

EFFECT OF SODIUM PHOSPHATES ON SELECTED FOOD GRADE BACTERIA

Leona Buňková, Eva Lorencová, Dora Jurčová, František Buňka, Stanislav Kráčmar

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the inhibitory effect *in vitro* of selected sodium phosphates (under the corporate names Hexa 68, Hexa 70, Trikrystal, FST, Pyro 52, KPS, Didi) on selected gram-positive and gram-negative bacteria. Seven different concentrations of each phosphate were used. Sensitivity of the bacterial strains to phosphates was observed in broth supplemented with salts. *In vitro* was showed a negative effect of various phosphates on growth of selected gram-positive bacteria. Orthophosphates and diphosphates (pyrophosphates) did not have significant inhibitory effect on tested bacteria at neutral pH. With the exception of phosphate Trikrystal has not been found *in vitro* significant inhibitory effects on gram-negative bacteria.

Keywords: gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, sodium phosphate, antimicrobial effect

ÚVOD

Antimikrobní účinek fosforečnanů je chápán jako pozitivní vedlejší efekt aplikace těchto solí v potravinách. Inhibiční účinky fosforečnanů jsou popisovány především u grampozitivních bakterií, některých mikromycet a kvasinek (Buňková et al., 2008; Knabel et al., 1991; Loessner et al., 1997). U grampozitivních bakterií je inhibiční efekt závislý na délce řetězce (kondenzačním stupni) fosforečnanů. Fosforečnany s delšími řetězci mají lepší inhibiční účinky než fosforečnany s kratšími řetězci (Buňková et al., 2008; Maier et al., 1999; Loessner et al., 1997). Uvedená skutečnost souvisí se strukturou buněčné stěny a schopností zvláště polyfosforečnanů vyvazovat dvojmocné kationty (vápenaté a hořečnaté) (Maier et al., 1999; Buňka a Buňková, 2009). Antibakteriální efekt je dán hlavně porušením integrity buněčné stěny, přičemž zároveň dochází ke ztrátě osmoregulace a porušení selektivní permeability cytoplazmatické membrány. Toto působení v konečném důsledku znamená snížení metabolických funkcí vyplývajících z úniku substrátů. Fosforečnanové soli mohou rovněž znemožnit klíčení spor nebo negativně ovlivnit tvar a tvorbu septa při dělení buněk (např. u *Bacillus cereus*) (Matsuoka et al., 1995; Molins, 1991). Antimikrobní účinek fosforečnanů je do značné míry ovlivněn pH. Změna pH, která je indukována přidávkou fosforečnanů, může hrát roli při uplatnění sekvestrační schopnosti.

S rostoucím pH roste i tvorba komplexů. Fosforečnany, které vykazovaly alkalickou reakci v kultivačním médiu, mají vyšší inhibiční kapacitu. Nízká pH totiž způsobují protonizaci vazebných míst, čímž dochází ke ztuhlému poklesu žádaného sekvestračního účinku (Molins, 1991; Knabel et al., 1991). Inhibiční účinek fosforečnanů může být znehodnocen působením zářevu, který vyvolává jejich hydrolyzu. Rovněž některé bakterie disponují enzymy, které jsou schopny rozkládat fosforečnanové soli (Molins, 1991). Syrové, tepelně neupravené, potraviny disponují aktivní fosfatázou schopnou štěpit polyfosforečnany na nižší jednotky a zbavovat je tak sekvestračních účinků. Záhřevem dochází k její inaktivaci. Proto je pro zachování a maximalizaci inhibičního účinku fosforečnanových solí doporučován ihned po jejich přidání do potravinového výrobku tepelný záhřev (Knabel et al., 1991).

Kromě sledování vlivu polyfosforečnanů na růst mikroorganismů v laboratorních podmínkách byly také studovány jejich účinky na mikroorganismy v reálných potravinách. Molins et al. (1985) zjistili, že přidavek fosforečnanů může snížit počet bakterií *Clostridium sporogenes* na skladovaných masných výrobcích. V literatuře jsou rovněž popisovány inhibiční účinky polyfosforečnanů na bakterie, které mohou způsobit kažení mléčných potravin, zejména roztíratelných sýrových výrobků. Přídavek polyfosforečnanů u těchto výrobků může zpomalit nebo zabránit růstu nežádoucích bakterií tvořících spory (zejména klostridií), které se mohou podílet na kažení těchto výrobků tvorbou plynu, kyseliny máselné nebo produkcí toxinů (Borch a Lycken, 2007; Briozzo et al., 1983; Eckner et al., 1994; Loessner et al., 1997; Varga, 2005).

Cílem práce bylo v podmínkách *in vitro* popsat inhibiční vliv sedmi fosforečnanů v různém kondenzačním stupni na vybrané potravinářsky významné bakterie.

MATERIÁL A METODY

Pro dosažení cílů této práce byly využity následující kmeny bakterií získané z České sbírky mikroorganismů: *Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CCM 2216, *Citrobacter freundii* CCM 7187, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Escherichia coli* CCM 3954, *Micrococcus luteus* CCM 732, *Proteus mirabilis* CCM 7188, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953.

Pro přípravu bakteriální suspenze pro inokulaci k vlastnímu stanovení inhibičních účinků daných fosforečnanových solí bylo použito masopeptonového bujónu (MPB). Kultivace probíhala při 30 ± 1 °C po dobu 24 hodin.

Za účelem zjištění inhibičních účinků 7 fosforečnanových solí (polyfosforečnany Hexa 68 a Hexa 70, tripolyfosforečnan FST, pyrofosforečnany Pyro 52 a KPS, ortofosforečnany Didi a Trikrystal) byly připraveny jejich 10% (w/v) roztoky, které byly vysterilizovány filtrací. Fosforečnanové soli byly získány z Fosfa a.s., Břeclav-Poštorná.

Pro zjištění senzitivity jednotlivých bakteriálních kmenů bylo využito devíti koncentrací každé soli (0,1; 0,2; 0,3;

0,4; 0,5; 0,6; 0,75; 1,0; 2,0% w/v). Připravená kultivační média s různou koncentrací fosforečnanů byla dávkována v množství 200 µl do mikrotitrační destičky a zaočkována 5 µl suspenze bakterií. Jako pozitivní kontrola posloužilo kultivační médium bez fosforečnanů, negativní kontrola byla tvořena pouze připraveným MPB s fosforečnanem bez bakteriální suspenze.

Testované bakterie byly kultivovány při pokojové teplotě (25 ± 1 °C) za protřepávání po dobu 24 hodin. Bakteriální nárůst, resp. změna optické hustoty, byla měřena na přístroji TECAN Sunrise TW/TC při vlnové délce 600 nm ve 30 minutových intervalech. Z naměřených hodnot optické hustoty byl vypočítán průměr a poté byly sestrojeny růstové křivky (závislost optické hustoty na čase). Sestrojené křivky byly využity ke zjišťování růstových konstant.

VÝSLEDKY A DISKUSE

V experimentu byly provedeny testy na sledování inhibičních účinků sedmi fosforečnanových solí v podmínkách *in vitro* u pěti gram pozitivních (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. luteus* a *E. faecalis*) a pěti gram negativních bakterií (*E. coli*, *S. enterica*, *P. mirabilis*, *C. freundii* a *P. aeruginosa*) a to tak, že byl sledován jejich růst po dobu 24 hodin. Testované gram pozitivní a gram negativní bakterie byly vybrány tak, aby zahrnovaly bakterie, které mohou být kontaminanty potravinářských provozů a potravin, popř. bakterie, které mohou způsobovat onemocnění z potravin.

Pokud porovnáme účinky jednotlivých fosforečnanů na *B. cereus* CCM 2010 a *B. subtilis* CCM 2216, je zřejmé, že nejvyšší inhibiční efekt měly soli Hexa 68 a Hexa 70. Důvodem je pravděpodobně vysoký stupeň kondenzace těchto solí. Delší řetězec fosforečnanových solí disponuje zesílenou schopností vyvazovat divalentní kationty kovů a narušit tak integritu buněčných stěn či membrán nebo zasáhnout do metabolismu bakterií (Molins, 1991). *M. luteus* CCM 732 se jevil jako velmi citlivý na přítomnost polyfosforečnanů Hexa 68 a Hexa

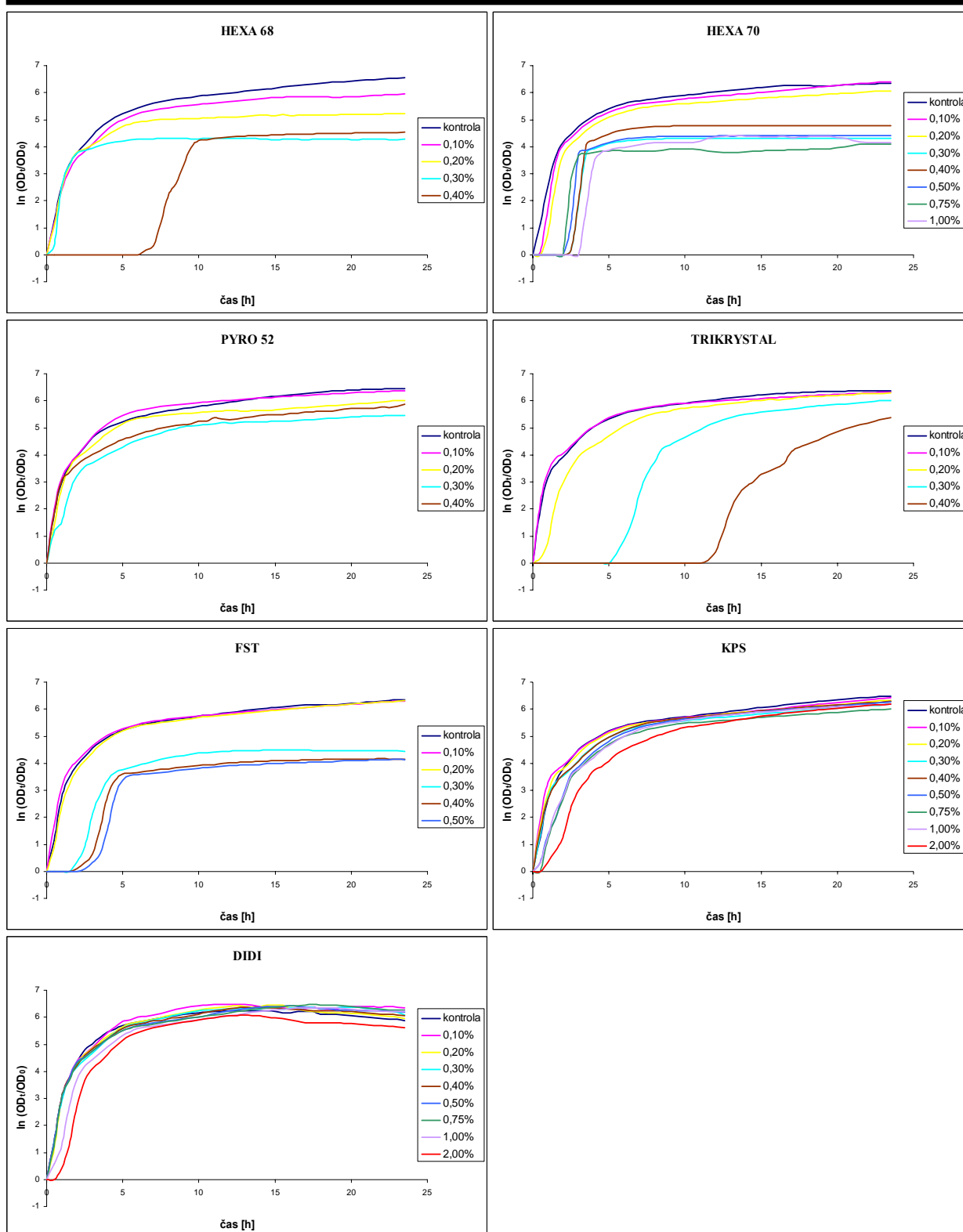
70, kdy již od 0,3% koncentrace byl spolehlivě znemožněn jakýkoliv nárůst. Stejněho účinku bylo dosaženo i u soli Pyro 52 (od 0,4 %). Soli Hexa 68, Pyro 52 a Trikystal od 0,5% obsahu vytvořily nevhodné podmínky pro rozvoj *S. aureus* CCM 3953 (obr. 1). FST znemožnil dělení bakterie při koncentracích 0,75 % a vyšších. Výsledky pyrofosforečnanu se shodují s jedním ze zdrojů, kdy se MIC *S. aureus* pohybuje okolo 0,5 % (Matsuoka et al., 1995).

V tabulce 1 jsou shrnuty inhibiční účinky testovaných fosforečnanů na vybrané gram pozitivní a gram negativní bakterie. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě minimálních inhibičních koncentrací (MIC), tj. nejnižších koncentrací, které zcela zastavily růst testovaných bakterií.

Sůl Trikystal svou přítomností posouvala pH kultivačního prostředí do silně alkalické oblasti (pH ~ 11). Ze všech fosforečnanů působila v podmínkách *in vitro* nejvíce inhibičně, a to na 9 z 10 testovaných bakterií. Vliv změny pH v souvislosti s působením alkalického fosforečnanu byl již zkoumán u bakterie *Salmonella* Enteritidis, kdy byl zaznamenán vysoký účinek dané soli od 1,5% obsahu v kultivačním prostředí (Sampathkumar et al. 2003). Nicméně v potravinách lze tuto sůl použít až po následné úpravě pH a lze tedy očekávat výraznější snížení inhibičních účinků. Tuto hypotézu potvrzují i antimikrobní účinky soli Didi, která je stejně jako Trikystal ortofosforečnan. Po přidavku soli Didi do kultivačního média se pH pohybovalo v rozsahu neutrálních hodnot a tato sůl tak nezpůsobila striktní inhibici ani při nejvyšším aplikovaném množství. Lze se tedy domnívat, že neutrální či mírně zásadité pH (okolo pH 7,5) nepodpoří tolik komplexotvornou schopnost fosforečnanů jako silně alkalické prostředí a inhibiční efekt daného fosforečnanu. Obdobné pH jako Didi vytvářela v kultivačním médiu i sůl FST. FST má však delší řetězec, který mohl u většiny gram pozitivních bakterií způsobit podstatně vyšší inhibici než u fosforečnanu tvořeného jednou monomerní jednotkou.

Tabulka 1: Minimální inhibiční koncentrace fosforečnanových solí u testovaných gram pozitivních a gram negativních bakterií

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



Obrázek 1: Vliv testovaných fosforečnanových solí na růst *Staphylococcus aureus* CCM 3953

Soli Didi a KPS u podstatné většiny testovaných gram pozitivních i gram negativních bakterií nezpůsobily žádný významnější pokles růstu. Výjimkou byl *E. faecalis* CCM 4224, kdy 2% koncentrace KPS v růstovém prostředí zabránila jakémukoliv projevu mikrobiální aktivity této bakterie. U ostatních sledovaných gram pozitivních bakterií došlo při této nejvyšší koncentraci k prodloužení doby lag fáze a snížení maximální hodnoty růstu. Důvodem je zřejmě pH, kdy

alkalické hodnoty kultivačního prostředí významně zvyšují komplexotvornou schopnost fosforečnanů (Molins, 1991; Knabel et al., 1991). Polyfosforečnany Hexa 68 a Hexa 70 velmi často efektivně potlačovaly růst u vybraných gram pozitivních bakterií při koncentracích do 1%. Většina sledovaných gram negativních bakterií významněji reagovala na přítomnost těchto solí až při nejvyšších zkoumaných koncentracích (2%), a to většinou pouze zpomalením růstu, úplné inhibice dosaženo nebylo.

Je nutné podotknout, že vyvozené závěry platí pro modelové podmínky *in vitro*. Zvláště pH potravin, do kterých jsou fosforečnany přidávány, může významně ovlivnit antimikrobní působení fosforečnanů.

ZÁVĚR

V podmínkách *in vitro* bylo prokázáno negativní působení sledovaných fosforečnanů v různém kondenzačním stupni na růstové chování vybraných bakterií. Výjimkou byly soli KPS a DIDI, které se projeví jako nejméně účinné. Výrazně citlivější k přítomnosti fosforečnanových solí byly gram pozitivní bakterie. Inhibiční působení fosforečnanových solí nespočívá jen v délce řetězce, ale závisí také na pH.

LITERATURA

BORCH, E., LYCKEN, L. 2007. Influence of long-chain polyphosphate and heat treatment on *Clostridium cochlearium* and *Clostridium sporogenes* isolated from processed cheese spread. In *Journal of Food Protection*, vol. 70, 2007, p. 744-747.

BRIOZZO, J., DE LAGARDE, E. A., CHIRIFE, J., PARADA, J. L. 1983. *Clostridium botulinum* type A growth and toxin production in media and process cheese spread. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 45, 1983, p. 1150-1152.

BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L. 2009. Úloha tavicích solí při výrobě tavených sýrů. In *Potravinářská revue*, vol. 4, 2009, no. 1, p. 13-16.

BUŇKOVÁ, L., PLEVA, P., BUŇKA, F., VALÁŠEK, P., KRÁČMAR, S. 2008. Antibacterial effects of commercially available phosphates on selected microorganisms. In *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, vol. 56, 2008, p. 19-24.

ECKNER, K. F., DUSTMAN, W. A., RYSRODRIGUEZ, A. A. 1994. Contribution of composition, physicochemical characteristics and polyphosphates to the microbial safety of pasteurized cheese spreads. In *Journal of Food Protection*, vol. 57, 1994, p. 295-300.

KNABEL, S., WALKER, H., HARTMAN, P. 1991. Inhibition of *Aspergillus flavus* and selected Gram-positive bacteria by chelation of essential metal cations by polyphosphates. In *Journal of Food Protection*, vol. 54, 1991, p. 360-365.

LOESSNER, M. J., MAIER, S. K., SCHIWEK, P., SCHERER, S. 1997. Long-chain polyphosphates inhibit growth of *Clostridium tyrobutyricum* in processed cheese spreads. In *Journal of Food Protection*, vol. 60, 1997, p. 493-498.

MAIER, S., SHERER, S., LOESSNER M., 1999. Long-chain polyphosphate cause cell lysis and inhibits *Bacillus*

cereus septum formation, which is dependent on divalent cations. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, 1999, no. 9, p. 3942-3949.

MATSUOKA, A., TSUTSUMI, M., WATANABE, F. 1995. Inhibitory effect of hexameta-phosphate on the growth of *Staphylococcus aureus*. In *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, vol. 5, 1995, p. 588-594.

MOLINS, R. 1991. *Phosphates in Food*. CRC Press, Inc.

MOLINS, R. A., KRAFT, A. A., WALKER, H. W., OLSON, D. G. 1985. Effect of poly- and pyrophosphates on the natural bacterial flora and inoculated *Clostridium sporogenes* PA 3679 in cooked vacuum packaged bratwurst. In *Journal of Food Science*, vol. 50, 1985, p. 876-880.

SAMPATHKUMAR, B., KHACHATOURIANS, G., KORBER, R. 2003. High pH during trisodium phosphate treatment causes membrane damage and destruction of *Salmonella enterica* ser. Enteritidis. In *Food & Nutrition Press*, vol. 69, 2003, no.1, p. 122-129.

VARGA, L., 2005. Use a long-chain polyphosphate mixture for shelf-life extension of processed cheese spreads. In *Acta Alimentaria*, vol. 34, 2005, p. 493-498.

Acknowledgments:

This study was supported by project MSM7088352101.

Contact address:

Leona Buňková, Department of Fat, Tenside and Cosmetics Technology. Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Czech Republic, Tel: 00420 576 031 232, E-mail: bunkova@ft.utb.cz

Eva Lorencová, Department of Fat, Tenside and Cosmetics Technology. Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Czech Republic, E-mail: lorkal@seznam.cz

František Buňka, Department of Food Technology and Microbiology. Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Czech Republic, E-mail: bunka@ft.utb.cz

Dora Jurčová, Department of Food Technology and Microbiology. Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Czech Republic, E-mail: d.jurcova@centrum.cz

Stanislav Kráčmar, Department of Food Biochemistry and Analysis. Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Czech Republic, E-mail: kracmar@ft.utb.cz