2$	

Příprava půdy:

41,5 g přípravku bylo naváženo do 1000 ml destilované vody a zahřáto do úplného rozpuštění. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Před naléváním na Petriho misky byla půda důkladně promíchána (32).

2.2.2 Manitol salt agar – (MSA)

Použití

Selektivní médium pro izolaci stafylokoků

Složení:

Látka	Množství (g/l)
Proteosový pepton	10,00
Hovězí extrakt	1,00
Chlorid sodný	75,00
D-mannitol	10,00
Fenolová červeň	0,025
Agar	15,00
Konečné pH (při 25 °C) 7,4 ± 0,2	

Příprava půdy:

Do 1000 ml destilované vody bylo naváženo 111,0 g přípravku a zahřáto do úplného rozpuštění. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Poté byla živná půda ochlazená na teplotu 45-50 °C. Před naléváním na Petriho misky byla půda důkladně promíchána (32).

2.2.3 Plate Count Agar – (PCA)

Použití

Pro stanovení počtu mikroorganismů v potravinách a vodě. Složení přípravku odpovídá požadavkům ČSN ISO 4833, 2293 a 7698.

Složení:

Látka	Množství (g/l)
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	5,0
Kvasničný extrakt	2,5
Glukosa	1,0
Agar	15,00
Konečné pH (při 25 °C) 7,0 ±0,2	

Příprava půdy:

Do 1000 ml destilované vody bylo naváženo 23,5 g přípravku a zahřáto do úplného rozpuštění. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut (32).

2.2.4 Masopeptonový bujón – (MPB)

Složení:

Látka	Množství (g/l)
Masový výtazek	6,0
Pepton	8,0
NaCl	5,0
H ₂ O	1000,0 ml
Konečné pH (při 25 °C) 6,8 až 7,2	

Příprava půdy:

Jednotlivé složky bujónu byly naváženy do 1000,0 ml destilované vody a zahřáty do úplného rozpuštění. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut (32).

2.2.5 Masopeptonový agar – (MPA)

Složení:

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

Konečné pH (při 25 °C) 6,8 až 7,2

Příprava půdy:

Jednotlivé složky bujónu byly naváženy do 1000,0 ml destilované vody a zahřáty do úplného rozpuštění. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut (32).

2.2.6 Mueller hinton agar – (MHA)

Složení

Látka	Množství (g/l)
Kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5
Hovězí srdcová infuse	2,0
Škrob, rozpustný	1,5
Agar	17,0

Konečné pH (při 25°C) 7,3 +/- 0,2

Příprava půdy:

38,0 g přípravku bylo naváženo do 1000 ml destilované vody a zahřáto do úplného rozpuštění. Sterilizace byla provedena v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut (32).

2.3 Roztoky a ostatní chemikálie

Fyziologický roztok

- chlorid sodný (dodavatel Ing. P. Lukeš) 8,5 g/l

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

Kyselina mléčná

- acidum lacticum ČL 97 (PENTA farmaceutická divize, Praha)
- $C_3H_6O_3$ Mr 90,08

Hydroxid draselný

- 10g/250 ml

Příprava roztoku – 10 g hydroxidu draselného bylo rozpuštěno v 250 ml destilované vody.

Denaturovaný líh

Pro přípravu všech médií a roztoků byla použita destilovaná voda.

2.4 Použité bakteriální kmeny

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

Escherichia coli

Salmonella typhimurium

Pseudomonas fluorescens

Serratia marcescens

Staphylococcus aureus

Micrococcus luteus

Bacillus subtilis

Bacillus cereus

Bakteriální kmeny byly uchovávány na živné půdě MPA na Petriho miskách. Přeočkovány byly 1 krát za 14 dní. *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus cereus* byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin, *Micrococcus luteus* a *Pseudomonas fluorescens* byly kultivovány při 30 °C, 24 - 48 hodin. Poté byly všechny bakterie uchovávány v chladničce při teplotě 6 °C.

2.5 Použité metody stanovení

2.5.1 Sledování účinku kyseliny mléčné metodou A

Účelem stanovení bylo zjistit účinky kyseliny mléčné na potravinářsky významné, potencionálně patogenní druhy mikroorganismů. Byl sledován počet mikroorganismů v závislosti na koncentraci kyseliny.

Byly použity 1,5%, 2%, 2,5% a 3% (w/v) koncentrace kyseliny mléčné. Bakterie byly kultivovány na živných půdách: Plate Count Agar (PCA) a Endo Agar (EA). Pro kontrolu bylo provedeno stanovení stejným způsobem bez použití kyseliny mléčné (0%).

Pracovní postup:

Na předem připravené, ztužené živné půdy (PCA a EA) bylo rovnoměrně rozetřeno 300 μ l příslušné koncentrace sterilní kyseliny mléčné. Misky byly ponechány v termostatu (při 40 °C, cca 30 min), aby došlo k zaschnutí a vsáknutí kyseliny do média. Po zaschnutí bylo naočkováno 100 μ l příslušného ředění kmene daného mikroorganismu a rovnoměrně rozetřeno po povrchu celé plochy půdy. Po vsáknutí suspenze mikroorganismu, byly takto připravené Petriho misky vloženy do termostatu (37 °C). Po 24 hodinách bylo provedeno odečtení počtu narostlých kolonií (KTJ). Počet buněk byl přepočten na 1 ml vzorku podle vzorce:

$$\text{Počet KTJ /ml} = \text{počet mikroorganismů} * \frac{10}{\text{ředění}}$$

Experimenty byly vždy dvakrát zopakovány.

Touto metodou byl sledován růst *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*.

2.5.2 Sledování účinku kyseliny mléčné metodou B

Podobně jako u předcházející metody byl zjišťován účinek kyseliny mléčné na potravinářsky významné, potenciálně patogenní druhy mikroorganismů.

Byly použity 0,1% až 3% (w/v) koncentrace kyseliny mléčné. Stanovení byla provedena na živných půdách: Plate Count Agar (PCA) a Endo Agar (EA) případně Manitol salt agar (MSA). Pro kontrolu bylo provedeno stanovení stejným způsobem, bez použití kyseliny mléčné (0%).

Metodou B byl sledován vliv kyseliny mléčné na tyto mikroorganismy: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis*.

Pracovní postup:

Do sady Erlenmayerových baněk s 50 ml sterilního masopeptonového bujónu byla za aseptických podmínek přidána 50% (w/v) sterilní kyselina mléčná v takovém množství, aby výsledné koncentrace v bujónech odpovídaly sledovaným koncentracím. Do takto připravených bujónů bylo vyočkováno 500 µl sledovaného, 24 hodin starého, kmene mikroorganismu. Potom proběhla inkubace ve vhodných podmínkách (teplota a čas). Současně byl sledován růst mikroorganismu v bujónu, bez přídavku kyseliny. Po 24 hodinách bylo 100 µl suspenze z takto připravených bujónů vyočkováno na živné půdy s následnou inkubací za stejných podmínek.

Po dalších 24 hodinách bylo provedeno odečítání počtu narostlých kolonií (KTJ), které bylo přepočítáno na 1ml vzorku, podle vzorce:

$$\text{Počet KTJ /ml} = \text{počet mikroorganismů} * \frac{10}{\text{ředění}}$$

Experimenty byly vždy dvakrát zopakovány.

2.5.3 Další použité metody stanovení

U *Escherichia coli*, byl proveden pokus, metodou roztěru (obdobně jako u metody A) na živnou půdu Mueller Hinton Agar (MHA). Tato půda má lepší vlastnosti pro difuzi, tudíž se do ní roztoky kyseliny lépe absorbují.

Pro tento pokus byly zvoleny 2 a 4 % (w/v) koncentrace kyseliny mléčné. Pro srovnání byla souběžně provedena kontrola bez použití kyseliny.

Na ztuženou živnou půdu MHA bylo nanášeno 500 µl roztoku kyseliny mléčné v příslušné koncentraci, které bylo rovnoměrně rozetřeno po povrchu. Poté byla kyselina ponechána 24 hodin zaschnout. Po 24 hodinách bylo na živnou půdu nanášeno a rozetřeno 100 µl bakteriální kultury *E. coli*, v příslušném ředění. Po zaschnutí byly půdy se suspenzí mikroorganismu vloženy do termostatu (při 37 °C). Po 24 hodinách byl odečten počet KTJ a přepočten na 1ml, podle vzorce:

$$\text{Počet KTJ /ml} = \text{počet mikroorganismů} * \frac{10}{\text{ředění}}$$

Pro sledování růstu *Staphylococcus aureus* v přítomnosti roztoku kyseliny mléčné byl proveden pokus, na zjištění inhibičního účinku kyseliny po její neutralizaci hydroxidem draselným, metodou inkubace v bujóněch. Pro tento pokus byly zvoleny 1%, 2% a 3% (w/v) koncentrace kyseliny mléčné.

Kyselina mléčná v příslušných koncentracích v 50 ml masopeptonového bujónu, byla neutralizována hydroxidem draselným. pH bylo sledováno pomocí pH indikátorů. Po její neutralizaci bylo do bujónů přidáno po 500 µl 24 hodiny staré kultury *Staphylococcus aureus*. Následně proběhla inkubace při 37 °C. Současně byl sledován růst *S. aureus* v bujónu, bez přídavku kyseliny. Po 24 hodinách se 100 µl z takto připravených bujónů vyočkovalo na kultivační médium PCA, s následnou inkubací za stejných podmínek.

Po dalších 24 hodinách bylo provedeno odečítání počtu narostlých kolonií (KTJ), které bylo přepočítáno na 1ml vzorku, podle vzorce:

$$\text{Počet KTJ /ml} = \text{počet mikroorganismů} * \frac{10}{\text{ředění}}$$

2.5.4 Metody identifikace bakteriálních kmenů

2.5.4.1 ENTEROtest

Pro doplnění a charakterizaci sledovaných enterobakterií, byl u *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* a *Escherichia coli* proveden ENTEROtest.

Souprava ENTEROtest 24 je určena k identifikaci významných druhů střevních bakterií pomocí 24 biochemických testů. Testy jsou umístěny v jamkách mikrotitrační destičky, vždy tři řady po osmi jamkách.

Pracovní postup:

Po 24 hodinové kultivaci čisté kultury bakteriálního kmene na živném mediu MPA, byla z 1 až 2 kolonií mikroorganismu připravena suspenze ve fyziologickém roztoku. Suspenze byla důkladně zhomogenizována. Do všech jamek příslušných 3 řad destičky bylo inokulováno 100 µl suspenze a k jamkám testů: indol, sirovodík, lysin, ornithin, ureáza, arginin byl přidán parafinový olej k zajištění anaerobního prostředí. Pak byla destička vložena do PE sáčku a následně proběhla inkubace v temostatu při 37 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby byly jamky testů indol, acetoin a fenylalanin zakapány příslušnými činidly. Pro hodnocení barevných reakcí byla použita barevná srovnávací stupnice pro soupravu ENTEROtest 24. Identifikace byla provedena pomocí identifikačního programu (TNW Lite, verze 6.5.).

2.5.4.2 STAPHYtest

Pro biochemickou charakterizaci, byl u *Staphylococcus aureus* a *Micrococcus luteus* proveden identifikační test. Souprava STAPHYtest 16 je určena pro identifikaci zástupců rodu *Staphylococcus* a dalších grampozitivních koků.

Pracovní postup:

Po 24 hodinové kultivaci čisté kultury bakteriálního kmene, na živném mediu MPA, byla z 1 až 2 kolonií připravena suspenze ve fyziologickém roztoku.

Suspenze byla důkladně zhomogenizována. Do všech jamek destičky bylo inokulováno 100 µl suspenze. K jamkám testů: ureáza, arginin a ornithin byl přidán parafinový olej. Pak byla destička vložena do PE sáčku a následně proběhla inkubace v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby byly jamky testů nitráty a fosfatáza, zakapány příslušnými činidly. Pro hodnocení barevných reakcí byla použita barevná srovnávací stupnice pro soupravu STAPHYtest 16. Identifikace byla provedena pomocí identifikačního programu (TNW Lite, verze 6.5.).

2.5.5 Statistické vyhodnocení účinků kyseliny mléčné na studované mikroorganismy

Statistické hodnocení výsledků bylo provedeno pomocí statistického programu STATVYD verze 2.0 beta (autoři Buňka F., Kříž O., Hrabě J.). Tento program umožňuje zpracovávat data ve známém prostředí Microsoft Excel a je určen běžným uživatelům statistiky jako podpora vyhodnocování dat získaných v konkrétních reálných situacích.

Pro hodnocení byl vybrán modul analýzy rozptylu. Modul analýza rozptylu zahrnuje jednofaktorovou analýzu rozptylu pro nezávislé výběry. K vyhodnocení experimentů byla zvolena neparametrická analýza, protože zde lze zadat 3 až 20 výběrových souborů, přičemž každý z výběrových souborů může zahrnovat až 200 dat. První analýzou (Wilcoxonův test) software vyhodnotí, zda se hypotéza o shodě hodnot přijímá nebo zamítá. Pokud je hypotéza zamítnuta, je vhodné se zabývat tím, které soubory se od sebe liší (Kruskall-Wallisův test). Oba testy byly hodnoceny na hladině významnosti 5 % (to znamená, že byla 5% pravděpodobnost toho, že zamítneme platnou hypotézu).

Wilcoxonovým testem byly porovnávány účinky jednotlivých koncentrací kyseliny mléčné s kontrolou, u každého z testovaných mikroorganismů. Kruskall-Wallisovým testem byly u každého mikroorganismu porovnávány inhibiční účinky mezi jednotlivými koncentracemi kyseliny mléčné. Dále byl tímto testem porovnáván účinek 0,1% koncentrace kyseliny na všechny mikroorganismy.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Vyhodnocení identifikačních testů

Na základě výsledků ENTEROtestů a STAPHYtestů (Příloha č. 1 a Příloha č. 2), byla provedena identifikace a zároveň biochemická charakterizace u následujících bakterií: *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Micrococcus luteus* pomocí počítačového identifikačního programu (TNW Lite, verze 6.5.). Touto identifikací bylo potvrzeno, že se jedná o typické zástupce těchto mikroorganismů.

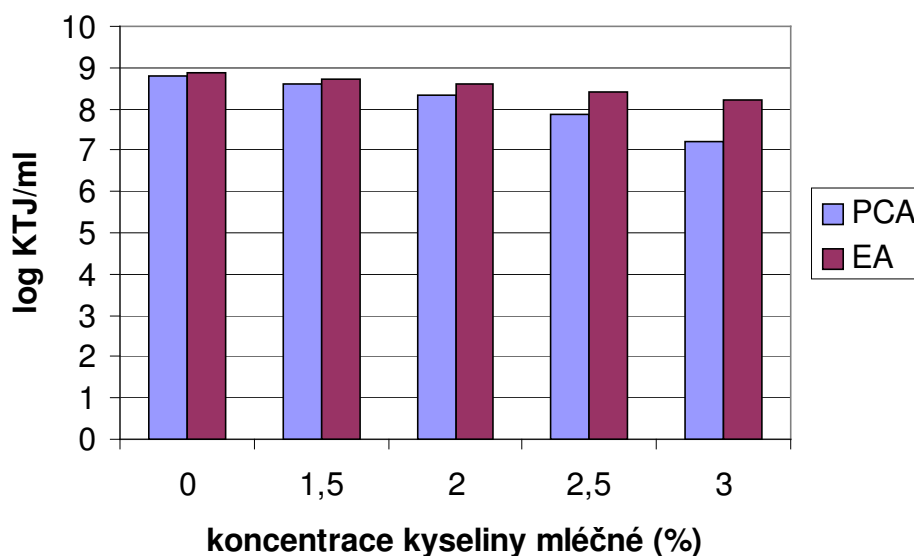
3.2 Sledování účinku kyseliny mléčné na *Escherichia coli*

Vliv kyseliny mléčné na kmen *Escherichia coli* byl zkoumán metodou roztěru (metoda A) na živých půdách PCA, EA a MHA. Na základě výsledků těchto stanovení, byl pokus zopakován metodou B.

Metodou A, aplikovanou na živnou půdu PCA, bylo zjištěno, že ani 3% koncentrace kyseliny mléčné nezpůsobuje absolutní inhibici růstu této bakterie. Výsledky uvedené níže (Tabulka č. 1 a Obrázek č. 3), sice dokazují, že se vzrůstající koncentrací kyseliny mléčné, dochází k úbytku počtu KTJ *E. coli*, ale pouze v malé míře. Při nejvyšší použité koncentraci (3%) kyseliny mléčné, byl zjištěn úbytek ve srovnání s kontrolou pouze o 1 řád.

Tabulka č. 1: Vliv kyseliny mléčné na růst *E. coli* na PCA – metoda A

Koncentrace kyseliny mléčné	Průměrný počet KTJ v 1ml
0 % - Kontrola	$6,5 \cdot 10^8$
1,5%	$4,2 \cdot 10^8$
2%	$2,2 \cdot 10^8$
2,5%	$7,4 \cdot 10^7$
3%	$1,6 \cdot 10^7$



Obrázek č. 3: Graf závislosti počtu KTJ *E.coli* na koncentraci kyseliny mléčné, porovnání výsledků zjištěných na obou médiích - metoda A

Tabulka č. 2: Vliv kyseliny mléčné na růst *E. coli* na EA – metoda A

Koncentrace kyseliny mléčné	Průměrný počet KTJ v 1ml
0 % - Kontrola	$7,8 \cdot 10^8$
1,5%	$5,1 \cdot 10^8$
2%	$3,9 \cdot 10^8$
2,5%	$2,6 \cdot 10^8$
3%	$1,6 \cdot 10^8$

Obrázek č. 3 a Tabulka č. 2, uvádějí výsledky zjištěné metodou A na živné půdě EA. Z těchto výsledků vyplývá, že kyselina mléčná měla na *E. coli* inhibiční vliv jen ve velmi malé míře. Při použití 3% koncentrace kyseliny, nedošlo v tomto případě ke snížení počtu KTJ oproti kontrole ani o jeden řád.

Toto kultivační médium bylo vlivem vysoké kyselosti použitých koncentrací kyseliny odbarvováno a bakterie rostly pouze při okrajích Petřino misek (viz. Příloha č. 5). Z výsledků výše uvedených tabulek a obrázků, je patrné, že na živné půdě EA se *Escherichia coli* množí více, než na PCA, ale inhibiční účinek kyseliny je o něco nižší, což bude nejspíše způsobeno odlišným složením živných médií.

Při statistickém porovnávání dvojic koncentrací kyseliny mléčné (Wilcoxonův test, hladina významnosti 5%) bylo zjištěno, že mezi inhibičními

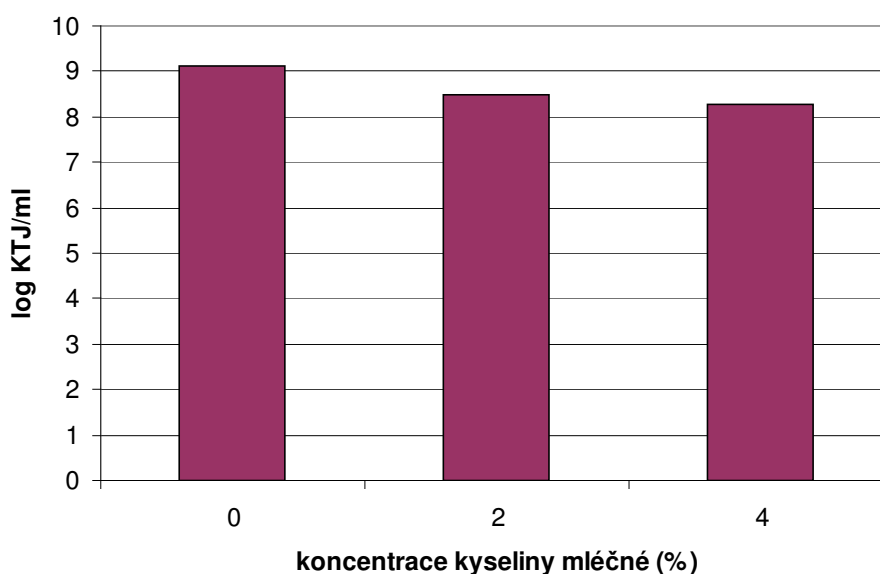
účinky 1,5%, 2% a 2,5% koncentracemi kyseliny nejsou statisticky významné rozdíly. Účinek těchto koncentrací kyseliny na růst *E. coli* byl tedy shodný.

Vzhledem ke zjištěnému nízkému inhibičnímu účinku kyseliny mléčné byla pro pokus metodou roztěru použita také živná půda Mueller Hinton Agar (MHA), do které by měla kyselina lépe difundovat a tudíž by mělo dojít ke zvýšení inhibičního účinku kyseliny.

Bylo však zjištěno (Tabulka č. 4 a Obrázek č. 5), že ani při použití této půdy nedochází k růstu mikroorganismů v místě kde byla kyselina nanesena. Kolonie rostou pouze v místě, kde byla kyselina nedokonale rozetřena (při okrajích Petriho misky) viz. (Příloha č. 7). Inhibiční účinek kyseliny mléčné na *E. coli* není ani v tomto případě příliš výrazný. Aplikací 4% kyseliny došlo ke snížení počtu KTJ pouze o jeden řád.

Tabulka č. 3: Vliv kyseliny mléčné na růst *E. coli* na MHA – metoda A

Koncentrace kyseliny mléčné (%)	Průměrný počet KTJ v 1ml
0 - kontrola	$1,4 \cdot 10^9$
2	$3 \cdot 10^8$
4	$1,9 \cdot 10^8$



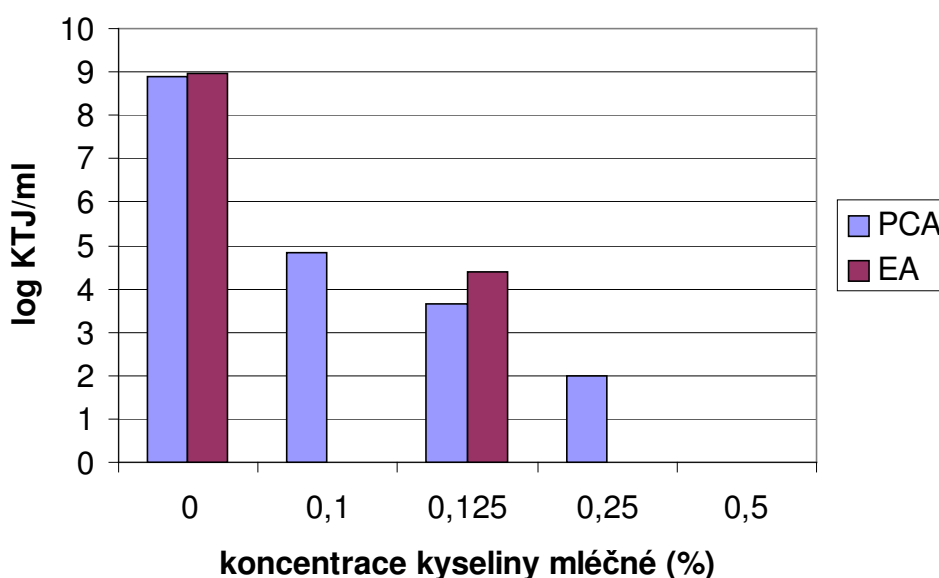
Obrázek č. 4: Graf závislosti počtu KTJ *E. coli* na koncentraci kyseliny mléčné na živné půdě MHA

Metoda A byla shledána nevhodnou k dalším experimentům, jelikož vlivem vysoké kyselosti kyseliny docházelo v přítomnosti pH indikátoru v médiu k odbarvení živné půdy EA a u všech tří půd docházelo v místě nanesení kyseliny k úplné inhibici růstu kolonií. Ty pak rostly pouze při okraji Petriho misky, kde byla kyselina špatně rozetřena, viz. příloha (Příloha č. 5, Příloha č. 6 a Příloha č. 7). Proto bylo stanovení zopakováno metodou B.

Na základě výsledků zjištěných metodou A, byly pro stanovení inhibičního účinku kyseliny mléčné na *Escherichia coli* metodou B, nejprve použity 1%, 2% a 3% koncentrace. Tato metoda však prokázala, že jsou tyto koncentrace příliš vysoké a k rozvoji *E. coli* nedochází. Z tohoto důvodu byly pro další stanovení zvoleny koncentrace nižší – od 0,1% do 1%. Experiment byl opět proveden na kultivačních médiích PCA a EA.

Tabulka č. 4: Vliv kyseliny mléčné na růst *E. coli* na PCA – metoda B

Koncentrace kyseliny mléčné (%)	Průměrný počet KTJ v 1ml	Směrodatná odchylka
0 - kontrola	$8 \cdot 10^8$	$9,6 \cdot 10^7$
0,1	$6,6 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^3$
0,125	$4,4 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$
0,25	100	21
0,5	0	0
0,75	0	0
1	0	0



Obrázek č. 5: Graf závislosti počtu KTJ *E.coli* na koncentraci kyseliny mléčné, porovnání výsledků zjištěných na obou médiích – metoda B

Z výsledků uvedených v tabulce (Tabulka č. 4) a obrázku (Obrázek č. 5) vyplývá, že se zvyšující se koncentrací kyseliny mléčné dochází ke snižování počtu KTJ *E. coli* na kultivačním médiu PCA. Při nejnižší použité koncentraci kyseliny (0,1%), došlo ve srovnání s kontrolou ke snížení počtu KTJ až o 4 řády. K úplné inhibici *E. coli* došlo při 0,5 % koncentraci.

Inhibiční účinek kyseliny mléčné na růst *Escherichia coli* byl zkoumán metodou B, také na živné půdě EA.

Z výsledků tabulky (Tabulka č. 5) a obrázku (Obrázek č. 5), vyplývá, že se zvyšující se koncentrací kyseliny mléčné dochází ke snižování počtu KTJ *E. coli*. V tomto případě došlo k její úplné inhibici již při 0,25% koncentraci kyseliny, počet KTJ *E. coli* se ve srovnání s kontrolou snížil o 8 řádů.

Tabulka č. 5: Vliv kyseliny mléčné na růst *E. coli* na EA – metoda B

Koncentrace kyseliny mléčné (%)	Průměrný počet KTJ v 1ml	Směrodatná odchylka
0 - kontrola	$9 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$
0,125	$2,4 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^3$
0,25	0	0
0,5	0	0
0,75	0	0
1	0	0

Statistickým hodnocením Kruskal-Wallisovým testem při 5% hladině významnosti bylo v případě obou půd zjištěno, že mezi antibakteriálními účinky jednotlivých koncentrací kyseliny mléčné na *E. coli* existují statisticky významné rozdíly.

Další statistickou metodou – porovnáváním dvojic Wilcoxonovým testem (porovnávání účinku 2 koncentrací kyseliny) bylo zjištěno, že mezi účinky všech koncentrací kyseliny mléčné a kontrolou, rovněž i mezi jednotlivými koncentracemi existují statisticky významné rozdíly.

Greer a Dilts (10) ve své práci uvádějí, že při aplikaci 3 % roztoku kyseliny mléčné na povrch masa dochází k redukci růstu *E. coli* o řád CFU/ml, při teplotě 55°C, ale při 20°C byl tento roztok bez účinku. Autoři však sledovali přirozené kontaminanty v běžném prostředí, proto se jejich výsledky neshodují s výsledky dosaženými v této studii, která byla zaměřena na laboratorní kmeny bakterií, které nebyly získány z prostředí potravinářského provozu.

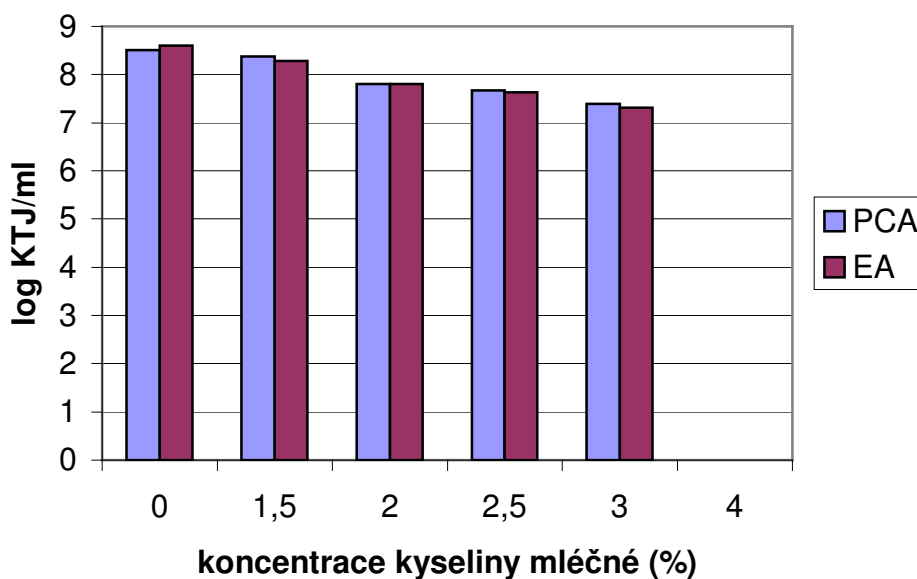
3.3 Sledování účinku kyseliny mléčné na *Salmonella typhimurium*

Stejně jako u *Escherichia coli* proběhlo zkoumání inhibičního účinku kyseliny mléčné na *Salmonella typhimurium* metodou roztěru (metoda A) na živné půdy PCA a EA. Vzhledem k výsledkům těchto stanovení (Obrázek č. 6, Tabulka č. 6 a Tabulka č. 7), byl pokus zopakován metodou B - inkubací v bujónech a následným vyočkováním na živná media PCA a EA.

Z níže uvedených výsledků (Obrázek č. 6 a Tabulka č. 6), je zřejmé, že metodou roztěru, obdobně jako u *E. coli*, nedochází k výrazné inhibici salmonely ani při aplikaci nejvyšší sledované koncentrace (3%) kyseliny mléčné. Při této koncentraci se počet buněk snížil pouze desetkrát.

Tabulka č. 6: Vliv kyseliny mléčné na růst *S. typhimurium* na PCA – metoda A

Koncentrace kyseliny mléčné	Průměrný počet KTJ v 1ml
0 % - Kontrola	$3,2 \cdot 10^8$
1,5%	$2,4 \cdot 10^8$
2%	$6,3 \cdot 10^7$
2,5%	$4,7 \cdot 10^7$
3%	$2,5 \cdot 10^7$



Obrázek č. 6: Graf závislosti počtu KTJ *S. typhimurium* na koncentraci kyseliny mléčné, porovnání výsledků zjištěných na obou médiích - metoda A

Vzhledem k výsledkům předchozích testů, byla pro další stanovení použita 4% kyselina mléčná. Jejím působením již došlo k absolutní inhibici růstu *S. typhimurium*. Její inhibiční účinek byl ve srovnání s účinkem 3% koncentrace kyseliny velmi vysoký, došlo ke snížení počtu KTJ salmonely o 7 řádů a ve srovnání s kontrolou o 8 řádů (Obrázek č. 6 a Tabulka č. 7).

Tabulka č. 7: Vliv kyseliny mléčné na růst *S. typhimurium* na EA – metoda A

Koncentrace kyseliny mléčné	Průměrný počet KTJ v 1ml
0 % - Kontrola	$4 \cdot 10^8$
1,5%	$1,9 \cdot 10^8$
2%	$6,3 \cdot 10^7$
2,5%	$4,3 \cdot 10^7$
3%	$2,1 \cdot 10^7$
4%	0

Statistickým hodnocením těchto výsledků Kruskal-Wallisovým a Wilcoxonovým testem (porovnáváním dvojic) bylo na hladině významnosti 5 % zjištěno, že statistické rozdíly existují mezi kontrolou a inhibičním účinkem pouze 2,5% a 3% kyseliny mléčné, na kultivačním médiu PCA. Při použití Endova agaru bylo statistickým hodnocením výsledků zjištěno, že inhibiční účinek kyseliny se neliší mezi 1,5% a 2% koncentrací, a také mezi 2,5% a 3% koncentrací kyseliny mléčné. U ostatních koncentrací byl účinek kyseliny na růst bakterií statisticky odlišný.

Vzhledem ke zjištěnému velmi nízkému antibakteriálnímu účinku téměř všech použitých koncentrací kyseliny mléčné, byla minimální inhibiční koncentrace kyseliny zjišťována rovněž metodou B.

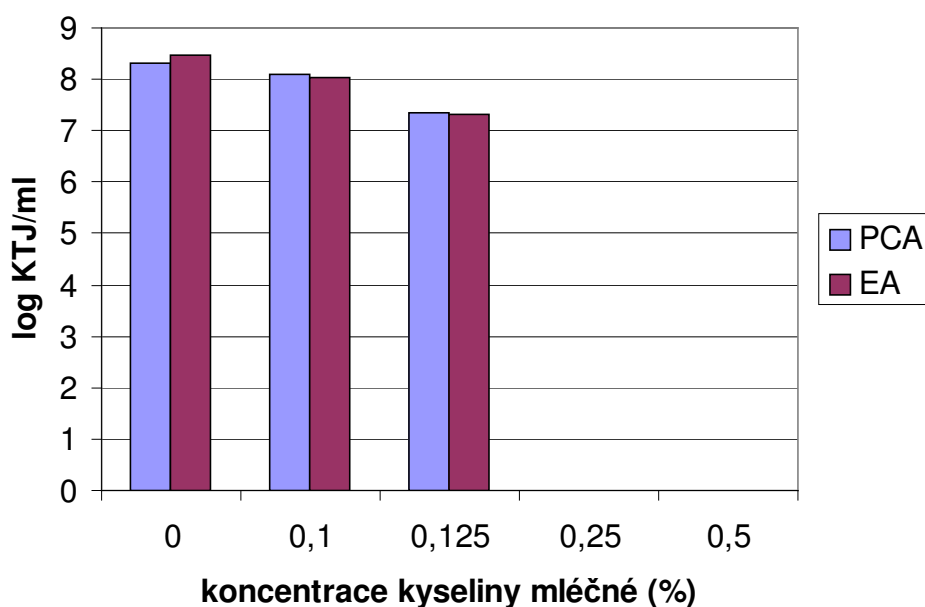
Pro stanovení byl použit kmen *S. typhimurium* po 24 hodinové kultivaci v masopeptonovém bujónu. Stanovení byla provedena inkubací v bujónech s následným očkováním na živné půdy PCA a EA.

Také v tomto případě nejdříve proběhlo stanovení s příliš vysokými koncentracemi kyseliny mléčné (1 – 3%), které měly v případě metody B prokazatelný inhibiční účinek a nedocházelo k rozvoji daného kmene

S. typhimurium. Proto byly pro další stanovování použity koncentrace kyseliny od 0,1 do 1%.

Tabulka č. 8: Vliv kyseliny mléčné na růst *S. typhimurium* na PCA – metoda B

Koncentrace kyseliny mléčné (%)	Průměrný počet KTJ v 1ml	Směrodatná odchylka
0 - kontrola	$2,1 \cdot 10^8$	$5,9 \cdot 10^7$
0,1	$1,3 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^7$
0,125	$2,3 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^6$
0,25	0	0
0,5	0	0
0,75	0	0
1	0	0



Obrázek č. 7: Graf závislosti počtu KTJ *S. typhimurium* na koncentraci kyseliny mléčné, porovnání výsledků zjištěných na obou médiích - metoda B

Z výsledků uvedených v tabulce a grafu (Tabulka č. 8 a Obrázek č. 7) vyplývá, že kyselina mléčná působí antibakteriálně na daný kmen salmonely již při 0,25% koncentraci. Při této koncentraci dochází ke snížení KTJ až o 8 řádů, ve srovnání s kontrolou. Nejnižší použitá koncentrace (0,1%) měla slabý inhibiční účinek, počet mikroorganismů byl v jejím případě, ve srovnání s kontrolou, snížen pouze dvakrát.

Antibakteriální účinek kyseliny mléčné na *S. typhimurium*, byl dále sledován metodou B na živné půdě EA. Na této půdě, jak ukazují tabulka a obrázek (Tabulka č. 9, Obrázek č. 7), byl při 0,1% koncentraci zaznamenán nepatrný pokles růstu

S. typhimurium. Při této koncentraci došlo ke snížení počtu KTJ asi třikrát. Z výsledků je patrné, že k absolutní inhibici růstu *S. typhimurim* dochází již při aplikaci 0,25% koncentrace kyseliny mléčné.

Tabulka č. 9: Vliv kyseliny mléčné na růst *S. typhimurium* na EA – metoda B

Koncentrace kyseliny mléčné (%)	Průměrný počet KTJ v 1ml	Směrodatná odchylka
0 – kontrola	$3,1 \cdot 10^8$	$6,3 \cdot 10^7$
0,1	$1,1 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^7$
0,125	$2,3 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^6$
0,25	0	0
0,5	0	0
0,75	0	0
1	0	0

Metodou B bylo zjištěno, že působení 0,1 % koncentrace kyseliny mléčné na *S. typhimurium* je zcela bez efektu. Ve všech provedených testech nedošlo ke snížení počtu KTJ ani o 1 řád. Dále je z těchto výsledků zřejmé, že již 0,25% kyselina mléčná zcela zastavuje růst *S. typhimurium* (Obrázek č. 7, Tabulka č. 8, Tabulka č. 9).

Podle statistického hodnocení výsledků, které bylo provedeno Kruskal-Wallisovým a Wilcoxonovým testem na 5% hladině významnosti byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi inhibičními účinky všech koncentrací kyseliny mléčné na salmonelu na obou použitých živných půdách.

Podle studie Van Netten a kol. (28) je 2% roztok kyseliny mléčné při 37 °C schopen eliminovat růst salmonel na povrchu vepřového masa. Anderson a kol. (2) uvádějí, že aplikací kyseliny mléčné a horké vody na hovězí maso došlo během chladírenského skladování ke snížení počtu salmonel průměrně o 1 řád. Tyto studie sledovaly účinek kyseliny na přirozené kontaminanty masa, proto se neshodují s výsledky této práce, která byla zaměřena na laboratorní kmeny bakterií.

Na základě výsledků všech dosud provedených stanovení, bylo rozhodnuto, že pro sledování vlivu kyseliny mléčné na ostatní bakteriální kmeny bude použita pouze metoda B – inkubace v bujonech s následným vyočkováním na vhodná média. Tato metoda byla ve srovnání s metodou A prokazatelně přesnější. Sledované bakterie rostly na živných půdách rovnoměrněji a nedocházelo k vedlejším účinkům kyseliny mléčné na použitá média.

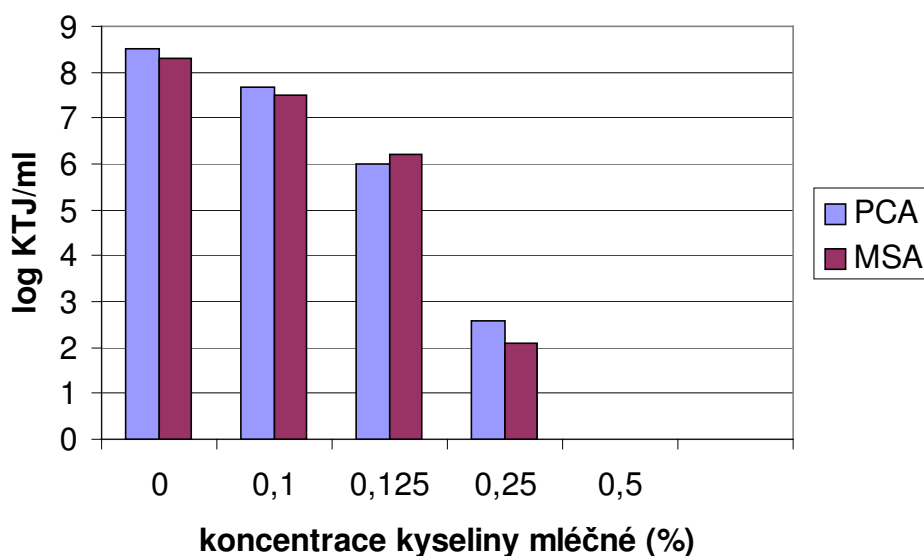
3.4 Sledování účinku kyseliny mléčné na *Staphylococcus aureus*

Vzhledem ke zjištěným nízkým inhibičním koncentracím kyseliny mléčné na *S. typhimurium* a *E. coli*, byl sledován vliv této kyseliny na *Staphylococcus aureus* v rozmezí koncentrací kyseliny již od 0,1 % do 1%.

Stanovení bylo provedeno pouze metodou B, na kultivačních médiích PCA a MSA. Pro stanovení byla použita kultura *S. aureus* po 24 hodinové kultivaci v masopeptonovém bujónu při 37 °C. Stanovení bylo zopakováno třikrát.

Tabulka č. 10: Vliv kyseliny mléčné na růst *S. aureus* na obou kultivačních půdách – metoda B

Koncentrace kyseliny mléčné (%)	Průměrný počet KTJ v 1ml na PCA	Směrodatná odchylka - PCA	Průměrný počet KTJ v 1ml na MSA	Směrodatná odchylka - MSA
0 – kontrola	$3,3 \cdot 10^8$	$9,8 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$	$7,9 \cdot 10^7$
0,1	$4,6 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^7$	$7,8 \cdot 10^6$
0,125	$1,0 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^5$
0,25	380	140	120	37
0,5	0	0	0	0
0,75	0	0	0	0
1	0	0	0	0



Obrázek č. 8: Graf závislosti počtu KTJ *S. aureus* na koncentraci kyseliny mléčné, porovnání výsledků zjištěných na obou médiích - metoda B

Z výsledků uvedených výše (Tabulka č. 10, Obrázek č. 8) je zřejmé, že působením kyseliny mléčné na *S. aureus*, dochází k inhibici jeho růstu. I při nejnižší použité koncentraci (0,1%), došlo k mírnému snížení počtu KTJ (o jeden řád). Bylo zjištěno, že působením 0,25% kyseliny dochází již k velmi nízkému rozvoji této bakterie a 0,5% koncentrace způsobuje absolutní inhibici jejího růstu.

Za stejných podmínek byl sledován vliv kyseliny mléčné na růst *S. aureus* na živné půdě MSA. Výsledky z tohoto experimentu uvádí také Tabulka č. 10 a Obrázek č. 8, z kterých je patrné, že již působením 0,1% kyseliny mléčné dochází ke zpomalení rozvoje bakterie. Při aplikaci 0,25% koncentrace dochází pouze k nepatrnému růstu *S. aureus* a jeho rozvoj je zcela zastaven při koncentraci 0,5%.

Statistickým hodnocením získaných hodnot Kruskal-Wallisovým a Wilcoxonovým testem (u obou testů na hladině významnosti 5 %) bylo zjištěno, že mezi antibakteriálními účinky jednotlivých koncentrací kyseliny mléčné na *S. aureus* existují statisticky významné rozdíly na obou použitých médiích.

Vzhledem k dosavadním výsledkům byl pro sledování růstu *Staphylococcus aureus* v roztoku kyseliny mléčné proveden pokus na zjištění inhibičního účinku kyseliny po její neutralizaci hydroxidem draselným. Pro tento pokus byly zvoleny

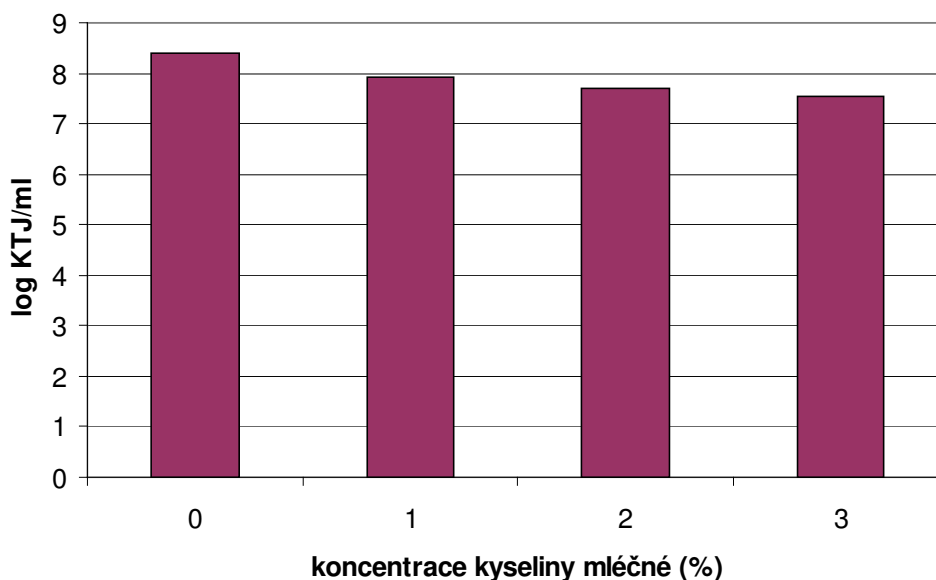
1%, 2% a 3% koncentrace kyseliny mléčné, stanovení bylo provedeno inkubací v bujónech s následným vyočkováním na živnou půdu PCA. Pro kontrolu byl současně sledován růst bakterie v bujónu bez kyseliny.

Bylo zjištěno (Obrázek č. 9 a Tabulka č. 11), že po neutralizaci kyseliny mléčné dochází k intenzivnímu rozvoji *S. aureus* i při 3% koncentraci kyseliny. Tato koncentrace snížila počet kolonií oproti kontrole, která kyselinu mléčnou neobsahovala, pouze o 1 řád.

Dále bylo zjištěno, že u sledovaných koncentrací není téměř žádný rozdíl v počtu narostlých kolonií. Z těchto důvodů se tento pokus vícekrát neopakoval.

Tabulka č. 11: Účinek kyseliny mléčné po neutralizaci na *S. aureus* na živné půdě PCA

Koncentrace kyseliny mléčné (%)	Průměrný počet MO v 1ml (KTJ/ml)
0	$2,5 \cdot 10^8$
1	$8,5 \cdot 10^7$
2	$5 \cdot 10^7$
3	$3,5 \cdot 10^7$



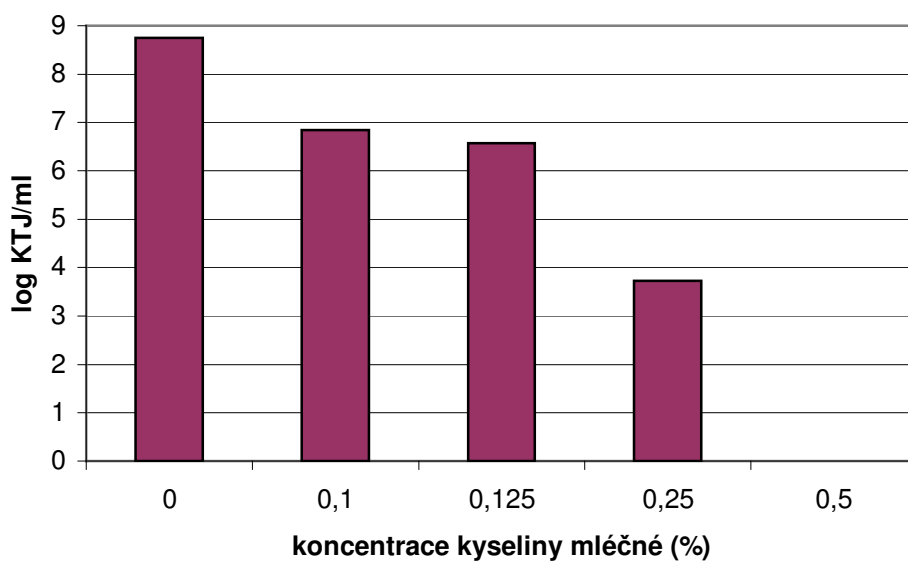
Obrázek č. 9: Graf závislosti počtu KTJ *S. aureus* na koncentraci kyseliny mléčné – po její neutralizaci na živné půdě (PCA)

3.5 Sledování účinku kyseliny mléčné na *Pseudomonas fluorescens*

Pro další stanovení byla použita bakterie *Pseudomonas fluorescens*, která byla kultivována 24 hodin při 30 °C. Na základě výsledků z předchozích experimentů, byla pro stanovení zvolena metoda B a koncentrace kyseliny mléčné od 0,1% do 1%. Kultivace této bakterie v bujónech s jednotlivými koncentracemi kyseliny proběhla rovněž při 30 °C po dobu 24 hodin. Za stejných podmínek byla provedena kultivace *Pseudomonas* na živné půdě PCA, na kterou bylo naočkováno 100 µl suspenze z těchto bujónů. Současně byl sledován růst bakteriální kultury v bujónu bez přídavku kyseliny mléčné. Stanovení bylo 3 krát zopakováno.

Tabulka č. 12: Vliv kyseliny mléčné na růst *P. fluorescens* na PCA – metoda B

Koncentrace kyseliny mléčné (%)	Průměrný počet MO v 1ml	Směrodatná odchylka
0	$5,6 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$
0,1	$7 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^5$
0,125	$3,7 \cdot 10^6$	$8,1 \cdot 10^5$
0,25	$5,4 \cdot 10^3$	$5,1 \cdot 10^3$
0,5	0	0
0,75	0	0
1	0	0



Obrázek č. 10: Graf závislosti počtu KTJ *P. fluorescens* na koncentraci kyseliny mléčné na PCA – metoda B

Bylo zjištěno, že již při 0,1% koncentraci kyseliny mléčné dochází ke snížení počtu KTJ *Pseudomonas fluorescens* o 2 řády oproti kontrole. Velmi podobný účinek měla také 0,125% koncentrace (Tabulka č. 12 a Obrázek č. 10). Dalším zvyšováním koncentrace kyseliny došlo k prudšímu zpomalení růstu. Dále bylo prokázáno, že k zastavení růstu tohoto bakteriálního kmene dochází při aplikaci 0,5% kyseliny mléčné.

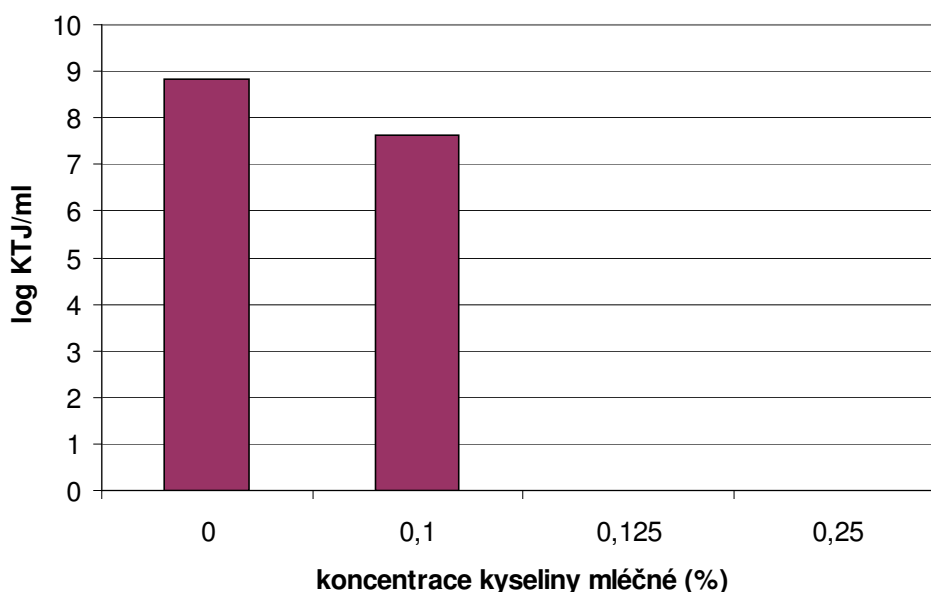
Podle statistického hodnocení výsledků, které bylo provedeno stejným způsobem jako u předešlých bakterií, byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi inhibičními účinky na růst *P. fluorescens* u všech použitých koncentrací kyseliny mléčné.

3.6 Sledování účinku kyseliny mléčné na *Serratia marcescens*

Dalším mikroorganismem, na kterém byl sledován antibakteriální účinek kyseliny mléčné, byla *Serratia marcescens*. Také toto stanovení bylo provedeno metodou B, na 24 hodiny starém bakteriálním kmeni. Kultivace bakterie proběhla v masopeptonovém bujónu při 37 °C. Po 24 hodinové kultivaci v bujónech se zvolenými koncentracemi kyseliny mléčné (0,1 – 1%), bylo provedeno očkování 100 µl suspenze z těchto bujónů na živnou půdu PCA s následnou inkubací v termostatu při 37 °C. Toto stanovení bylo 3 krát zopakováno.

Tabulka č. 13: Vliv kyseliny mléčné na růst *S. marcescens* na PCA – metoda B

Koncentrace kyseliny mléčné (%)	Průměrný počet KTJ v 1ml	Směrodatná odchylka
0 - kontrola	$6,9 \cdot 10^8$	$9,7 \cdot 10^7$
0,1	$4,2 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^7$
0,125	0	0
0,25	0	0
0,5	0	0
0,75	0	0
1	0	0



Obrázek č. 11: Graf závislosti počtu KTJ *S. marcescens* na koncentraci kyseliny mléčné na PCA – metoda B

Z průměrných hodnot výsledků uvedených v tabulce a grafu (Obrázek č. 11, Tabulka č. 13) je patrné, že při kultivaci *S. marcescens* při 37 °C, po dobu 24 hodin, bez použití kyseliny mléčné, dochází k jejímu nárůstu v množství $6,9 \cdot 10^8$ KTJ. Působením 0,1% kyseliny došlo ke snížení počtu buněk desetkrát. Avšak již aplikací 0,125% kyseliny mléčné dochází k úplné inhibici růstu *S. marcescens*.

Statistickým hodnocením, které bylo opět provedeno Kruskal-Wallisovým a Wilcoxonovým testem (na 5% hladině významnosti), bylo zjištěno, že mezi stanovenými počty KTJ *S. marcescens* ve všech roztocích kyseliny mléčné existují statisticky významné rozdíly.

3.7 Sledování účinku kyseliny mléčné na *Micrococcus luteus*

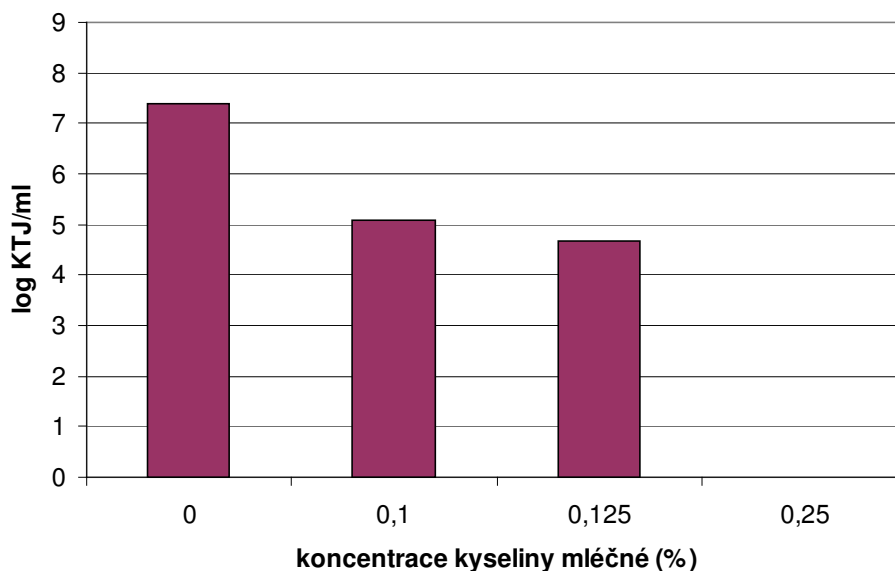
Metodou B na živné půdě PCA byl rovněž sledován antibakteriální účinek kyseliny mléčné na *Micrococcus luteus*. Také k tomuto experimentu byla použita 24 hodiny stará čistá kultura kultivovaná v masopeptonovém bujónu, při 30 °C. Po přeočkování 500 μ l této kultury do 50 ml bujónů se zvolenými koncentracemi kyseliny mléčné (0,1 až 1%) proběhla její inkubace (24 hodin při 30 °C). Po zaočkování 100 μ l suspenze z takto připravených bujónů na živnou půdu PCA

proběhla kultivace, po dobu 48 hodin při 30 °C. Současně proběhlo stanovení v bujónu bez kyseliny.

Výsledky stanovení jsou uvedeny níže (Tabulka č. 14, Obrázek č. 12) Z těchto výsledků vyplývá, že aplikací 0,25% kyseliny mléčné dochází k absolutní inhibici růstu tohoto kmene *M. luteus*, který bez použití kyseliny vykazoval nárůst $2,5 \cdot 10^7$ KTJ. Z výsledků je také patrné, že použitím 0,1% koncentrace dochází k poklesu KTJ až o 2 řády, v porovnání s kontrolou.

Tabulka č. 14: Vliv kyseliny mléčné na růst *M. luteus* na PCA – metoda B

Koncentrace kyseliny mléčné (%)	Průměrný počet MO v 1ml	Směrodatná odchylka
0 - kontrola	$2,5 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$
0,1	$1,2 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^4$
0,125	$4,7 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^4$
0,25	0	0
0,5	0	0
0,75	0	0
1	0	0



Obrázek č. 12: Graf závislosti počtu KTJ *M. luteus* na koncentraci kyseliny mléčné na PCA – metoda B

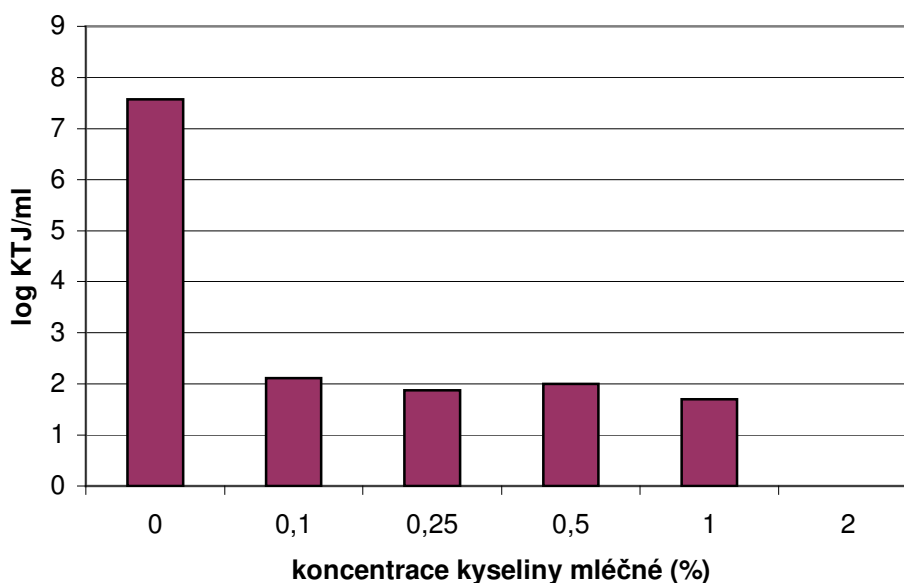
Statistickým hodnocením Kruskal-Wallisovým a Wilcoxonovým testem (hladina významnosti 5 %) bylo zjištěno, že mezi stanovenými počty KTJ *M. luteus* ve sledovaných koncentracích kyseliny mléčné existují statisticky významné rozdíly.

3.8 Sledování účinku kyseliny mléčné na *Bacillus cereus*

Dále byl metodou B s následným vyočkováním na živnou půdu PCA sledován inhibiční účinek kyseliny mléčné na *Bacillus cereus*. 500 µl 24 hodin staré, čisté kultury *Bacillus cereus*, bylo očkováno do několika Erlenmayerových baněk s 50 ml masopeptonového bujónu se sledovanými koncentracemi kyseliny mléčné (0,1 až 2%). Poté byly baňky vloženy do termostatu při 37 °C a inkubovány. Současně bylo pro kontrolu provedeno stanovení v bujónu bez kyseliny. Po 24 hodinách bylo 100 µl suspenze z těchto bujónů naočkováno na živnou půdu PCA s následnou inkubací při 37 °C po dobu 24 hodin.

Tabulka č. 15: Vliv kyseliny mléčné na růst *B. cereus* na PCA – metoda B

Koncentrace kyseliny mléčné (%)	Průměrný počet MO v 1ml	Směrodatná odchylka
0 - kontrola	$3,7 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$
0,1	$1,3 \cdot 10^2$	55,4
0,25	80	18,9
0,5	100	66,8
0,75	50	7,1
1	50	26,0
2	0	0



Obrázek č. 13: Graf závislosti počtu KTJ *B. cereus* na koncentraci kyseliny mléčné na živné půdě PCA – metoda B

Výsledky uvedené v tabulce a grafu (Obrázek č. 13, Tabulka č. 15) ukazují, že aplikací 0,1% kyseliny mléčné, dochází k výraznému poklesu KTJ *Bacillus cereus* až o 5 řádů oproti kontrole. Při použití koncentrací (0,25 – 1%), které měly vysoké antibakteriální účinky na ostatní sledované druhy mikroorganismů, dochází stále k růstu malého množství buněk této bakterie. Aplikací 0,5% kyseliny, došlo dokonce k nepatrnému zvýšení nárůstu počtu buněk, oproti předchozí koncentraci. Proto byla pro stanovení použita také 2% koncentrace kyseliny, která rozvoj bacilu zastavila.

Statistickým hodnocením stanovených hodnot dle Kruskal-Walisova a Wilcoxonova testu (porovnáváním dvojic), bylo zjištěno, že statisticky významné rozdíly na hladině významnosti 5 % existují mezi kontrolou a inhibičními účinky všech použitých koncentrací kyseliny mléčné, dále také mezi antibakteriálním účinkem 0,1% a 0,75% kyseliny, a mezi 0,1% a 1% koncentrací kyseliny mléčné.

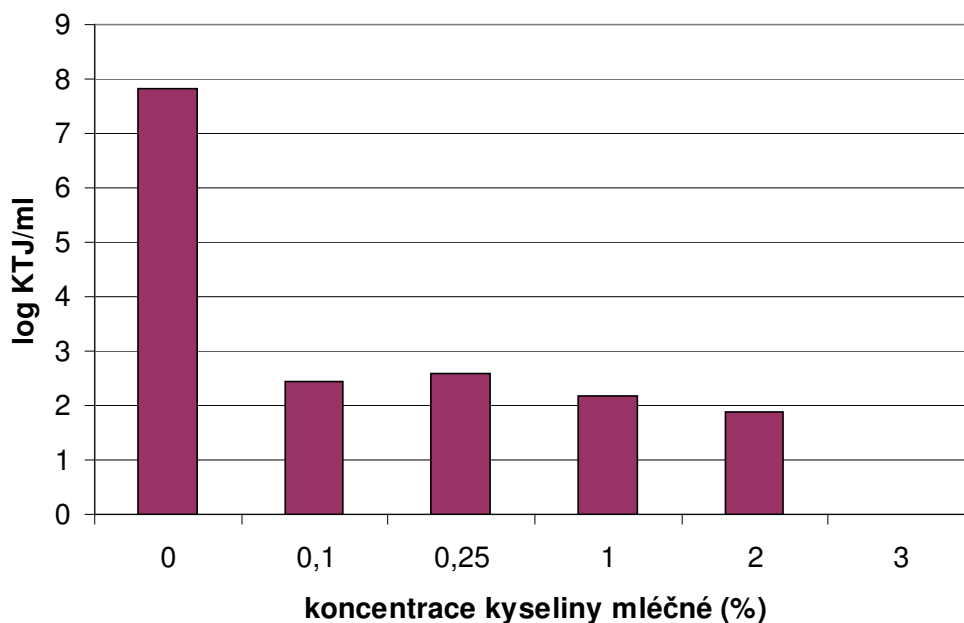
3.9 Sledování účinku kyseliny mléčné na *Bacillus subtilis*

Posledním mikroorganismem, u kterého byl sledován růst v přítomnosti kyseliny mléčné, byl *Bacillus subtilis*. Experiment byl proveden opět metodou B s 24 hodin starou bakteriální kulturou.

Z výsledků stanovení, které uvádí Tabulka č. 16 a Obrázek č. 14, je zřejmé, že výrazné snížení rozvoje *Bacillus subtilis* (o 5 řádů), způsobuje již 0,1% kyselina mléčná, také je patrné, že koncentrace od 0,1% do 2%, mají přibližně stejný antibakteriální účinek, dochází pravděpodobně k rozvoji spor této bakterie. Výsledky dále uvádí, že k ukončení rozvoje vegetativní formy *B. subtilis* i jeho spor dochází aplikací 3% kyseliny mléčné, kdy došlo ve srovnání s kontrolou ke snížení počtu KTJ o 7 řádů.

Tabulka č. 16: Vliv kyseliny mléčné na růst *B. subtilis* na PCA – metoda B

Koncentrace kyseliny mléčné (%)	Průměrný počet MO v 1ml	Směrodatná odchylka
0 - kontrola	$6,8 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$
0,1	$2,8 \cdot 10^2$	76,4
0,25	$3,8 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^2$
0,5	$2,3 \cdot 10^2$	98,3
1	$1,5 \cdot 10^2$	49,7
2	75	37,1
3	0	0



Obrázek č. 14: Graf závislosti počtu KTJ *B. subtilis* na koncentraci kyseliny mléčné – metoda B

Statistickým hodnocením výsledků stanovení podle Kruskal-Walisova testu existují mezi kontrolou a antibakteriálními účinky sledovaných koncentrací kyseliny statisticky významné rozdíly. Wilcoxonovým testem srovnávání dvojic, nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi účinkem 0,1% a 0,25% kyseliny, také mezi 0,5% a 1% kyseliny a mezi 0,1% a 2% kyselinou. Mezi účinky ostatních koncentrací existují statistické rozdíly.

3.10 Srovnání antibakteriálního působení kyseliny mléčné na sledované mikroorganismy

V tabulce (Tabulka č. 17) je uveden souhrn zjištěných inhibičních koncentrací kyseliny mléčné na studované bakterie. Z této tabulky vyplývá, že kyselina mléčná je nejvíce účinná na *Serratia marcescens*. K zastavení jejího růstu dochází již při 0,125% koncentraci kyseliny. Nejvíce odolné vůči kyselině mléčné jsou sporotvorné bacily.

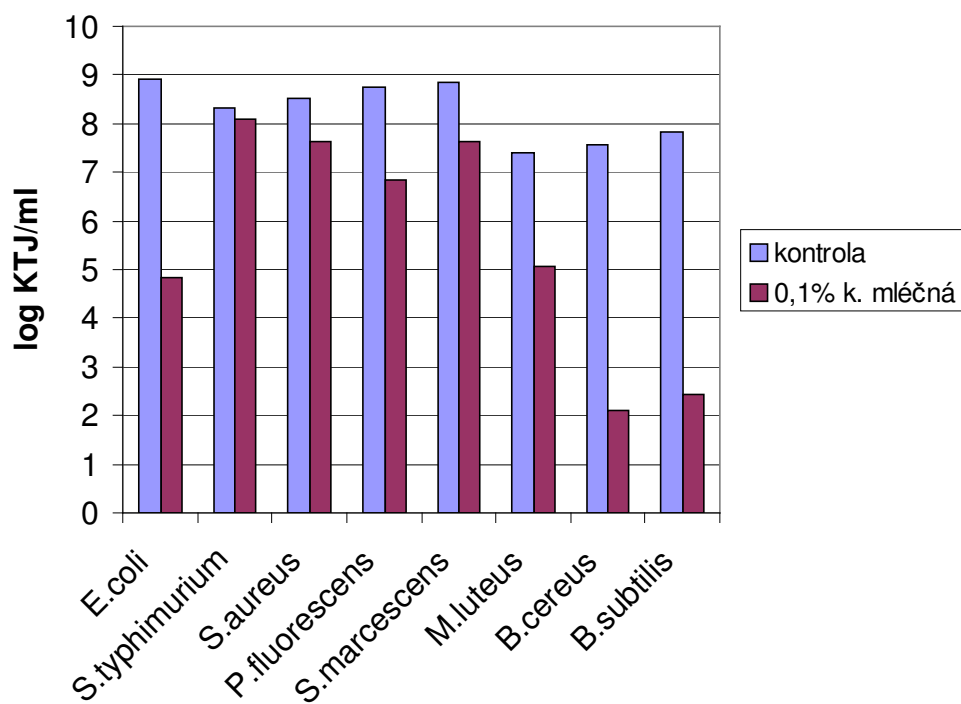
Tabulka č. 17: Stanovené inhibiční koncentrace kyseliny mléčné na jednotlivé druhy bakterií, metodou B na PCA

Bakteriální kmen	Baktericidní koncentrace kyseliny mléčné (w/v)
<i>Escherichia coli</i>	0,25 %
<i>Salmonella typhimurim</i>	0,25 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,50 %
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,50 %
<i>Serratia marcescens</i>	0,125 %
<i>Micrococcus luteus</i>	0,25 %
<i>Bacillus cereus</i>	2,0 %
<i>Bacillus subtilis</i>	3,0 %

Ze všech výsledků je zřejmé, že aplikací již 0,1% kyseliny mléčné, dochází ke snížení počtu kolonií všech sledovaných mikroorganismů. Tyto výsledky jsou zachyceny v níže uvedeném grafu (Obrázek č. 15), z něhož vyplývá, že tato koncentrace má nejvyšší účinek na bacily, zatímco u salmonely je téměř bez efektu, menší efekt vykazuje také na inhibici růstu *Staphylococcus aureus*.

Statistickým hodnocením dle Kruskal-Wallisova testu na 5% hladině významnosti bylo zjištěno, že mezi inhibičními účinky 0,1% kyseliny mléčné na jednotlivé mikroorganismy existují statisticky významné rozdíly.

Při statistickém porovnávání dvojic Wilcoxonovým testem (porovnávání inhibičního účinku 0,1% kyseliny mezi 2 mikroorganismy) nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi účinkem této koncentrace na *S. aureus* a *S. typhimurium*.



Obrázek č. 15: Graf porovnání kontroly s inhibičním účinkem 0,1% kyseliny mléčné, metodou B, na živné půdě PCA

ZÁVĚR

- V této práci byl několika metodami sledován vliv kyseliny mléčné na vybrané druhy mikroorganismů. Bylo zjištěno, že pro tato stanovení je vhodnější metoda inkubace v masopeptonovém bujónu, s následným vyočkováním na vhodná kultivační media (metoda B). Tato metoda byla ve srovnání s metodou A (metoda roztěru) přesnější a nedocházelo k vedlejším účinkům kyseliny mléčné na použitá média.
- Metodou A, byl testován inhibiční vliv kyseliny mléčné na růst *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium* na živných půdách PCA a EA. Při použití této metody byl zjištěn velmi nízký antibakteriální účinek kyseliny i při vyšších koncentracích.
- Ke sledování růstu *E.coli*, metodou A, byly použity 1,5%, 2%, 2,5% a 3 % roztoky kyseliny mléčné. Aplikací těchto koncentrací, docházelo k velmi nízkému poklesu počtu kolonií na obou živných půdách. Koncentrace kyseliny mléčné, při které dochází k totální inhibici. *E. coli* však stanovená nebyla.
- Pro sledování růstu *Salmonella typhimurium* byly koncentrace kyseliny mléčné zvýšeny na 4%. Při této koncentraci byl růst salmonely zastaven. Ale docházelo ke stejným vedlejším účinkům kyseliny na kultivační média jako v případě *E.coli* (odbarvení půd a růst kolonií pouze při okrajích Petriho misky).
- Metodou B byl testován inhibiční vliv kyseliny mléčné na růst *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis*. Pro tato stanovení byly použity koncentrace kyseliny od 0,1 % do 1 %, v případě bacilů do 3 %.

- Bylo zjištěno, že aplikací již 0,1% kyseliny mléčné, dochází ve srovnání s kontrolou ke snížení počtu kolonií všech těchto sledovaných mikroorganismů.
- Na základě výsledků bylo zjištěno, že k úplné inhibici *Escherichia coli*, dochází při 0,5% koncentraci kyseliny mléčné. Při stejné koncentraci došlo k absolutní inhibici také *Pseudomonas fluorescens* a *Staphylococcus aureus*. Na *Salmonella typhimurium* a *Micrococcus luteus* má kyselina mléčná mikrobicidní účinek při koncentraci 0,25%, a růst *Serratia marcescens* byl ukončen již při aplikaci 0,125% kyseliny. K rozvoji bacilů docházelo i při koncentracích kyseliny kolem 2%.
- Závěrem lze konstatovat, že kyselina mléčná má výrazné antibakteriální účinky a může být používána k ošetření některých druhů potravin. Lze ji použít jako součást celkové strategie kontroly patogenů během výrobního procesu, nikoli však jako náhradu správné hygienické praxe.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ALAKOMI, H. L., SKYTTÄ, E., SAARELA, M., MATTILA-SANDHOLM, T., LATVA-KALA, K., HELANDER, I.M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2001-2005.
2. ANDERSON, M., HUFF, H., MARSHALL, R., DAMARE, J., PRATT, M., JOHNSTON, R. (1997). Evaluation of an automated beef carcass washing and sanitizing system under production conditions. *J. Food Prot.*, 50: 562-566. *In: 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.
3. AVENS, J., CLAYTON, P., JONES, D., BOLIN, R., LLOYD, W., JANKOW, D. (1995). Acetic acid spray ineffective on beef carcasses with bacteria counts. IFT Annual Meeting , p.14. *In: 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.
4. BURIK, A. M. C. – de Koos, J. T. (1990) *Fleischwirtschaft*, 70, str.1266.
5. ČECHOVÁ, L., (2000), *Detekce atypických kmenů rodu Salmonella pomocí polymerázové řetězové reakce*, Diplomová práce, MU Brno.
6. DAVÍDEK J., JANÍČEK G., POKORNÝ J., (1983), *Chemie potravin*, SNTL – Nakladatelství technické literatury., Praha.
7. FRATAMICO, P., SCHULTZ, F., BENEDICT, R., BUCHANAN, R., COOKE, P. (1996). Factors influencing attachment of E. coli O157:H7 to beef tissues and removal using selectid sanitizing rinses. *J. Food Prot.*, 59: 453-459. *In: 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.

8. FU, A., SEBRANEK, J., MURANO, E. (1994). Microbial and quality characteristics of pork cuts from carcasses treated with sanitizing sprays. *J. Food Sci.*, 59: 306-309. In: 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.
9. GAYER, P., (1996) *Maso*, 7, č.1, str.39.
10. GREER, G. AND DILTS, B. (1995). unpublished In: 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.
11. HRABĚ, J. BUŇKA, ROP, O., (2005), *Legislativa a řízení jakosti v potravinářství*, univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 173 str.
12. HRONKOVÁ, I., (1999), *Jakost a využití drůbežního separátu v masné výrobě*, bakalářská práce, VVŠ PV vyškov.
13. JANDOVÁ B., KOTOUČOVÁ L., (1996), *Praktikum z mikrobiologie*, Masarykova univerzita v Brně.
14. KOMPRDA, T., (2004), *Obecná hygiena potravin*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 146 str.
15. KYZLINK, V., (1988), *Teoretické základy konzervace potravin*, SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha, 511 str.
16. MAHON, R.C. AND MANUSELIS, G. (1995). Primary intestinal pathogens and related Human infections, p. 461 – 465 In C.R. Mahon and G. Manuselis (ed.), *Textbook of Diagnostic Microbiology*. W.B. Saunders Company. Philadelphia.
17. MALÍKOVÁ, Z., (2003) *Vliv vybraných organických kyselin a a_w na rod *Arcobacter**, Diplomová práce, Univerzita Pardubice.
18. HAYDAR, Ö., YILDIRIM, Y., KÜPLÜLÜ, Ö., KOLUMAN, A., GÖNCÜOĞLU, M. AND İNAT, G., (2004), Effects of lactic acid and hot water treatments on *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* on beef. *Journal of Food Engineering*, 74(2): 224-231.

19. PIPEK, P., HOUŠKA M., HOKE K., JELENÍKOVÁ J., KÝHOS K., ŠIKULOVÁ M., (2004), Decontamination of pork carcasses by steam and lactic acid, *Journal of Food Engeneering*, 74(2): 224-231.
20. PIPEK, P., (1998), *Technologie masa II.*, 1. ed., Praha.
21. ROSICKÝ, B. SIXL, W. a kol., 1994, *Salmonelózy*. 1. vydání Scientia medica, Praha.
22. SMULDERS, F. (1995). Preservation by microbial decontamination: the surface treatment of meats by organic acids. In: Gould, G. W. (Ed.), *New Methods of Food Preservation. Int. J. Food Microbiol.*, 44: 149-169.
23. SUKERHA, M., REDDY, S. M. (1999). Classification and properties of preservatives. In: Robinson, R.K., Batt, C. A., Patel, P.D., (eds.) *Encyklopedia of Food Microbiology*, Academic Press, San Diego, s.1710 – 1717.
24. ŠILHÁNKOVÁ, L., (1995), *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologie*, Praha, Victoria publishing.
25. TSILOYIANNIS, V. K., KYRIAKIS, S. C., VLEMMAS, J., SARRIS, K. (2001). The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Res. Vet. Sci.* 70: 287-293.
26. TVRDOŇ, M., (1978), *Školní atlas mikroorganismů pro 1. až 4.ročník SPŠ potravinářských*. SNTL – nakladatelství technické literatury Praha.
27. VAN NETTEN, P., HUIS IN'T VELD, J., MOSSEL, D. (1994). An in-vitro meat model for the immediate bactericidal effect of lactic acid decontamination on meat surfaces. *J. Appl. Bacteriol.*, 76: 49-54. In: 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.
28. Miniatlas mikroorganismů (online)
<http://www.vscht.cz/main/soucasti/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm>
(cit. 14.11.2005)
29. Konzervační látky v potravinách (online) <http://www.maso.cz/aktual/a36.htm>
(cit. 14.11.2005)
30. *Escherichia coli* (online)
<http://www.lf3.cuni.cz/ustavy/mikrobiologie/rep/esco.htm> (cit. 6.12.2005)

31. Živné půdy (online)
<http://www.cadersky.cz/stranka.php?no=21> (cit. 11.11.2005)
32. Lactic acid (online) http://en.wikipedia.org/wiki/Lactic_acid
(cit. 13.2.2006)
33. Sbírka zákonů České republiky 2004 – Vyhláška č. 132/2004 Sb.
o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly
a hodnocení.
34. Sbírka zákonů České republiky 2004 – vyhláška č. 304/2004 Sb., kterou
se stanoví druhy a podmínky použití přídatných a pomocných látek při
výrobě potravin.
35. Kyselina mléčná (online) <http://www.vscht.cz/kch/galerie/vnitgr.htm> (cit.
22.2.2006)

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

a_w	Aktivita vody
CFU	Colony forming units (kolonie tvořící jednotka – KTJ)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EA	Endův agar
EHEC	Enterohemoragické <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
KTJ	Kolonie tvořící jednotka
LT	Termolabilní toxin
MHA	Mueler Hinton agar
MPA	Masopeptonový agar
MPB	Masopeptonový bujón
MSA	Manitol salt agar
PCA	Plate Count agar
ST	Termostabilní toxin
w/v	Objemová procenta

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Schéma demonstrující rozdíly ve stavbě buněčné stěny gram pozitivní (vlevo) a gram negativní (vpravo) bakterie. (Podle M.J. Polczara et al.)	13
Obrázek č. 2: Struktura bakteriální buňky	22
Obrázek č. 3: Graf závislosti počtu KTJ <i>E.coli</i> na koncentraci kyseliny mléčné, porovnání výsledků zjištěných na obou médiích - metoda A	51
Obrázek č. 4: Graf závislosti počtu KTJ <i>E.coli</i> na koncentraci kyseliny mléčné na živné půdě MHA.....	52
Obrázek č. 5: Graf závislosti počtu KTJ <i>E.coli</i> na koncentraci kyseliny mléčné, porovnání výsledků zjištěných na obou médiích – metoda B.....	53
Obrázek č. 6: Graf závislosti počtu KTJ <i>S. typhimurium</i> na koncentraci kyseliny mléčné, porovnání výsledků zjištěných na obou médiích - metoda A.....	55
Obrázek č. 7: Graf závislosti počtu KTJ <i>S. typhimurium</i> na koncentraci kyseliny mléčné, porovnání výsledků zjištěných na obou médiích - metoda B	57
Obrázek č. 8: Graf závislosti počtu KTJ <i>S. aureus</i> na koncentraci kyseliny mléčné, porovnání výsledků zjištěných na obou médiích - metoda B	60
Obrázek č. 9: Graf závislosti počtu KTJ <i>S. aureus</i> na koncentraci kyseliny mléčné – po její neutralizaci na živné půdě (PCA)	61
Obrázek č. 10: Graf závislosti počtu KTJ <i>P. fluorescens</i> na koncentraci kyseliny mléčné na PCA – metoda B	62
Obrázek č. 11: Graf závislosti počtu KTJ <i>S. marcescens</i> na koncentraci kyseliny mléčné na PCA – metoda B	64
Obrázek č. 12: Graf závislosti počtu KTJ <i>M. luteus</i> na koncentraci kyseliny mléčné na PCA – metoda B	65
Obrázek č. 13: Graf závislosti počtu KTJ <i>B. cereus</i> na koncentraci kyseliny mléčné na živné půdě PCA – metoda B	67
Obrázek č. 14: Graf závislosti počtu KTJ <i>B. subtilis</i> na koncentraci kyseliny mléčné – metoda B.....	69
Obrázek č. 15: Graf porovnání kontroly s inhibičním účinkem 0,1% kyseliny mléčné, metodou B, na živné půdě PCA	71

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Vliv kyseliny mléčné na růst <i>E. coli</i> na PCA – metoda A.....	50
Tabulka č. 2: Vliv kyseliny mléčné na růst <i>E. coli</i> na EA – metoda A	51
Tabulka č. 3: Vliv kyseliny mléčné na růst <i>E. coli</i> na MHA – metoda A	52
Tabulka č. 4: Vliv kyseliny mléčné na růst <i>E. coli</i> na PCA – metoda B.....	53
Tabulka č. 5: Vliv kyseliny mléčné na růst <i>E. coli</i> na EA – metoda B	54
Tabulka č. 6: Vliv kyseliny mléčné na růst <i>S. typhimurium</i> na PCA – metoda A.....	55
Tabulka č. 7: Vliv kyseliny mléčné na růst <i>S. typhimurium</i> na EA – metoda A	56
Tabulka č. 8: Vliv kyseliny mléčné na růst <i>S. typhimurium</i> na PCA – metoda B.....	57
Tabulka č. 9: Vliv kyseliny mléčné na růst <i>S. typhimurium</i> na EA – metoda B	58
Tabulka č. 10: Vliv kyseliny mléčné na růst <i>S. aureus</i> na obou kultivačních půdách – metoda B	59
Tabulka č. 11: Účinek kyseliny mléčné po neutralizaci na <i>S. aureus</i> na živné půdě PCA.....	61
Tabulka č. 12: Vliv kyseliny mléčné na růst <i>P. fluorescens</i> na PCA – metoda B.....	62
Tabulka č. 13: Vliv kyseliny mléčné na růst <i>S. marcescens</i> na PCA – metoda B.....	63
Tabulka č. 14: Vliv kyseliny mléčné na růst <i>M. luteus</i> na PCA – metoda B	65
Tabulka č. 15: Vliv kyseliny mléčné na růst <i>B. cereus</i> na PCA – metoda B.....	66
Tabulka č. 16: Vliv kyseliny mléčné na růst <i>B. subtilis</i> na PCA – metoda B	68
Tabulka č. 17: Stanovené inhibiční koncentrace kyseliny mléčné na jednotlivé druhy bakterií, metodou B na PCA.....	70

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1	Identifikační tabulka ENTEROtest 24	82
Příloha č. 2	Identifikační tabulka STAPHYtest 16	83
Příloha č. 3	pH sledovaných koncentrací kyseliny mléčné v MPB	83
Příloha č. 4	<i>Escherichia coli</i> 10 ⁻⁶ Metoda A (EA) – kontrola	84
Příloha č. 5	<i>Escherichia coli</i> 10 ⁻⁵ Metoda A (EA) – účinek 1,5% kyseliny mléčné	84
Příloha č. 6	<i>Escherichia coli</i> 10 ⁻⁵ Metoda A (PCA) – účinek 1,5% kyseliny mléčné	85
Příloha č. 7	<i>Escherichia coli</i> 10 ⁻⁵ Metoda A (MHA) – účinek 2% kyseliny mléčné	85
Příloha č. 8	<i>Salmonella typhimurium</i> 10 ⁻⁶ Metoda B (PCA) – kontrola	86
Příloha č. 9	<i>Salmonella typhimurium</i> 10 ⁻⁶ Metoda B (EA) – kontrola	86
Příloha č. 10	<i>Salmonella typhimurium</i> 10 ⁻⁴ Metoda B (PCA) – účinek 0,125% kyseliny mléčné	86
Příloha č. 11	<i>Salmonella typhimurium</i> 10 ⁻⁴ Metoda B (EA) – účinek 0,125% kyseliny mléčné	86
Příloha č. 12	<i>Staphylococcus aureus</i> 10 ⁻⁵ Metoda B (PCA) – kontrola	87
Příloha č. 13	<i>Staphylococcus aureus</i> 10 ⁻⁵ Metoda B (MSA) – kontrola	87
Příloha č. 14	<i>Staphylococcus aureus</i> 10 ⁻³ Metoda B (PCA) – účinek 0,125% kyseliny mléčné	87
Příloha č. 15	<i>Staphylococcus aureus</i> 10 ⁻³ Metoda B (MSA) – účinek 0,125% kyseliny mléčné	87
Příloha č. 16	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 10 ⁻⁵ Metoda B (PCA) – kontrola	88
Příloha č. 17	<i>Micrococcus luteus</i> 10 ⁻³ Metoda B (PCA) – kontrola	88
Příloha č. 18	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 10 ⁻² Metoda B (PCA) – účinek 0,1% kyseliny mléčné	88
Příloha č. 19	<i>Micrococcus luteus</i> 10 ⁻¹ Metoda B (PCA) – účinek 0,1% kyseliny mléčné	88
Příloha č. 20	<i>Serratia marcescens</i> 10 ⁻⁵ Metoda B (PCA) – kontrola	89
Příloha č. 21	<i>Bacillus cereus</i> 10 ⁻⁵ Metoda B (PCA) – kontrola	89
Příloha č. 22	<i>Serratia marcescens</i> 10 ⁻⁵ Metoda B (PCA) – účinek 0,1% kyseliny mléčné	89
Příloha č. 23	<i>Bacillus cereus</i> 10 ⁰ Metoda B (PCA) – účinek 0,5% kyseliny mléčné	89
Příloha č. 24	<i>Bacillus subtilis</i> 10 ⁻⁵ Metoda B (PCA) – kontrola	90
Příloha č. 25	<i>Bacillus subtilis</i> 10 ⁰ Metoda B (PCA) – účinek 2% kyseliny mléčné	90
Příloha č. 26	Sborník a příspěvek konference Bezpečnost' a kontrola potravin	91
Příloha č. 27	Příspěvek konference: XV. konference mladých mikrobiologů	96

PŘÍLOHY

Příloha č. 1 Identifikační tabulka ENTEROtest 24

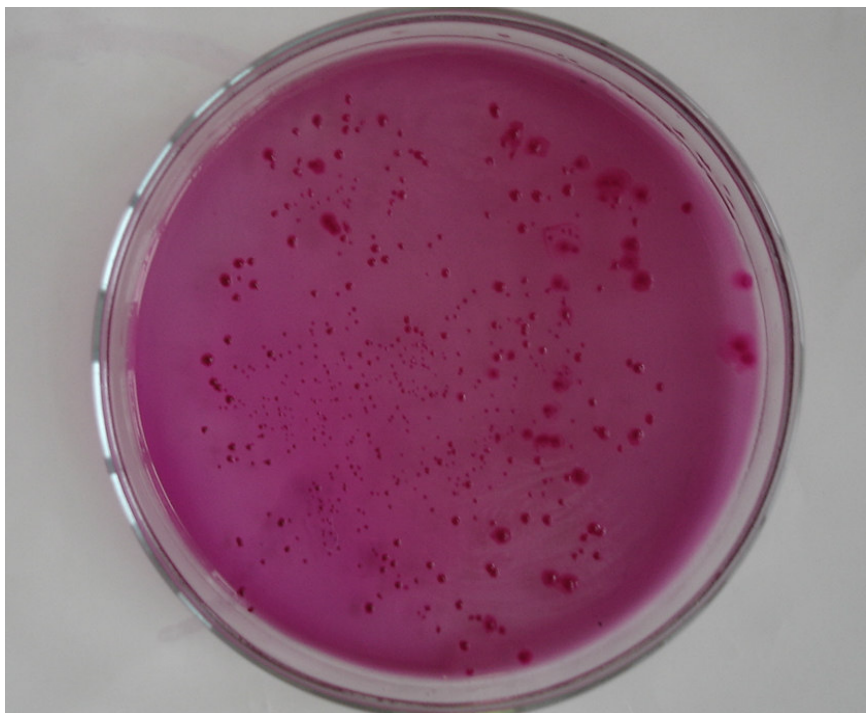
Test	Zkratka testu	Reakce		
		<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Escherichia coli</i>
Indol	IND	-	-	+
Sirovodík	H ₂ S	-	-	-
Lysin	LYS	+	+	+
Ornithin	ORN	+	+	+
Ureáza	URE	-	-	-
Arginin	ARG	-	-/+	-/+
Simmons citrát	SCI	+	+	-
Malonát	MAL	-	-/+	-
Fenylalanin	PHE	-	-	-
β-Galaktosidáza	ONP	-	+	-/+
Inositol	INO	-	+	-
Adonitol	ADO	-	+	-
Cellobióza	CEL	-	-	-
Sacharóza	SUC	-	+	+
Trehalóza	TRE	+	+	+
Mannitol	MAN	+	+	+
Acetoin	VPT	-	-	-
Eskulin	ESL	-	+	-
Sorbitol	SOR	+	+	+
Rhamnóza	RHA	-	-	+
Melibióza	MLB	+	-	+
Raffinóza	RAF	-	-	-
Dulcitol	DUL	-	-	-
Glukóza	GLU	+	+	+

Příloha č. 2 Identifikační tabulka STAPHYtest 16

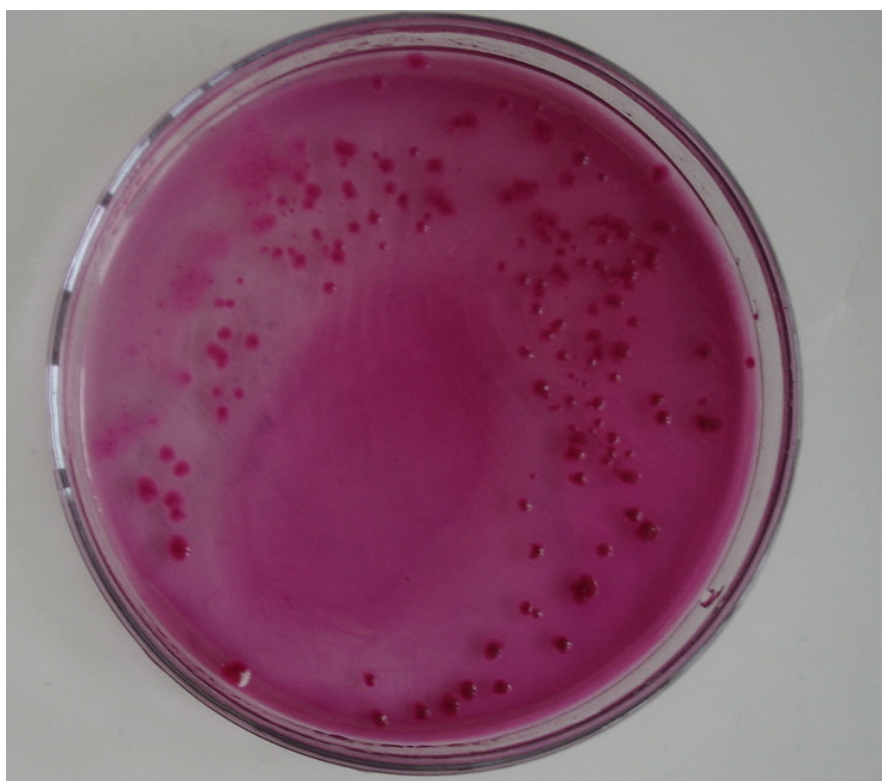
Test	Zkratka testu	Reakce	
		<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ureáza	URE	+	+
Arginin	ARG	-	+
Ornithin	ORN	-	-
β-Galaktosidáza	bGA	-	-
β-Glukuronidáza	GLR	-	-
Eskulin	ESL	-	-
Nitráty	NIT	+	+
Fosfatáza	PHS	-	+
Galaktóza	GAL	-	+
Sacharóza	SUC	+	+
Trehalóza	TRE	-	+
Mannitol	MAN	-	+
Xylóza	XYL	-	-
Maltóza	MLT	-	+
Mannóza	MNS	+	+
Laktóza	LAC	-	+

Příloha č. 3 pH sledovaných koncentrací kyseliny mléčné v MPB

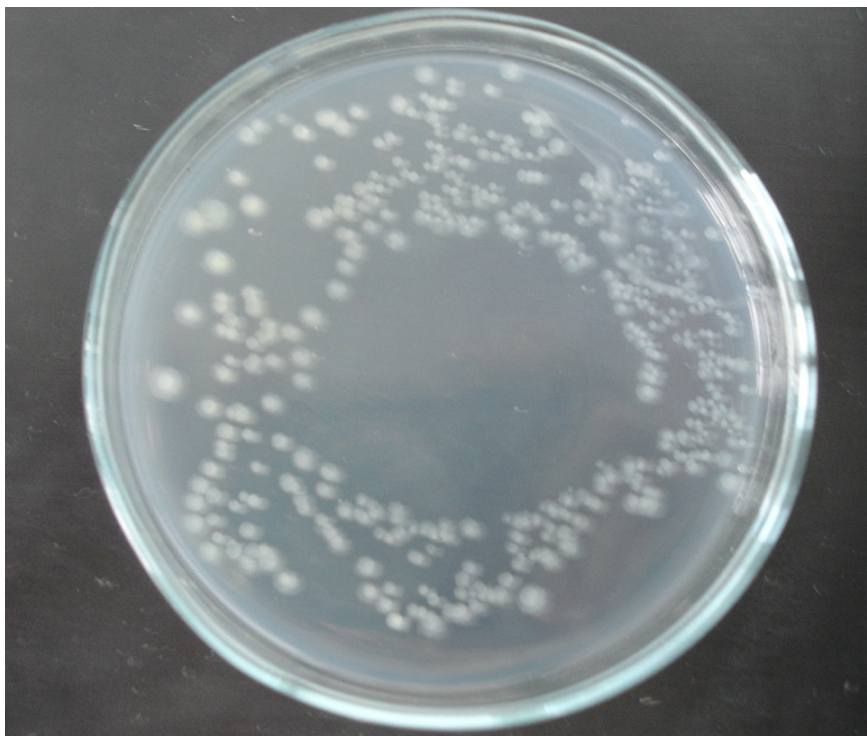
Koncentrace kyseliny mléčné (%)	pH
0,1	5,01
0,125	4,67
0,25	4,07
0,5	3,60
1	3,35
2	2,98



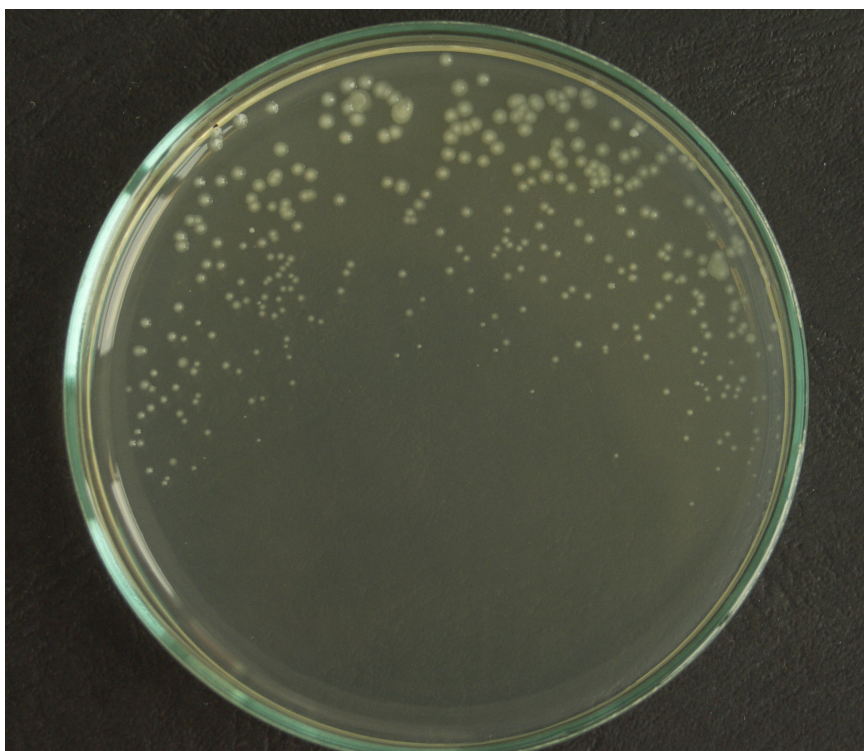
Příloha č. 4 *Escherichia coli* 10^{-6} Metoda A (EA) – kontrola



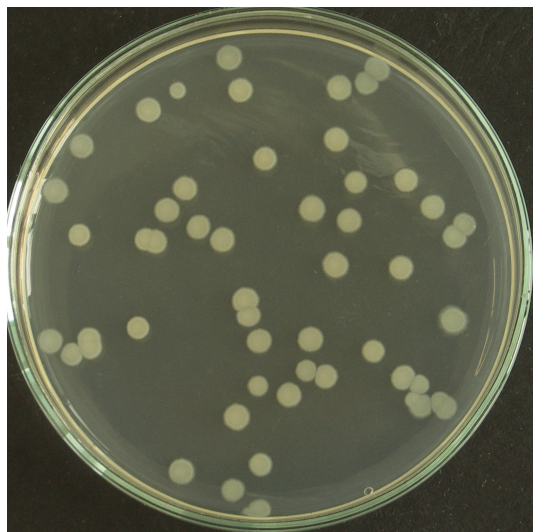
Příloha č. 5 *Escherichia coli* 10^{-5} Metoda A (EA) – účinek 1,5% kyseliny mléčné



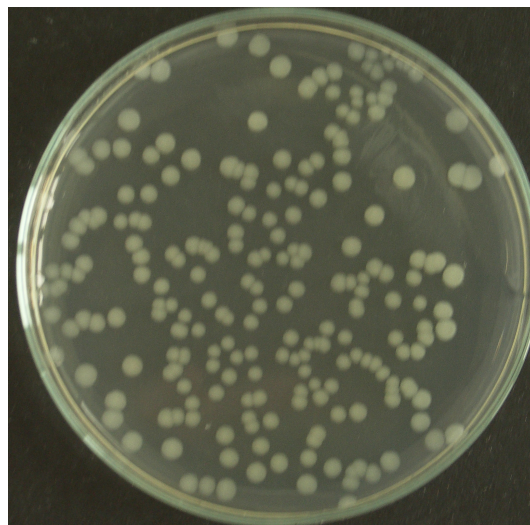
Příloha č. 6 *Escherichia coli* 10^{-5} Metoda A (PCA) – účinek 1,5% kyseliny mléčné



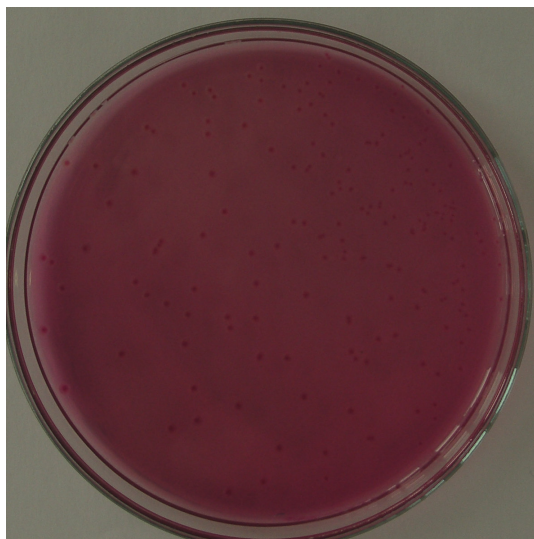
Příloha č. 7 *Escherichia coli* 10^{-5} Metoda A (MHA) – účinek 2% kyseliny mléčné



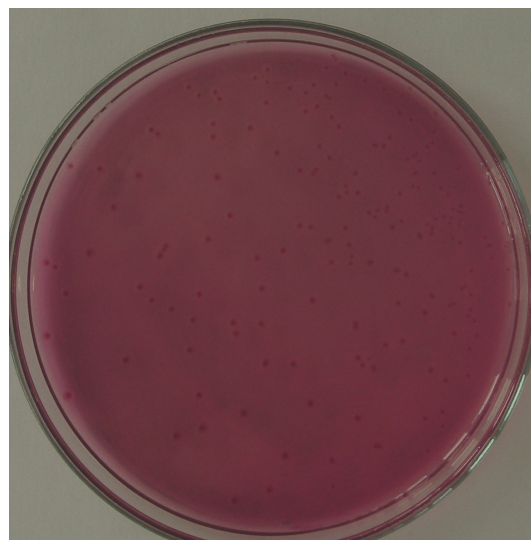
Příloha č. 8 *Salmonella typhimurium*
10⁻⁶ Metoda B (PCA) – kontrola



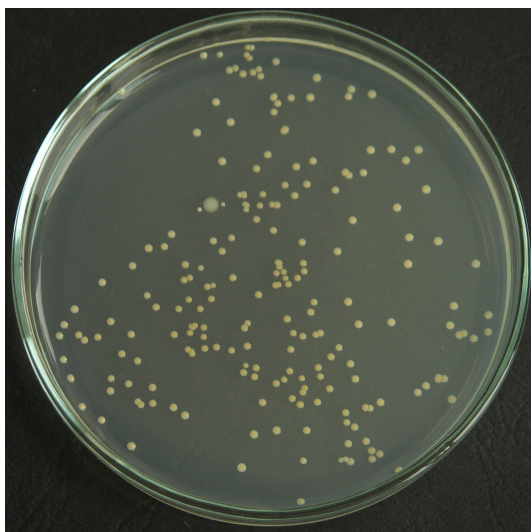
Příloha č. 10 *Salmonella typhimurium*
10⁻⁴ Metoda B (PCA) – účinek 0,125%
kyseliny mléčné



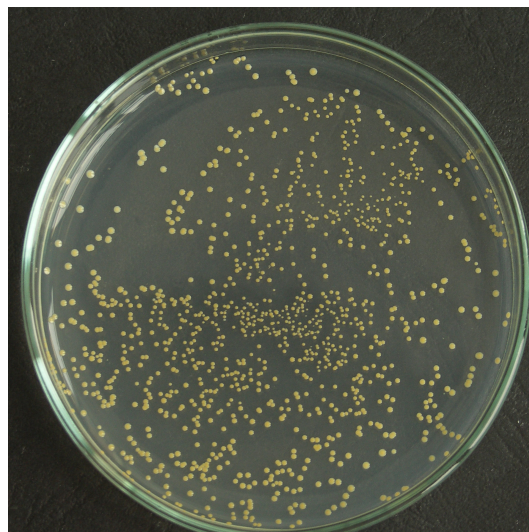
Příloha č. 9 *Salmonella typhimurium*
10⁻⁶ Metoda B (EA) – kontrola



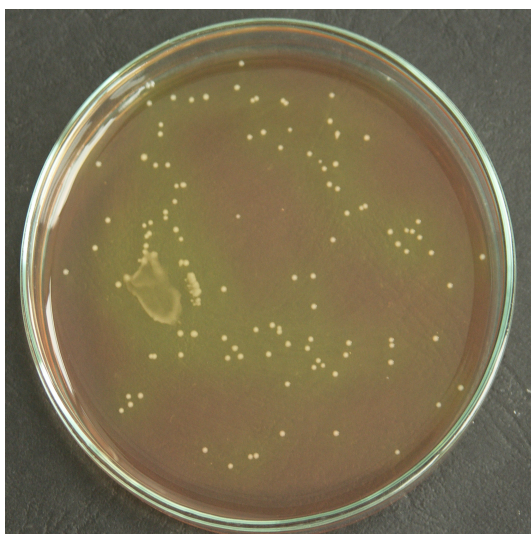
Příloha č. 11 *Salmonella typhimurium*
10⁻⁴ Metoda B (EA) – účinek 0,125%
kyseliny mléčné



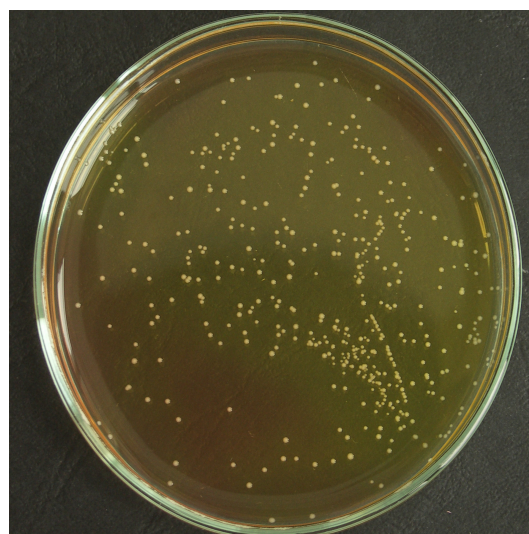
Příloha č. 12 *Staphylococcus aureus* 10^{-5}
Metoda B (PCA) – kontrola



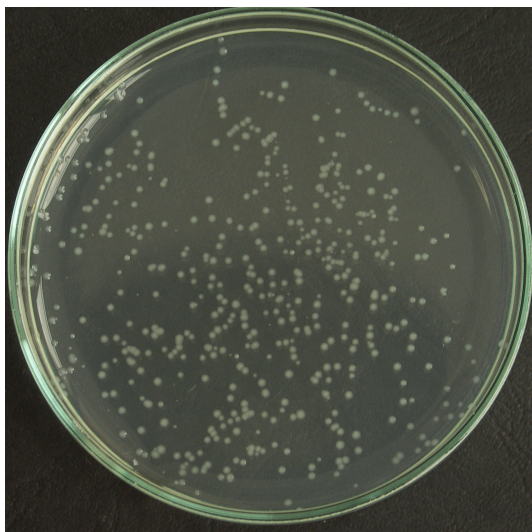
Příloha č. 14 *Staphylococcus aureus* 10^{-3}
Metoda B (PCA) – účinek 0,125%
kyseliny mléčné



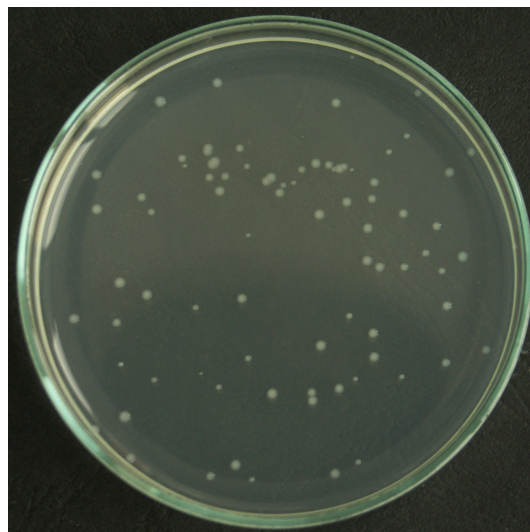
Příloha č. 13 *Staphylococcus aureus* 10^{-5}
Metoda B (MSA) – kontrola



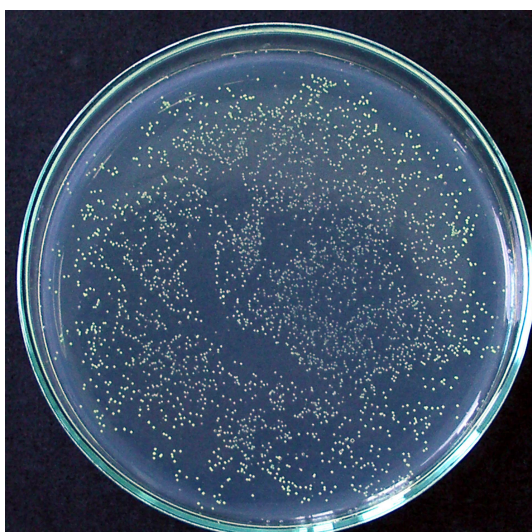
Příloha č. 15 *Staphylococcus aureus* 10^{-3}
Metoda B (MSA) – účinek 0,125%
kyseliny mléčné



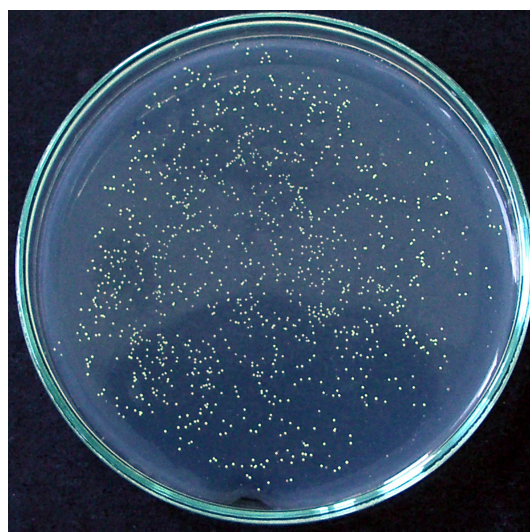
Příloha č. 16 *Pseudomonas fluorescens*
 10^{-5} Metoda B (PCA) – kontrola



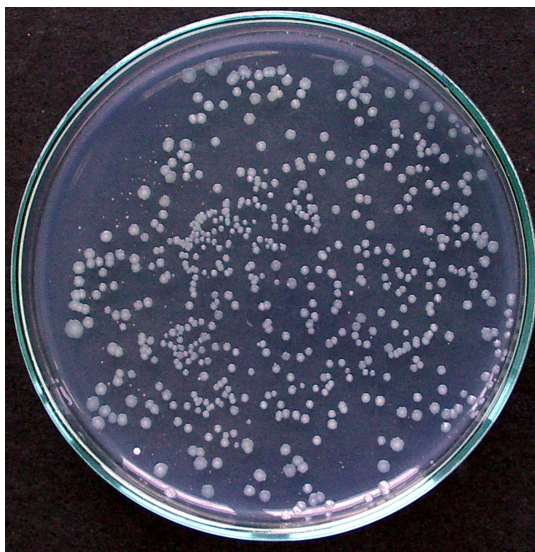
Příloha č. 18 *Pseudomonas fluorescens*
 10^{-2} Metoda B (PCA) – účinek 0,1%
kyseliny mléčné



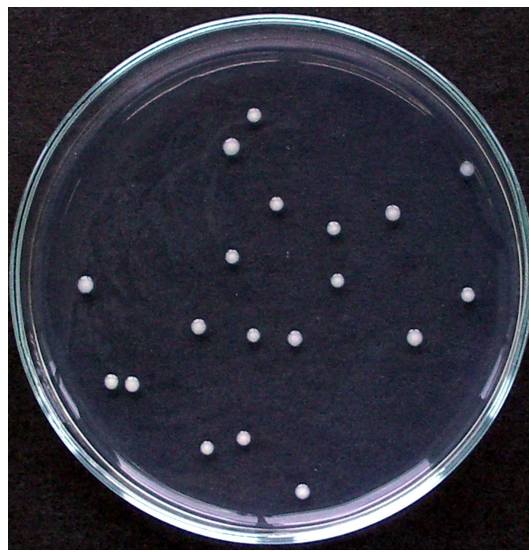
Příloha č. 17 *Micrococcus luteus* 10^{-3}
Metoda B (PCA) – kontrola



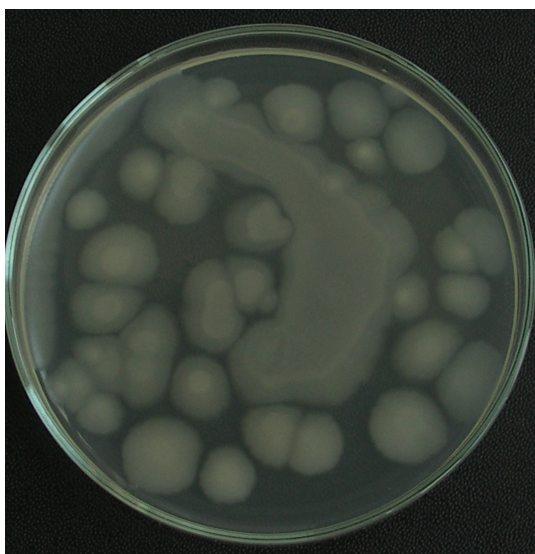
Příloha č. 19 *Micrococcus luteus* 10^{-1}
Metoda B (PCA) – účinek 0,1% kyseliny
mléčné



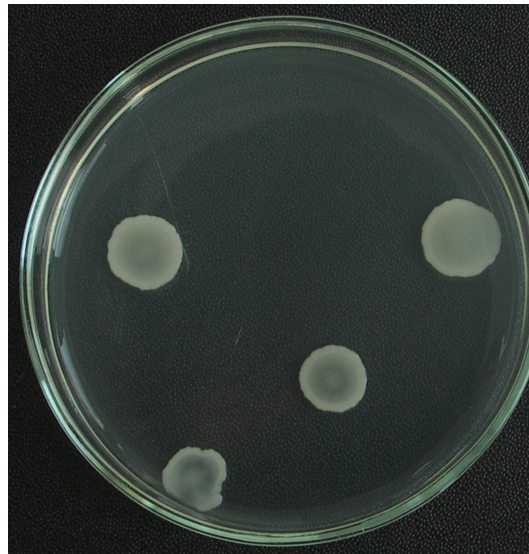
Příloha č. 20 *Serratia marcescens* 10^{-5}
Metoda B (PCA) – kontrola



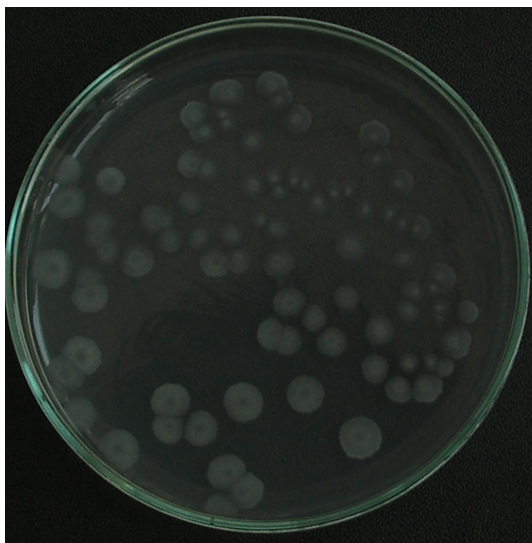
Příloha č. 22 *Serratia marcescens* 10^{-5}
Metoda B (PCA) – účinek 0,1% kyseliny
mléčné



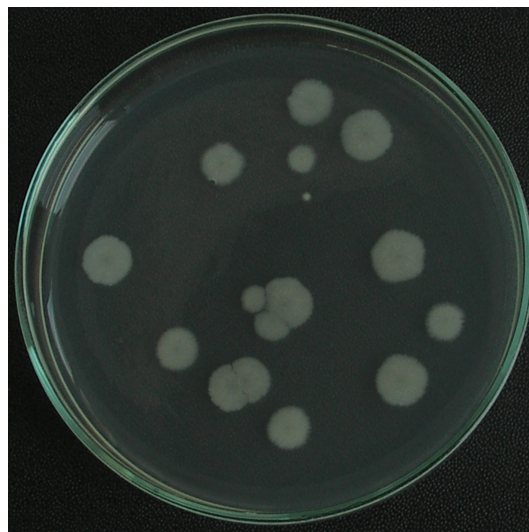
Příloha č. 21 *Bacillus cereus* 10^{-5}
Metoda B (PCA) – kontrola



Příloha č. 23 *Bacillus cereus* 10^0 Metoda
B (PCA) – účinek 0,5% kyseliny mléčné



Příloha č. 24 *Bacillus subtilis* 10^{-5}
Metoda B (PCA) – kontrola



Příloha č. 25 *Bacillus subtilis* 10^0
Metoda B (PCA) – účinek 2% kyseliny
mléčné

VPLYV ORGANICKÝCH KYSELIN NA *ESCHERICHIA COLI* THE EFFECT OF ORGANIC ACIDS ON *ESCHERICHIA COLI*

Eva Kašpárková, Martina Lukešová, Daniela Kramářová, Leona Čechová, Ignác Hoza

Abstract: The aim of this work was to determine the effect of caprylic and lactic acid on bacteria *Escherichia coli*. These concentrations of acids were used: 1; 1.5; 2; 2.5 and 3% (w/v). The samples treated with caprylic or lactic acid indicated significant reduction of the *E. coli* population in comparison with control sample (untreated). The antibacterial effect of organic acids was confirmed.

Key words: caprylic acid, lactic acid, antimicrobial effect, *Escherichia coli*, fatty acid.

ÚVOD

Onemocnění z potravin způsobená různými patogeny jsou celosvětovým zdravotním problémem, který se týká celé populace. Je zapotřebí hledat různé způsoby antimikrobiálního ošetření, resp. vhodné antibakteriální látky, které jsou schopny co nejvíce redukovat množství patogenů, vyskytujících se v potravinách (Food Safety, 1998).

Jedním z nejdůležitějších potravinářských patogenů je právě *Escherichia coli*. Nachází se ve spodní části střevního traktu člověka a teplokrevných zvířat a vyskytuje se tedy i ve výkalech. V současnosti se rozlišuje 5 tříd patogenních *E. coli*, které způsobují průjemová onemocnění: enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), enterohemoragické *E. coli* (EHEC), enteropatogenní *E. coli* (EPEC) a enteroagregativní *E. coli* (EAEC). Vedle infekcí intestinálního traktu je také schopna infikovat močové cesty (UTI – urinary tract infections) a vyvolat neonatální meningitidu (Nataro and Kaper, 1998).

Antibakteriální účinek mastných kyselin je dobře prostudován nejen u kyseliny olejové (Hinton and Ingram, 2000), ale taktéž u kyseliny kaprylové (Nair et al., 2004). Je to přírodní mastná kyselina se středně dlouhým řetězcem (C₈), která je přítomná v mateřském a kravském mléce a v mléce kokosových ořechů. Úřadem pro kontrolu potravin a léků je všeobecně uznána za bezpečnou látku pro použití v potravinářství. Je to nažloutlá látka, která je při pokojové teplotě kapalná a je schopná tvořit emulzi 1. typu (o/v).

Kyselina mléčná je v posledním desetiletí jednou z nejčastěji používaných přísad, které mají zvýšit výrobní jistotu, prodloužit udržitelnost a zvýšit zdravotní nezávadnost potravin. Na přirozené udržitelnosti se účastní jak působení mléčnanového iontu, tak snížením hodnoty pH a aktivity vody (Pipek, 1998).

Aplikace kyseliny mléčné na povrch masa vede ke snížení počáteční četnosti mikroorganismů a prodloužení nástupu logaritmické fáze jejich růstu (Pipek et al., 2005). Povrchový postřik kyselinou mléčnou má oproti jiným kyselinám tu výhodu, že je přirozenou složkou masa a neovlivňuje jeho organoleptické vlastnosti.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem bylo stanovení antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové (CA, C_{8:0}) a kyseliny mléčné na bakterii *Escherichia coli*. Pokus byl proveden celkem se čtyřmi koncentracemi kyseliny kaprylové: 1; 1.5; 2 a 2.5 % (w/v) a čtyřmi koncentracemi

kyseliny mléčné: 1,5; 2; 2,5 a 3 % (w/v). Zároveň byl proveden slepý pokus. Ke kultivaci byly použity dva typy živných médií: Plate Count Agar a Endo Agar.

Na živnou půdu bylo nejprve rozetřeno 300 μ l kyseliny kaprylové (mléčné) o dané koncentraci. Byla připravena základní suspenze kmene *E. coli* a z ní připraveno ředění 10^{-5} a 10^{-6} . Na půdu s kyselinou bylo očkováno 100 μ l daného ředění. Zároveň byl připraven kontrolní vzorek, který kyselinu neobsahoval. Vzorky byly inkubovány při 37°C po dobu 24 hodin.

VÝSLEDKY

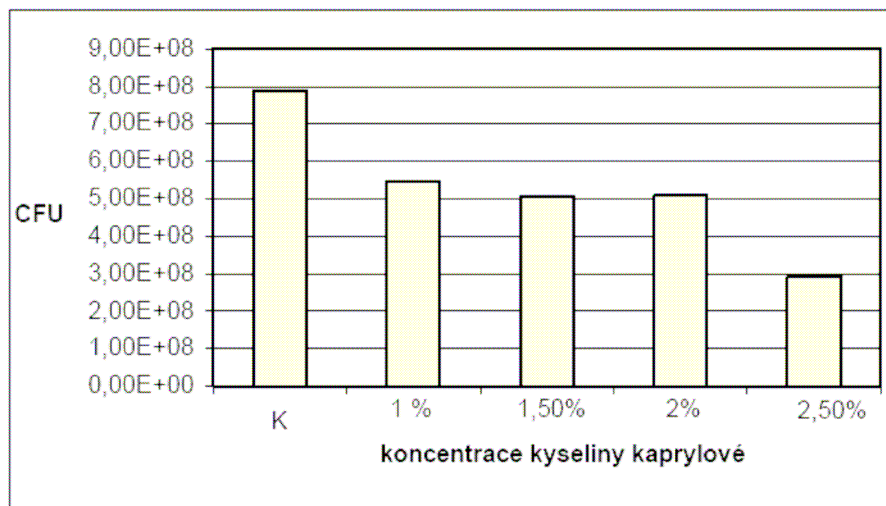
Vyhodnocení vzorků je uvedeno v tabulkách 1 a 2.

Na živné půdě PCA jsou výsledky prokazatelnější. Oproti kontrolnímu vzorku byl u vzorků, které obsahovaly organickou kyselinu zaznamenán zřetelný pokles počtu *E. coli*. S rostoucí koncentrací kyseliny kaprylové nebo mléčné ubýval počet bakterií. U nejvyšší koncentrace kyseliny kaprylové a mléčné byl oproti kontrole pokles největší. U koncentrací 1; 1,5 a 2 % (kyselina kaprylová) nebyl zaznamenán výraznější rozdíl v účinku na *E. coli*. Podobné výsledky byly zaznamenány i při experimentech s kyselinou mléčnou.

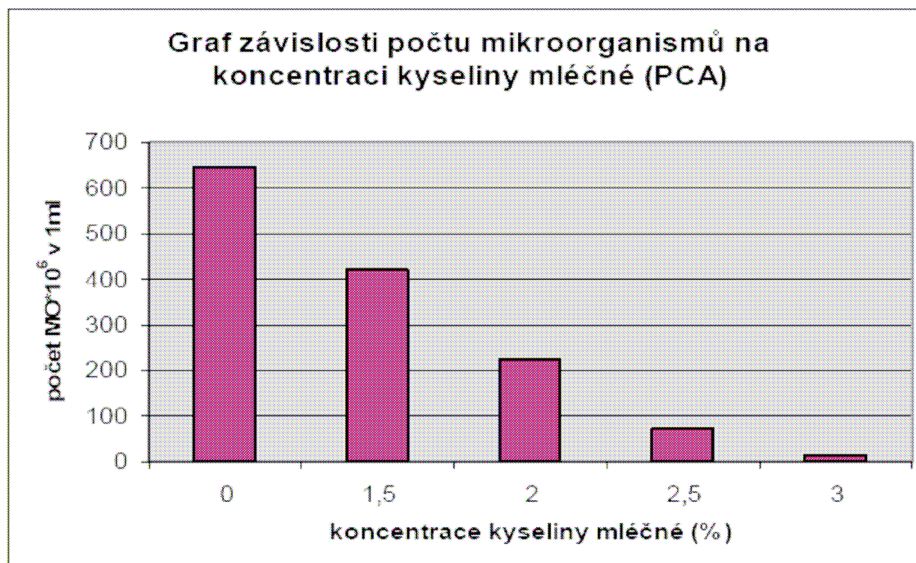
Při použití živné půdy Endo Agar nebyl úbytek *E. coli* tak značný jako v předchozím případě. I přesto však lze i zde pozorovat klesající tendenci.

Tabulka 1: Celkové počty mikroorganismů při aplikaci organických kyselin na PCA.

Koncentrace kyseliny	0% (kontrola)	1 %	1,5 %	2 %	2,5 %	3 %
CFU/ml (kys. kaprylová)	$7,86 \cdot 10^8$	$5,46 \cdot 10^8$	$5,07 \cdot 10^8$	$5,08 \cdot 10^8$	$2,91 \cdot 10^8$	-
CFU/ml (kys. mléčná)	$6,46 \cdot 10^8$	-	$4,22 \cdot 10^8$	$2,23 \cdot 10^8$	$7,4 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$



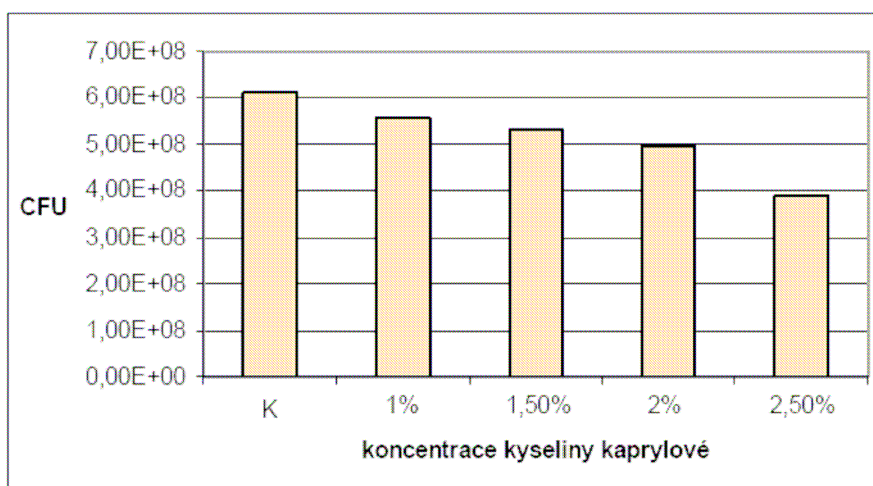
Obrázek 1: Závislost počtu mikroorganismů kultivovaných na PCA na koncentraci kyseliny kaprylové.



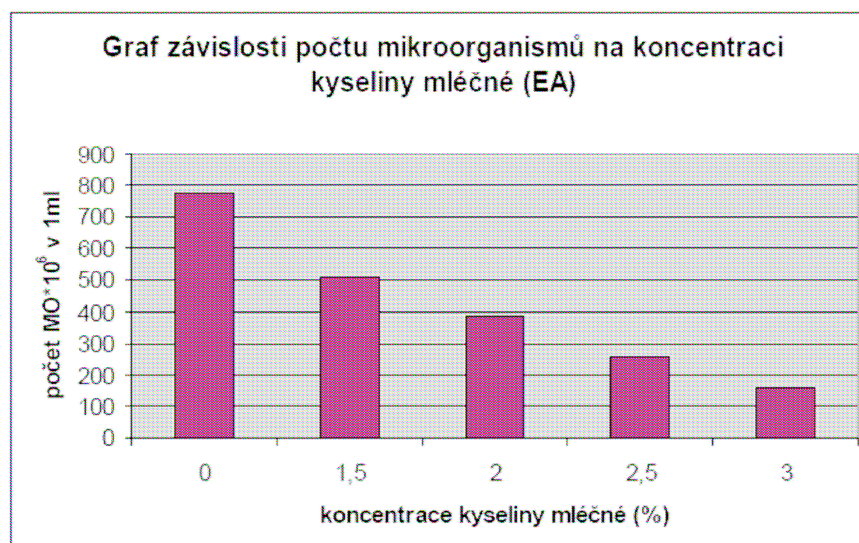
Obrázek 2: Závislost počtu mikroorganismů kultivovaných na PCA na koncentraci kyseliny mléčné.

Tabulka 2: Celkové počty mikroorganismů při aplikaci organických kyselin na Endo agaru.

Koncentrace kyseliny	0% (kontrola)	1 %	1,5 %	2 %	2,5 %	3 %
CFU/ml (kys. kaprylová)	6,12.10 ⁸	5,56.10 ⁸	5,33.10 ⁸	4,97.10 ⁸	3,89.10 ⁸	-
CFU/ml (kys. mléčná)	7,76.10 ⁸	-	5,08.10 ⁸	3,87.10 ⁸	2,57.10 ⁸	1,6.10 ⁸



Obrázek 3: Závislost počtu mikroorganismů kultivovaných na Endo agaru na koncentraci kyseliny kaprylové.



Obrázek 4: Závislost počtu mikroorganismů kultivovaných na Endo agaru na koncentraci kyseliny mléčné.

ZÁVĚR

Byl prokázán inhibiční účinek kyseliny kaprylové i kyseliny mléčné na růst bakterií *E. coli*. Aplikace organických kyselin vedla k poklesu počtu těchto bakterií. Kyseliny kaprylová a mléčná jsou pravděpodobně použitelné i pro některé další bakterie. Potenciálnímu použití přímo pro potravinářské výrobky však musí předcházet ještě senzorické studie.

LITERATURA

1. Food Safety : Report of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on benefits and limitations of antimicrobial treatments for poultry carcasses. Brussel : Food Safety, 30. října 1998 [cit. 4. února 2006]. Dostupné na internetu. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out14_en.html
2. Hinton, A. Jr, Ingram, K. D. 2000. Use of oleic acid to reduce the population of the bacterial flora of poultry skin. *Journal of Food Protection*. 63 (9), 1282-1286.
3. Nair, M.K.M., Vasudevan, P., Hoagland, T., Venkitanarayanan, K. 2004. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in milk by caprylic acid and monocaprylin. *Food Microbiology*. 21 (5), 611-616.
4. Nataro, J. P., Kaper, J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11, 142-201.
5. Pipek, P. 1998. Technologie masa II., Praha.
6. Pipek, P., Houška, M., Jeleníková, J., Kýhos, K., Hoke, K., Šikulová, M. 2005. Microbial Decontamination of Beef Carcasses by Combination of Steaming and Lactic Acid Spray. *Journal of Food Engineering*. 67 (3), 309-315.

Kontaktní adresa:

Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.; Ústav potravinářského inženýrství a chemie, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, náměstí T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín.

Příloha č. 27 Příspěvek konference: XV. konference mladých mikrobiologů
TOMÁŠKOVY DNY 2006, Brno



Vliv kyseliny mléčné na vybrané druhy mikroorganismů

M. Lukešová, L. Čechová, M. Janalíková, D. Kramářová

Ústav potravinářského inženýrství, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, CZ

Velkým zdravotním problémem dnešní doby je výskyt onemocnění způsobených mikroorganismy kontaminující potraviny. Proto jsme sledovali antibakteriální účinek kyseliny mléčné na tyto mikroorganismy. Kyselina mléčná je přírodní organická kyselina, kyselé chuti, lehce rozpustná, vzniká mléčným kvašením cukrů a je běžně používaným prostředkem v potravinářské výrobě.

Sledovali jsme vliv kyseliny mléčné a její nejnižší inhibiční koncentrace na tyto mikroorganismy: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus cereus*. Stanovení bylo provedeno inkubací v bujonech, použité koncentrace kyseliny mléčné byly od 0,1 do 1 %, u *B. subtilis* a *B. cereus* do 3 %.

Bylo zjištěno, že již aplikací 0,1% kyseliny dochází ke snížení CFU/ml všech sledovaných mikroorganismů. K absolutní inhibici *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* a *Staphylococcus aureus* dochází 0,5% kyselinou mléčnou. Růst bakterií *Salmonella typhimurium* a *Micrococcus luteus* byl inhibován 0,25% kyseliny a *Serratia marcescens* již při 0,125% koncentraci. Růst bacilů byl pozorován i při koncentracích kyseliny mléčné přesahující 2 %.