

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE
Ústav hygieny a technologie mléka

MIKROBIOLOGIE POTRAVIN
A MIKROBIOLOGICKÉ
LABORATORNÍ METODY.
OBECNÁ MIKROBIOLOGIE

MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.
MVDr. Lenka Necedová, Ph.D.
Mgr. Marta Dušková, Ph.D.

Tato skripta jsou spolufinancována z Operačního programu Vzdělávání pro konkurenceschopnost:

**„Inovace bakalářského a navazujícího magisterského studijního programu v oboru Bezpečnost a
kvalita potravin“**

(reg. č. CZ.1.07/2.2.00/28.0287)

OBSAH

1.	ÚVOD DO MIKROBIOLOGIE POTRAVIN (MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.)	8
1.1.	Významné historické milníky	8
1.2.	Základní pojmy	10
1.2.1.	Mikroorganismy a jejich postavení v systematice organismů	10
1.2.2.	Mikrobiologie – obsah studia a rozdělení na jednotlivé obory	11
1.3.	Výskyt a význam mikroorganismů	12
2.	TAXONOMIE PROKARYOT (MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.)	13
2.1.	Prokaryotní organismy	13
2.1.1.	Doména <i>Archaea</i>	13
2.1.2.	Doména <i>Bacteria</i>	13
2.2.	Taxonomie	14
2.2.1.	Taxonomická hierarchie prokaryot	14
2.2.2.	Klasifikace	15
2.2.3.	Nomenklatura	16
2.2.3.1.	Vědecké názvy bakterií	17
2.2.3.2.	Informační (triviální) názvy bakterií	17
2.2.4.	Identifikace	18
3.	KULTIVACE MIKROORGANISMŮ (MVDr. Lenka Necidová, Ph.D.)	19
3.1.	Kultivační média	19
3.2.	Metody kultivace mikroorganismů	19
3.2.1.	Kvantitativní metody	19
3.2.2.	Kvalitativní metody	20
3.3.	Podmínky kultivace	20
3.3.1.	Teplota	20
3.3.2.	Vztah ke kyslíku	21
3.3.3.	Relativní vlhkost	21
3.3.4.	Doba kultivace	21
4.	MORFOLOGIE BAKTERIÍ (MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.)	22
4.1.	Koky	22
4.2.	Tyčinky	23
4.3.	Vláknité a bizarní bakterie	23
5.	STAVBA BAKTERIÁLNÍ BUŇKY (MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.)	24
5.1.	Základní struktura	24
5.2.	Chemické složení	25
5.3.	Buněčná stěna	25
5.3.1.	Stavba buněčné stěny grampozitivních bakterií	27
5.3.2.	Stavba buněčné stěny gramnegativních bakterií	27
5.4.	Cytoplasmatická membrána	28
5.5.	Cytoplasma a struktury v ní uložené	29
5.5.1.	Jádro a plasmidy	30
5.5.1.1.	Jádro bakteriální buňky	30
5.5.1.2.	Plasmidy	31
5.5.2.	Ribosomy	31
5.6.	Bičíky	32
5.7.	Další povrchové struktury	33
5.7.1.	Pili (fimbrie)	33

5.7.2.	Pouzdro, glykokalyx, S-vrstva	34
5.8.	Bakteriální spory	34
5.8.1.	Tvorba spor – sporulace	35
5.8.2.	Klíčení spor – germinace	36
6.	GENETIKA BAKTERIÍ (Mgr. Marta Dušková, Ph.D.)	37
6.1.	Genetická informace a struktura nukleových kyselin	37
6.2.	Přenos genetické informace	38
6.2.1.	Transkripce	38
6.2.2.	Translace	39
6.3.	Geny	39
6.3.1.	Expresí genů	40
6.3.2.	Mobilní genetické elementy	41
6.4.	Mutace DNA	41
6.5.	Rekombinace	41
6.6.	Výměna genetické informace mezi bakteriemi	42
6.6.1.	Konjugace	42
6.6.2.	Transformace	43
6.6.3.	Transdukce	44
6.7.	Genové inženýrství	44
7.	RŮST A MNOŽENÍ BAKTERIÍ (MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.)	45
7.1.	Životní cyklus bakteriální buňky	46
7.1.1.	Replikace DNA	46
7.1.2.	Rozdělení buňky	47
7.2.	Růstová křivka bakteriální populace	47
7.2.1.	Standardní průběh růstové křivky	47
7.2.2.	Diauxie	48
7.3.	Kontinuální kultivace bakterií	49
7.4.	Planktonický růst a růst v podobě biofilmu	49
7.4.1.	Biofilmy	49
8.	VÝŽIVA BAKTERIÍ A PŘÍJEM ŽIVIN (MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.)	50
8.1.	Výživa bakterií	50
8.1.1.	Dělení bakterií podle způsobu získávání energie	50
8.1.2.	Dělení bakterií podle zdroje uhlíku	51
8.1.3.	Akceptory elektronů u chemotrofních bakterií	51
8.1.4.	Růstové faktory	52
8.2.	Příjem živin bakteriální buňkou	52
8.2.1.	Nespecifický transport	52
8.2.2.	Specifický transport	53
8.2.2.1.	Pasivní transport	53
8.2.2.2.	Aktivní transport	53
8.2.2.3.	Transport spojený s přeměnou transportované látky	54
8.2.3.	Příjem vysokomolekulárních látek	54
8.2.4.	Mechanismus vstupu antimikrobiálních látek	54
8.2.5.	Exkrece látek z bakteriální buňky	55
9.	METABOLISMUS BAKTERIÍ (MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.)	55
9.1.	Metabolismus chemotrofních bakterií – základní informace	56
9.1.1.	Katabolismus	56
9.1.2.	Anabolismus	57

9.1.3.	Bakteriální enzymy	58
9.1.3.1.	Oxidoredukční enzymy	58
9.1.3.2.	Extracelulární enzymy	58
9.2.	Energetický metabolismus chemoorganotrofních bakterií	59
9.2.1.	Fermentace	61
9.2.1.1.	Mléčné kvašení	61
9.2.1.2.	Ethanolové kvašení	62
9.2.1.3.	Produkce aromatických látek	62
9.2.1.4.	Propionové kvašení	62
9.2.1.5.	Kvašení bakterií rodu <i>Clostridium</i>	63
9.2.1.6.	Fermentace nevázaná na glykolýzu	63
9.2.2.	Aerobní respirace	64
9.2.2.1.	Krebsův cyklus	64
9.2.2.2.	Pentózový cyklus	64
9.2.2.3.	Elektrontransportní systém (respirační řetězec)	65
9.2.2.4.	Tvorba ATP na membránové úrovni (membránová fosforylace)	65
9.2.3.	Anaerobní respirace	66
9.2.3.1.	Nitrátová respirace	66
9.2.3.2.	Další typy anaerobní respirace	67
9.3.	Vstup substrátů do katabolismu chemoorganotrofních bakterií	67
9.3.1.	Vstup sacharidů a polysacharidů	67
9.3.1.1.	Disacharidy a oligosacharidy	67
9.3.1.2.	Polysacharidy	68
9.3.2.	Vstup lipidů	68
9.3.3.	Vstup aminokyselin a bílkovin	69
9.3.3.1.	Aminokyseliny	69
9.3.3.2.	Peptidy a bílkoviny	69
9.4.	Anabolismus chemoorganotrofních bakterií	69
9.4.1.	Tvorba malých molekul	70
9.4.2.	Tvorba makromolekul	70
10.	FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PŘEŽÍVÁNÍ MIKROORGANISMŮ V POTRAVINÁCH (MVDr. Lenka Necidová, Ph.D.)	71
10.1.	Vnitřní faktory	72
10.1.1.	Složení potravin	72
10.1.2.	Koncentrace vodíkových iontů – pH	73
10.1.3.	Aktivita vody – a_w	74
10.1.4.	Oxidačně redukční potenciál prostředí – E_h	76
10.1.5.	Textura potravin	78
10.1.6.	Obsah přirozených antimikrobiálních látek	78
10.2.	Vnější faktory	78
10.2.1.	Teplota prostředí	78
10.2.1.1.	Vliv vysokých teplot	79
10.2.1.2.	Vliv nízkých teplot	80
10.2.2.	Složení atmosféry	81
10.2.3.	Relativní vlhkost prostředí	81
10.2.4.	Čas	81
10.3.	Další faktory	82
10.3.1.	Záření	82
10.3.2.	Hydrostatický tlak	82
10.3.3.	Elektrický proud	82

10.3.4.	Ultrazvuk	82
10.3.5.	Mechanické vlivy	83
11.	TEORIE PŘEKÁŽEK, PREDIKTIVNÍ MIKROBIOLOGIE	
	(MVDr. Lenka Necidová, Ph.D.)	83
11.1.	Teorie překážek	83
11.2.	Prediktivní mikrobiologie	85
12.	VZTAHY MEZI MIKROORGANISMY	
	(MVDr. Šárka Bursová, Ph.D., MVDr. Lenka Necidová, Ph.D.)	86
12.1.	Neutrální a pozitivní vztahy	86
12.2.	Negativní vztahy	87
13.	VLIV SANITACE NA MIKROORGANISMY V POTRAVINÁCH	
	(MVDr. Šárka Bursová, Ph.D., MVDr. Lenka Necidová, Ph.D.)	88
13.1.	Mechanismy účinku desinfekčních látek	89
13.2.	Základní skupiny desinfekčních látek	89
13.2.1.	Kyseliny a zásady	89
13.2.2.	Oxidy	90
13.2.3.	Halogeny	90
13.2.3.1.	Chlorové preparáty	90
13.2.3.2.	Jodové preparáty	91
13.2.4.	Oxidační činidla	91
13.2.5.	Alkylační činidla a cyklické sloučeniny	92
13.2.6.	Alkoholy	92
13.2.7.	Sloučeniny těžkých kovů	92
13.2.8.	Povrchově aktivní látky	93
14.	INDIKÁTOROVÉ MIKROORGANISMY (MVDr. Lenka Necidová, Ph.D.)	93
14.1.	Celkový počet mikroorganismů	94
14.2.	Bakterie čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	95
14.3.	Koliformní bakterie	95
14.4.	<i>Escherichia coli</i>	96
14.5.	<i>Enterococcus spp.</i>	97
14.6.	Další indikátorové mikroorganismy	97
15.	KVASINKY A JEJICH VÝZNAM V POTRAVINÁŘSTVÍ	
	(MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.)	98
15.1.	Základní charakteristika	98
15.1.1.	Růstové nároky	98
15.1.2.	Morfologie kvasinek	98
15.1.3.	Stavba buňky kvasinek	99
15.1.3.1.	Buněčná stěna	99
15.1.3.2.	Cytoplasmatická membrána	100
15.1.3.3.	Cytoplasma a struktury v ní uložené	100
15.1.3.4.	Jádro	100
15.2.	Rozmnožování kvasinek	101
15.2.1.	Vegetativní rozmnožování	101
15.2.2.	Pohlavní rozmnožování	102
15.2.2.1.	Tvorba endospor	102
15.2.2.2.	Tvorba exospor	103
15.3.	Výskyt kvasinek a jejich význam v potravinářství	103

16.	PLÍSNĚ A JEJICH VÝZNAM V POTRAVINÁŘSTVÍ	
	(MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.)	105
16.1.	Základní charakteristika	105
16.1.1.	Růstové nároky	105
16.1.2.	Morfologie plísní	105
16.1.3.	Stavba buňky plísní	106
16.1.3.1.	Buněčná stěna	106
16.2.	Rozmnožování plísní	106
16.2.1.	Vegetativní rozmnožování	106
16.2.1.1.	Vegetativní exospory	106
16.2.1.2.	Vegetativní endospory	107
16.2.2.	Pohlavní rozmnožování	108
16.3.	Výskyt plísní a jejich význam v potravinářství	108
16.4.	Mykotoxiny (Mgr. Marta Dušková, Ph.D.)	111
16.4.1.	Producenti mykotoxinů	111
16.4.2.	Účinky mykotoxinů	112
16.4.3.	Mykotoxikózy	112
	Použitá literatura	113

PŘEDMLUVA

Mikroorganismy jsou všudypřítomné a jejich role při výrobě a uchovávání potravin, ať již pozitivní či negativní, je zcela zásadní. Pracovníci, kteří vstupují do potravinového řetězce, buď jako výrobci či prodejci nebo jako zástupci dozorových orgánů, by proto měli být o problematice mikroorganismů alespoň v základních rysech informováni. To bezesbýtku platí pro absolventy bakalářského, ale i navazujícího magisterského studijního programu Bezpečnost a kvalita potravin realizovaného na Fakultě veterinární hygieny a ekologie Veterinární a farmaceutické univerzity Brno.

Učební text je určen přednostně studentům bakalářského studijního programu, pro něž je předmět Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody jediným studijním předmětem, který je komplexním způsobem seznamuje s problematikou mikroorganismů, jejich vlivu na potraviny a také s metodami používanými při mikrobiologickém vyšetření potravin a potravinových surovin. Cílem tohoto učebního textu je poskytnout studentům základní informace o mikroorganismech, a to se zřetelem na vlastnosti a charakteristiky významné zejména z pohledu potravinářské mikrobiologie. Po stručném úvodu a historickém přehledu jsou uvedeny stěžejní oblasti obecné mikrobiologie – taxonomie prokaryot, kultivace mikroorganismů, morfologie mikroorganismů, stavba bakteriální buňky, genetika bakterií, růst, množení, výživa a metabolismus bakterií. Následuje část týkající se přežívání mikroorganismů v potravinách – vliv vnitřních a vnějších faktorů, teorie překážek, prediktivní mikrobiologie, vztahy mezi mikroorganismy a vliv sanitačních prostředků na mikroorganismy v potravinách. Pozornost je věnována také problematice indikátorových mikroorganismů a potravinářsky významným kvasinkám a plísním.

Závěrem bychom rády poděkovaly recenzentům Mgr. Andree Vávrové, Ph.D. a Prof. MVDr. Aloisi Čížkovi, CSc. za kritické a konstruktivní připomínky.

Autorky

1. ÚVOD DO MIKROBIOLOGIE POTRAVIN

1.1. Významné historické milníky

První významný zlom, umožňující rozvoj mikrobiologie jako vědního oboru, představoval bezesporu **vynález mikroskopu**. Již koncem 15. století sestrojil *Zacharias Janssen* velmi jednoduchý složený mikroskop kombinující dvě čočky. Podobný aparát zvaný „*Occiale*“ sestavil v roce 1610 toskánský astronom a vědec *Galileo Galilei*. Termín „mikroskop“ byl poprvé použit v roce 1625. Angličan *Robert Hooke* ve své publikaci *Micrographia*, vydané v roce 1665, jako první zavedl pojem „buňka“ jako označení pro nejmenší jednotku života a publikoval řadu mikroskopických pozorování buněčných struktur rostlin a kvasinek. Za největšího průkopníka mikroskopie a „otce mikrobiologie“ je považován nizozemský obchodník *Antoni van Leeuwenhoek* (1632 – 1723), který sestrojil řadu jednoduchých mikroskopů a jako první pozoroval živé mikroorganismy – tzv. „*Animalcules*“ (prvky, plísně, kvasinky a bakterie) v různých vzorcích (voda, sliny, zubní povlak, atd.). Detailní pozorování jejich tvaru, velikosti a pohyblivosti opakovaně publikoval v letech 1673 – 1723 ve svých dopisech Královské společnosti v Londýně, přičemž *první pozorování bakterií* je datováno 24. dubna 1676. Další studium mikroorganismů bylo podmíněno vyvinutím výkonného složeného mikroskopu asi o 200 let později v 19. století.

Vynález mikroskopu a následné objevení mikroorganismů významně ovlivnilo náhled na vznik života na Zemi. Ještě před objevením mikroorganismů zpochybnil **teorii abiogeneze** (tzv. samooplození, vznik živého z neživého) ital *Francesco Redi* (1626 – 1698) svým tvrzením, že larvy nevznikají spontánně z rozkládajícího se masa, ale z vajíček nakladených mouchami. V roce 1776, sto let po objevení mikroorganismů, *Lazzaro Spallanzani* (1729 – 1799) experimentálně prokázal, že masový vývar neprodyšně uzavřený a převařený ve vhodné nádobě se nekazí a nelze v něm nalézt mikroorganismy (**objev sterilizace a výroby konzerv**). Jeho odpůrci však tvrdili, že ke spontánnímu vzniku mikroorganismů nedošlo právě kvůli nepřístupu vzduchu, který je k samooplození nezbytný. Teorii abiogeneze definitivně vyvrátil až v roce 1859 francouzský biolog, chemik a lékař *Louis Pasteur* (1822 – 1895), který ve svých baňkách „s labutím hrdlem“ (hrdlo esovitého tvaru) udržel tekutinu sterilní, i když byly vůči vzduchu otevřeny. Příčinou zachování sterility byla gravitace nedovolující mikroorganismům, při vyloučení vzdušného proudění, v úzkém prostoru pronikat vzhůru. Tento princip je dodnes využíván při kultivaci mikroorganismů v Petriho miskách.

Louis Pasteur byl jedním z velikánů zlaté éry mikrobiologie (1857 – 1914). Další významnou oblastí jeho výzkumu bylo studium **fermentace**. První proces fermentace způsobený kvasinkami popsal v roce 1837 německý anatom a histolog *Friedrich Theodor Schwann* (1810 – 1882), v té době však jeho pozorování vědecká obec nepřijala. Právě Pasteur v roce 1857 prokázal, že kvašení je projevem činnosti mikroorganismů a různé mikroorganismy mohou způsobovat různé typy kvašení (alkoholové, mléčné, máselné či octové). Současně vypracoval účinný způsob tepelné ochrany potravin před kažením – **pasterizaci**.

Prokázaná schopnost mikroorganismů vyvolávat fyzikálně-chemické změny organického materiálu vedla k teorii, že podobné změny mohou mikroorganismy vyvolávat také u rostlin a živočichů a být tak **původci onemocnění člověka**. Jedním z prvních, kdo tuto teorii uplatnili v lékařské praxi, byl anglický lékař *Joseph Lister* (1827 – 1912), který vytvořil koncept aseptické chirurgie (tzv. antiseptiky), kdy k mytí rukou a ošetření chirurgických ran používal kyselinu karbolovou (fenol) a tím výrazně snížil pooperační komplikace a úmrtnost pacientů. Problematikou možného přenosu onemocnění prostřednictvím rukou lékařů se zabýval i rakouský porodník *Ignác Semmelweis* (1818 – 1865), jeho hygienická opatření na porodních sálech vedla ke snížení výskytu tzv. horečky omladnic a tím i úmrtnosti matek po porodu.

Nezvrtné důkazy o tom, že bakterie jsou etiologickým agens některých nemocí, přinesl německý lékař a mikrobiolog *Robert Koch* (1843 – 1910), významný vědec a nositel Nobelovy ceny za fyziologii a lékařství (1905). Koch objevil původce antraxu (*Bacillus anthracis*), tuberkulózy (*Mycobacterium tuberculosis*, „Kochův bacil“) a řadu dalších patogenních bakterií, a vypracoval tzv. **Kochovy postuláty** – soubor pravidel a postupů při prokazování příčinné souvislosti mezi předpokládaným původcem onemocnění a vlastním onemocněním, které se v medicíně používají dodnes. Jejich znění je následující: 1) původce (bakterie) musí být přítomen v každém případě nemoci, 2) musí být izolovatelný v čisté kultuře, 3) naočkování čisté kultury původce do zdravého pokusného zvířete musí vyvolat onemocnění se stejnými klinickými příznaky a 4) z infikovaného a nemocného zvířete musí být izolován mikroorganismus identický s tím, který byl izolován z původního nemocného jedince. Kochovy jedinečné objevy byly podmíněny jeho prací v oblasti kultivace mikroorganismů – jako první začal k pěstování mikroorganismů používat *agarová živná média* umožňující jejich růst ve formě kolonií (práce s čistou kulturou) a vyvinul řadu postupů fixace a barvení mikroskopických preparátů.

Anglický lékař *Edward Jenner* (1749 – 1823) ve své venkovské praxi pozoroval, že u dojičů, přicházejících do styku s kravskými neštovicemi, dochází pouze k mírné infekci a následně již neonemocní pravými neštovicemi. Na základě tohoto pozorování vyvinul v roce 1796 první způsob preventivního očkování – tzv. **vaksinaci** (z latinského *vacca* – kráva), kdy hnis z vřidků kravských neštovic očkovoal do narušené kůže na paži. V roce 1880 Louis Pasteur objevil základní mechanismus vakcinace, když pozoroval, že opakovaným pasážováním v laboratorních podmínkách se původce cholery drůbeže stává avirulentní (ztrácí schopnost vyvolat onemocnění), ale může vyvolat imunitní odpověď proti divoké virulentní formě původce.

Na přelomu 19. a 20. století byla také objasněna řada významných procesů probíhajících v půdě, jejich autorem byl ruský mikrobiolog *Sergej Nikolajevič Vinogradskij* (1856 – 1953). Vinogradskij izoloval nitrifikační bakterie, objevil siřné a železité bakterie a dusík fixující anaeroby, identifikoval bakterie zodpovědné za aerobní rozklad celulosy a zformuloval základní **principy koloběhu látek v přírodě**. Díky studiu půdních bakterií objevil **chemolitotrofii** (chemoautotrofii) – tedy způsob výživy, kdy bakterie získávají základní prvky nezávisle na organických látkách a zdrojem energie je oxidace anorganických látek.

Objevení prvních **antibiotik** je datováno do období mezi dvěma světovými válkami. V roce 1928 objevil, do jisté míry náhodou, skotský lékař *Alexander Fleming* (1881 – 1955) penicilin – produkt plísně *Penicillium notatum*, k jehož masivnějšímu použití však došlo až po roce 1940. Za objev penicilinu obdržel Fleming v roce 1945 spolu se svými spolupracovníky Nobelovu cenu. Významnou postavou tohoto období byl také americký biochemik a mikrobiolog *Selman Abraham Waksman* (1888 – 1973), objevitel řady antibiotik, mimo jiné i streptomycinu – prvního efektivního léku proti tuberkulóze (1952 – Nobelova cena za fyziologii a medicínu). Waksman také jako první zavedl pojem „antibiotikum“ pro látky produkované mikroorganismy, které potlačují či usmrcují mikroorganismy jiné.

Od roku 1942 se datuje používání živných médií složených pouze z chemicky definovaných sloučenin o známé koncentraci, a to zásluhou francouzského biochemika a mikrobiologa, později i molekulárního genetika *Jacquese Luciena Monoda* (1910 – 1976). Monod zjistil, že optická denzita bakteriální suspenze (zakalení živného média) je přímo úměrná koncentraci biomasy bakterií, dále zavedl provzdušňování při kultivaci bakterií a formuloval základní zákony o výživě bakterií, jejich růstu a množení. Později se věnoval studiu molekulární biologie, je laureátem Nobelovy ceny za objev genetické regulace syntézy bílkovin (1965).

Předmětem zájmu mikrobiologů nebyly svého času pouze bakterie. První **virus** pozoroval již v roce 1886 *John Brown Buist* (1846 – 1915), o šest let později, v roce 1892, popsal *Dmitrij Ivanovskij* (1864 – 1920) první patogenní virus – virus tabákové mozaiky, v letech 1915 – 1917 byly objeveny první bakteriofágy (bakteriální viry).

Těmito objevy samozřejmě historie mikrobiologie nekončí. Po skončení druhé světové války došlo k významným objevům v oblasti **molekulární biologie a genového inženýrství**, které významně zasáhly i do studia mikroorganismů. Namátkou lze jmenovat například objev sekundární struktury DNA (*James D. Watson* a *Francis Crick*, 1953), vývoj postupu sekvenace DNA (1975 – 1977) či objev polymerázové řetězové reakce (*Kary Mullis*, 1985).

1.2. Základní pojmy

1.2.1. Mikroorganismy a jejich postavení v systematice organismů

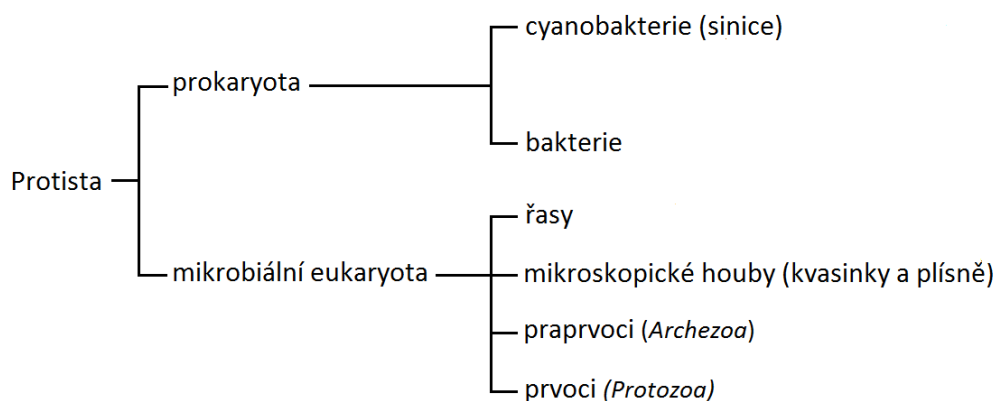
Jako **mikroorganismy** označujeme jednobuněčné nebo vícebuněčné organismy, které nejsou schopny tvořit funkčně diferenciované tkáně či pletiva. Společným znakem jsou velmi malé rozměry jejich těl pozorovatelné mikroskopicky (řecky *mikros* – malý). Od rostlin a živočichů se odlišují také tím, že při jejich studiu zpravidla nestudujeme vlastnosti jednoho jedince, ale celé populace daného druhu. To vyžaduje velmi specifické metodické postupy umožňující jejich pomnožení a tím i zesílení jejich životních projevů na pozorovatelnou úroveň.

Díky své velikosti jsou mikroorganismy pozorovatelné pouze ve světelném či elektronovém mikroskopu. Pouhým okem můžeme sledovat pouze jejich velké populace v živném prostředí (zákal, sediment či povrchová blanka v tekutinách a souvislý povlak či jednotlivé kolonie na pevných půdách).

Vžité dělení živých organismů podle organizace jejich buňky je na organismy **prokaryotní** (nadříše *Procaryotae* – prvojaderní, náleží do ní pouze bakterie a sinice) a **eukaryotní** (nadříše *Eucaryotae* – jaderní, zahrnuje ostatní organismy). Rozdíly mezi prokaryoty a eukaryoty jsou zcela zásadní, mezi oběma typy buněk neexistují žádné přechodné formy.

Hlavní charakteristiky odlišující prokaryota od eukaryot jsou:

1. *organizace buněčného jádra* – jádro prokaryot není odděleno od cytoplasmy membránou a tvoří je jediná cirkulární molekula DNA (bakteriální chromosom); prokaryotní buňka je haploidní a množí se pouze nepohlavně (nezná mitosu ani meiosu);
2. *nepřítomnost buněčných organel* – v prokaryotní buňce nejsou žádné membránou ohraničené organely (mitochondrie, chloroplasty, endoplasmatické retikulum, atd.); jedinou membránou je cytoplazmatická membrána na povrchu cytoplazmy;
3. *vlastnosti ribosomů* – ribosomy prokaryot se liší od ribosomů eukaryot velikostí, hmotností a dalšími funkčními a stavebními vlastnostmi.



Obrázek 1: Rozdělení mikroorganismů. (Šilhánková, 2002 – upraveno)

Ernst Heinrich Haeckel v roce 1866 rozdělil živé organismy na tři biologické říše: rostliny, živočichy a **protista** (řecky *protos* – první a *protistos* – nejprvnější či první ze všeho), kam spadají právě mikroorganismy. Do říše protista jsou zařazeny organismy prokaryotní – sinice a bakterie, i eukaryotní – řasy, mikroskopické houby a prvoci (viz obrázek 1).

Studiem sinic a bakterií se zabývá bakteriologie, řasy zkoumá algologie, předmětem studia mykologie jsou houby, ovšem s výjimkou mikroskopických hub, které zkoumá mikrobiologie, naukou o prvocích je protozoologie.

Zvláštní a velmi diskutované postavení mezi organismy mají **viry** (nadříše *Subcelulata* – nebuněční), které také bývají přiřazovány k mikroorganismům. Viry jsou nebuněčné organismy stojící na rozhraní mezi živou a neživou přírodou. Můžeme je definovat jako diskrétní jednotku živé hmoty, která obsahuje genetickou informaci (DNA nebo RNA), obalové struktury a je schopna evoluce. Množení jsou viry schopny pouze za použití enzymových systémů a energie hostitelských buněk (lze je označit za parazity na genetické úrovni). Studiem virů se zabývá virologie, která bývá často stavěna mimo mikrobiologii, mikrobiologie obvykle studuje pouze **bakteriofágy** (viry bakterií) a **mykoviry** (viry nižších hub).

Zcela unikátní a obtížně zařaditelné jsou potom další formy živé hmoty – viroidy a priony. **Viroidy** (též *satelity* – satelitní nukleové kyseliny) jsou holé, jednořetězcové kruhové molekuly RNA, které na rozdíl od virů nemají bílkovinný obal. Jedná se o infekční částice způsobující onemocnění rostlin (např. brambor, chmele, rajčat či okurek). **Priony** jsou proteinové infekční částice způsobující degenerativní změny v centrální nervové soustavě (např. scrapie – klusavka ovcí a koz, BSE – bovinní spongiformní encefalopatie neboli „nemoc šílených krav“, Creutzfeld-Jakobova nemoc).

1.2.2. Mikrobiologie – obsah studia a rozdělení na jednotlivé obory

Mikrobiologie je tedy zjednodušeně nauka o mikroorganismech a je vedle botaniky a zoologie třetí hlavní biologickou vědou. Zabývá se studiem vlastností a činností mikroorganismů včetně metod jejich detekce.

Základním oborem mikrobiologie je **obecná mikrobiologie**, která se zabývá studiem obecných vlastností mikroorganismů – morfologií, cytologií, taxonomií, fyziologií, biochemií a genetikou. Obecná mikrobiologie má úzký vztah k dalším vědním oborům, jako je biochemie, genetika či molekulární biologie. Dalším oborem je **mikrobiologie speciální**, která popisuje a charakterizuje jednotlivé mikrobiální druhy.

Poznatky obecné mikrobiologie jsou dále využívány v různých oborech **aplikované mikrobiologie**, které studují úlohu mikroorganismů v konkrétní oblasti. Mezi nejvýznamnější aplikované obory patří lékařská mikrobiologie, veterinární mikrobiologie, zemědělská mikrobiologie, mikrobiologie životního prostředí a technická (někdy též průmyslová) mikrobiologie. Posledně jmenovaný obor zahrnuje mimo jiné i mikrobiologii potravinářskou.

Potravinářská mikrobiologie má poměrně široký rozsah. Mimo vlastní mikrobiologii potravin sem řadíme i mikrobiologii předmětů denního užívání a mikrobiologii prostředí potravinářských podniků. Potravinářská mikrobiologie je úzce spjatá s dalšími mikrobiologickými obory, zejména mikrobiologií zemědělskou, veterinární a lékařskou, či mikrobiologií vody a půdy.

Oblastí studia potravinářské mikrobiologie jsou mikroorganismy, které se používají při výrobě potravin, působí kažení potravin a předmětů denního užívání a patogenní mikroorganismy přenášené potravinami a schopné vyvolat alimentární onemocnění. Speciální pozornost je věnována vytváření vhodných podmínek pro využití kulturních mikroorganismů v různých odvětvích potravinářského průmyslu.

Mikrobiologie potravin posuzuje a zkoumá vliv mikroorganismů na potraviny v průběhu celého potravinového řetězce („*from farm to table*“). Na základě získaných poznatků nás učí vytvářet příznivé podmínky pro výrobu potravin a naopak zabránit nežádoucímu vlivu mikroorganismů na potraviny a člověka.

Potravinářskou mikrobiologii můžeme rozdělit na statickou a dynamickou. **Statická potravinářská mikrobiologie** je zaměřena na stanovení a sledování mikrobiologických znaků potravin, předmětů denní potřeby a prostředí potravinářských provozů, které jsou dány příslušnými legislativními předpisy. Na její realizaci se podílí podnikové laboratoře, akreditované zkušební laboratoře a kontrolní orgány.

Dynamická potravinářská mikrobiologie zkoumá změny počtu a zastoupení mikroorganismů a jimi způsobené fyzikální, chemické a senzorické změny potravin a předmětů denní potřeby, příp. i prostředí potravinářských podniků, které vznikají vlivem vnitřních a vnějších faktorů zkoumaných objektů. Na její realizaci se podílí výzkumná a vědecko-pedagogická pracoviště.

1.3. Výskyt a význam mikroorganismů

Mikroorganismy jsou všudypřítomné, vyskytují se ve všech částech přírody (nejvíce ve vodě, půdě a vzduchu) a také v tělech ostatních živých organismů – rostlin, živočichů i člověka. Jsou jedním z hlavních činitelů, kteří ovlivňují tvorbu a zachování životního prostředí na naší planetě. Objevují se v mírném pásu, subtropických i tropických oblastech i na tak extrémních místech jako jsou zemské póly, hlubiny moří, horká zřídla či solná jezera.

Mikroorganismy stojí na samém vrcholu potravní pyramidy. Díky své rozkladné činnosti jsou schopny využít organické (organotrofie; humifikace) a anorganické (litotrofie; mineralizace) látky až na jednotlivé anorganické prvky a navracet je tak zpět do přírody – **koloběh prvků v přírodě**. Tato rozkladná činnost neprobíhá pouze v půdě, ale také ve vodním prostředí, kde jsou mikroorganismy hlavní součástí systému **samočištění vodních toků**. V podstatě stejné pochody jsou potom využívány také při **biologickém čištění odpadních vod**.

Velkou roli hrají mikroorganismy při **výrobě potravin**, tradičně v mlékárenství a kvasném průmyslu, ale i dalších odvětvích (masný průmysl, konzervárenství, pekařská výroba, atd.). Uplatnění nachází také v zemědělství (výroba fermentovaných krmiv, fixace dusíku, produkce bioinsekticidů), farmaceutickém průmyslu (produkce antibiotik, organických kyselin, vitamínů a enzymů), kosmetickém průmyslu a řadě dalších. Díky své velmi rychlé a intenzivní proteosyntéze mohou být mikroorganismy využity i jako **zdroj plnohodnotných bílkovin** při zajišťování výživy lidstva.

Činnost mikroorganismů však nepřináší pouze pozitiva. Asi nejzávažnějším negativem je výskyt **patogenních mikroorganismů** schopných vyvolávat onemocnění rostlin, živočichů i člověka, často s velmi závažným až fatálním průběhem. **Rozkladná činnost** mikroorganismů způsobuje nejen kažení potravin, ale také znehodnocení řady materiálů (papíru, textilií, kůže, dřeva, některých plastů, organických nátěrů, atd.) – někdy označováno jako tzv. mikrobiální koroze.

2. TAXONOMIE PROKARYOT

2.1. Prokaryotní organismy

Podstatnou část mikroorganismů tvoří organismy prokaryotní, jejichž buňky se svou stavbou a dalšími znaky výrazně odlišují od organismů eukaryotních (viz kapitola 5.1.). Prokaryotní typ buňky sdílejí dvě rozdílné skupiny organismů – doména *Archaea* a doména *Bacteria*.

2.1.1. Doména *Archaea*

V doméně *Archaea* jsou sdruženy organismy vyskytující se v různých extrémních podmínkách ve vodě i na souši (tzv. *extrémofilové*), např. v prostředích hyperslaných, hydrotermálně či geotermálně vyhřívaných či anaerobních. Mezi archaea patří zejména methanogenní bakterie, extrémně halofilní či thermoacidofilní bakterie. Někteří zástupci jsou součástí mikroflóry střevního traktu živočichů. Jedinečným biochemickým znakem této domény je přítomnost *etherové vazby* mezi glycerolem a vyššími mastnými kyselinami u lipidů v plasmatické membráně (u bakterií je vazba esterová). V buněčné stěně postrádají archaea murein (obsahují pseudomurein) a proto nejsou citlivé k β -laktamovým antibiotikům. Tvar buněk je velmi rozmanitý, množí se hlavně příčným dělením, ale i pučením, zaškrcením nebo fragmentací.

Archaea jsou organismy aerobní, anaerobní i fakultativně anaerobní; mezofilní či termofilní; rostou chemolitoautotrofně, organotrofně nebo fakultativně organotrofně. Gramovým barvením se barví gramnegativně nebo grampozitivně (tyto obsahují v buněčné stěně pseudomurein). Zajímavostí je, že podle současných fylogenetických analýz jsou archaea v některých znacích podobné či dokonce shodné s eukaryotními organismy domény *Eucarya* (např. přítomnost intronů v genech pro tRNA a rRNA).

2.1.2. Doména *Bacteria*

Z praktických důvodů je doména *Bacteria* běžně členěna podle charakteru buněčné stěny do tří fenotypových oddělení: a) gramnegativní bakterie s buněčnou stěnou, b) grampozitivní bakterie s buněčnou stěnou a c) bakterie bez buněčné stěny. Typickým znakem je esterová vazba mezi glycerolem a mastnými kyselinami a přítomnost kyseliny muramové v mureinu.

Gramnegativní bakterie mají buněčnou stěnu složenou z vnější lipopolysacharidové membrány a vnitřní tenké vrstvy peptidoglykanu. Jejich buňky jsou kulaté, oválné, tyčkovité, mohou tvořit šroubovice či vlákna. Některé druhy tvoří pochvy či pouzdra. Reprodukují se příčným dělením, vzácně pučením, mnohonásobným dělením (cyanobakterie) nebo tvorbou myxospor a plodnic (myxobakterie). Mohou být fototrofní či nefototrofní, litotrofní nebo heterotrofní; aerobní, anaerobní, fakultativně anaerobní či mikroaerofilní; patří sem i obligátní intracelulární parazité.

Buněčná stěna **grampozitivních bakterií** postrádá vnější membránu a obsahuje poměrně silnou vrstvu peptidoglykanu s řetězci teichoových kyselin. Tvar buněk je kulatý, tyčkovitý či vláknitý, tyčky i vlákna se mohou větvit. Reprodukují se obvykle příčným dělením, aktinomycety mohou tvořit spory. Některé grampozitivní bakterie tvoří endospory (klidová stádia). Grampozitivní bakterie jsou obvykle heterotrofní; aerobní, anaerobní, fakultativně anaerobní či mikroaerofilní; některé druhy jsou obligátními intracelulárními parazity.

Mykoplasmata – bakterie bez buněčné stěny, nejsou schopny syntetizovat prekurzory peptidoglykanu a jsou proto rezistentní k inhibitorům syntézy buněčné stěny. Buňka mykoplasmata je obklopena pouze cytoplasmatickou membránou a proto jsou morfologicky pleomorfní. Rozmnožují se pučením, fragmentací a/nebo příčným dělením. Až na výjimky jsou nepohyblivé a tvoří klidová stádia. K jejich obarvení se obvykle používá barvení podle

Giemisy. K růstu většinou vyžadují komplexní média. Do této skupiny patří saprofytické i patogenní druhy.

2.2. Taxonomie

Taxonomie je věda zabývající se charakterizací a zařazením organismů do jednotlivých taxonomických jednotek (tzv. taxonů), a to na základě jejich vlastností a vzájemného příbuzenského vztahu. V případě **taxonomie prokaryot** jsou oblastí studia organismy z domén *Archaea* a *Bacteria*.

Taxonomii je potřeba odlišit od systematiky, která je studiem diverzity mikroorganismů a jejich vzájemné příbuznosti v širším kontextu, kdy mimo taxonomické klasifikace zahrnuje též další obory – ekologii, biochemii, genetiku, patologii a molekulární biologii.

Cílem taxonomie je tedy: a) identifikovat a popisovat základní taxonomické jednotky – druhy, a b) navrhnout vhodný způsob jejich zařazování a katalogizace. Taxonomie je dynamický subjekt, který se na základě dostupných údajů může měnit.

Taxonomie se skládá ze tří vzájemně propojených oblastí:

- **klasifikace** (uspořádání organismů do skupin na základě jejich podobnosti a příbuznosti),
- **nomenklatury** (přiřazování jmen taxonomickým skupinám podle mezinárodních pravidel),
- **identifikace** (zařazování nových izolátů do již ustavených a pojmenovaných taxonů).

Pro stanovení fylogenetického postavení prokaryot je klíčová **sekvenční analýza 16S rDNA**, kdy podobnost 97 % a vyšší je udávána jako hraniční pro zástupce stejného druhu (při nižší míře podobnosti tvoří nový izolát nový taxon).

2.2.1. Taxonomická hierarchie prokaryot

Nejvyšší postavení v taxonomii prokaryot má **doména**, následují nižší podskupiny – **kmen**, **třída**, **řád**, **čeleď**, **rod**, **druh** a **poddruh**. Na rozdíl od taxonomie eukaryot se nepoužívají termíny říše a oddělení. Obecně vžitě pojmy jako spirochéty, methan oxidující bakterie, atd. nemají oficiální postavení.

Základní taxonomickou jednotkou je **druh** (lat. *species*, zkratka sp. nebo spp.). Tímto pojmem se obvykle označuje skupina individuí vykazující vysoký stupeň podobnosti, která se současně významně liší od jiné skupiny individuí. V bakteriologii je však druh definován jinak než v botanice či zoologii. Prokaryota nejsou schopna pohlavního rozmnožování a jejich fenotypové a genotypové vlastnosti mohou být velmi proměnlivé, proto je zde vymezení druhu velmi obtížné.

Pro bakterie je charakteristická tzv. „genetická promiskuita“, tj. poměrně vysoká frekvence horizontální výměny části genetického materiálu mezi dvěma třeba i značně nepodobnými jedinci (prostřednictvím konjugace, transdukce a transformace). Dalším faktorem je velká proměnlivost genetických vlastností bakterií vyplývající z haploidie jejich genomu. U haploidní buňky se každá mutace projeví, protože není zakryta normální funkcí druhé nemutované alely.

Druh u prokaryot je tedy definován jako:

- jasně vymezená skupina vzájemně příbuzných kmenů, zahrnující typový kmen,
- sdílející 70% a vyšší DNA-DNA homologii komplementárních párů bází,
- vykazující, až na výjimky, shodné fenotypové znaky
- a současně mající některé odlišné znaky od jiných skupin.

*Dle doporučení se **genomospecies** – genomický druh rozeznatelný pouze srovnáním nukleových kyselin, druhově nepojmenovává, dokud nejsou zjištěny rozdílné fenotypové vlastnosti umožňující jeho odlišení od jiných taxonů.*

Nižší taxonomické jednotky pod úrovní druhu představují **poddruhy** (lat. *subspecies*, zkratka subsp. nebo ssp.), které se od dalších poddruhů liší určitou fenotypovou (např. fyziologickou

nebo biochemickou) vlastností, přičemž zůstává zachována vysoká DNA homologie v rámci daného druhu. Příkladem může být druh *Salmonella enterica*, který se dělí do šesti poddruhů. Poddruh má v nomenklatuře prokaryot oficiální postavení a je fylogeneticky validní.

V mikrobiologické praxi se velmi často používá další typ vnitrodruhového třídění, tzv. **variety**. Jednotlivé variety jsou založeny pouze na vybraných „užitečných“ znacích, avšak neprokazatelných pomocí příbuznosti DNA. Variety jsou tedy skupiny kmenů daného druhu, které se rozlišují na základě speciálních charakteristik. Variety, narozdíl od poddruhů, nemají v taxonomii oficiální postavení a jsou užitečné pouze z praktického hlediska. Názvy variet obsahují příponu **-var** nebo **-typ** (používanější, ale méně správné označení). Třídění na úrovni variet má velký význam při epidemiologických analýzách.

Příklady variet:

- *sérovar* – odlišení na základě antigenních vlastností (rod *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*);
- *biovar* – odlišení na základě biochemické či fyziologické vlastnosti;
- *fagovar* – odlišení na základě schopnosti kmenů být lyzovány různými bakteriofágy (rod *Salmonella*, *L. monocytogenes*);
- *patovar* – odlišení na základě patogenních vlastností pro různé hostitele.

Nejbližší vyšší taxonomickou jednotkou druhu je **rod** (lat. *genus*). Rod je obvykle dobře definovaná skupina taxonů (druhů, příp. i poddruhů), která je jasně odlišitelná od jiných rodů. Druhy a rody jsou v mikrobiologické praxi nejpoužívanější taxonomické jednotky.

Tabulka 1: Taxonomická hierarchie bakterií – příklady.

Doména	(<i>Regio</i>)	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>
Kmen	(<i>Phylum</i>)	<i>Proteobacteria</i>	<i>Firmicutes</i>
Třída	(<i>Classis</i>)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Bacilli</i>
Řád	(<i>Ordo</i>)	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Bacillales</i>
Čeleď	(<i>Familia</i>)	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Listeriaceae</i>
Rod	(<i>Genus</i>)	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
Druh	(<i>Species</i>)	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Poddruh	(<i>Subspecies</i>)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	

Pozn.: Zvýrazněné koncovky jsou typické pro danou taxonomickou jednotku.

2.2.2. Klasifikace

Cílem klasifikace je uspořádání organismů na základě jejich vzájemných vztahů a podobnosti do jednotlivých taxonů. Prvním krokem klasifikace je experimentální **stanovení vlastností** mikroorganismu. Na základě výsledků analýzy jsou potom mikroorganismy **zařazovány** do jednotlivých skupin. Abychom tedy mohli mikroorganismy klasifikovat, musíme nejdříve znát jejich významné morfologické, biochemické, fyziologické, chemické, molekulárně-biologické a genetické charakteristiky.

Běžně používanou klasifikační metodou je **numerická taxonomie**, která díky využití počítačové analýzy umožňuje zpracování velkého množství dat z různých zdrojů (morfologické, biochemické, fyziologické, antigenní, atd.). Prvním krokem je shromažďování údajů pro klasifikované kmeny, jednotlivé charakteristiky jsou následně zakódovány a je vypočítána podobnost mezi kmeny. Zjištěná podobnost je závěrem analyzována za účelem vytvoření taxonomických struktur.

Podle spektra zahrnutých kritérií lze hovořit o **praktické klasifikaci**, která je založená pouze na fenotypových charakteristikách (morfologické, biochemické a fyziologické znaky) bez ohledu na fylogenetickou příbuznost. Při **fylogenetické klasifikaci** jsou fenotypové charakteristiky doplněny o výsledky molekulárně biologických metod studia genetické příbuznosti (DNA-DNA hybridizace, DNA-rRNA hybridizace, sekvenace rRNA a proteinů) a chemotaxonomické údaje.

Znaky (vlastnosti) sloužící ke klasifikaci bakterií:

- *morfologické* (tvar a velikost buněk, přítomnost bičíků, barvitelnost, vzhled kolonií, atd.)
- *fyziologické* (schopnost využívat různé zdroje živin a energie, vztah ke kyslíku, složení a funkce buněčné stěny, tvorba nebo štěpení různých sloučenin, schopnost vyvolat onemocnění jistého hostitele či schopnost existence v různých typech prostředí, atd.)
- *sérologické a chemické* (antigenní struktura, chemické složení buněčné stěny či buněčných struktur – peptidoglykan, kyselina teichoová, polární lipidy cytoplasmatické membrány, mastné kyseliny, atd.)
- *molekulární* (složení bází nukleových kyselin, tj. poměr cytosinu a guaninu k adeninu a thyminu vyjadřovaný v procentech jako *obsah C+G*, primární struktura DNA, atd.)
Mikroorganismy značně se lišící obsahem purinových a pyrimidinových bází v DNA nemohou být příslušníky jednoho druhu. Na druhé straně však mikroorganismy, které mají téměř totožný obsah jednotlivých bází v DNA nemusí být vždy blízce příbuzné, důležité je také pořadí bází.
- *genetické* (schopnost výměny genů transformací, transdukci nebo konjugací)

Na rozdíl od nomenklatury, která je přesně stanovena, **neexistuje** zatím žádná **oficiální klasifikace bakterií**. Jako „oficiální“ by snad mohla být navržena ta, která je široce akceptovatelná celou odbornou mikrobiologickou veřejností po nějakou dobu. Je důležité mít na paměti, že klasifikace prokaryot je kategorie vytvořená pro mikrobiologii a ne pro jednotky (bakterie), které jsou klasifikovány.

Poměrně velká část mikrobiologů používá jako „klasifikační příručku“ **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Jedná se o několiksvazkovou publikaci, poprvé vydanou v roce 1923, která je neustále aktualizována. Každý svazek aktualizuje jiný kolektiv autorů a každý rod zpracovává přední světový odborník pro uvedený rod. Manuál popisuje všechny známé bakterie a uvádí tabulky vlastností jednotlivých druhů potřebné pro jejich identifikaci. Bakterie jsou zde do jisté míry uspořádány z taxonomického hlediska, toto rozdělení však není úplné a řada bakteriálních rodů je zařazena za nejpříbuznějšími čeleděmi. Bergeyho manuál se dělí na jednotlivé kapitoly neboli **sekce**, z nichž každá zahrnuje určitou skupinu bakterií vymezenou na základě fenotypových charakteristik – barvitelnosti podle Grama, morfologie, tvorby spor, atd. Jednotlivé sekce (celkem 33) potom tvoří např. grampozitivní koky, fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinky, spirochety, atd.

2.2.3. Nomenklatura

Nomenklatura je pojmenovávání jednotlivých taxonů. Řídí se mezinárodně dohodnutými pravidly (**mezinárodní nomenklatorický kód – International Code of Nomenclature of Bacteria**), je oficiální a jediná – každý taxon má jen jedno platné jméno. Snahou je usilovat o stabilitu jmen organismů, vyhnout se použití jmen, které mohou způsobit chyby či zmatek v pojmenování a zabránit vytváření neúčinných jmen. Mezinárodní nomenklatorický kód je odlišný pro živočichy, rostliny, bakterie a viry.

Nomenklatura prokaryot je založena na **binomickém principu**, který zavedl Linné, a je nezávislá na nomenklatuře botanické (s výjimkou názvů řas a hub) a zoologické (s výjimkou praprvoků a prvoků). Nezávislost znamená, že stejné jméno může být použito pro označení prokaryotního taxonu stejně jako rostlinného nebo živočišného, až na výše zmíněné výjimky.

Nomenklatura může obsahovat dvě části:

- a) informační či neplatné jméno (např. bacil tuberkulózy),
- b) vědecké jméno (*Mycobacterium tuberculosis*).

Vědecká jména taxonů prokaryot regulovaná nomenklatorickým kódem mají společné dvě věci: a) pocházejí z latiny nebo řečtiny, nebo jsou latinizována v té formě, aby byla snadno rozpoznatelná jako vědecké jméno; b) umožňují definovat pozici v taxonomické hierarchii.

Nově popsaný taxon musí být publikovaný v periodiku *International Journal of Systematic Bacteriology* (od roku 2002 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*), jeho jméno musí být vytvořeno v souladu s nomenklatorickým kódem pro bakterie, musí být dostatečně popsány jeho vlastnosti a musí být určena **typová kultura** (čistá, nekontaminovaná kultura nového druhu, tzv. typový kmen). Před publikací jména nového druhu musí být kultura typového kmene deponována nejméně ve dvou veřejných trvalých **sbírkách kultur mikroorganismů**, kde je následně snadno dostupná a slouží jako referenční kultura pro přímé srovnávání s novými izoláty (např. Česká sbírka mikroorganismů Brno).

2.2.3.1. Vědecké názvy bakterií

Binomický princip znamená, že je vědecký název druhu tvořen dvěma slovy: 1) podstatným jménem rodu a 2) přídavným jménem druhu.

V psaném textu se vědecké názvy druhu píše vždy kurzívou a s velkým počátečním písmenem v označení rodu, např. *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*.

Přídavné jméno druhu začíná vždy malým písmenem, a to i v případě zkrácení rodového jména, např. *Escherichia coli* – *E. coli*, *Salmonella enterica* – *S. enterica*.

Název poddruhu se píše opět kurzívou a malými písmeny, a to mimo zkratky pro poddruh (subsp.), která se píše běžným písmem (ne kurzívou) – *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.

Pokud v textu označujeme pouze příslušný rod bakterií, píše se za rodové jméno zkratka pro rod (spp.), která se opět píše běžným písmem (ne kurzívou) – *Streptococcus* spp., *Vibrio* spp.

Všechny názvy vyšších taxonomických jednotek než rod se píše kurzívou s velkým počátečním písmenem – např. čeleď *Enterobacteriaceae*, řád *Methanobacteriales*.

Některé bakterie, např. salmonely, jsou běžně klasifikovány až na úroveň serovarů (zkratka sv.), které se píše běžným písmem (ne kurzívou) a s velkým počátečním písmenem – např. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sv. Enteritidis. Mezinárodně vžitou praxí je zkracování názvů salmonel pouze na název rodu a sérotypu – např. *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhi*.

Vědecké názvy bakterií jsou **nesklonné** a vyslovují se podle pravidel **středověké latiny**:

- **c** před a, o, u, souhláskou a na konci slova se čte jako **k** (*Leuconostoc dextranicum*),
- **c** před e, ae, oe, i a y se vyslovuje jako **c** (*Bacillus cereus*),
- **s** před samohláskou uprostřed slova (uprostřed kmene slova) se čte jako **z** (*Lactobacillus casei*, *Yersinia pestis*), v ostatních případech se čte jako **s** (*Saccharomyces*),
- **ae** a **oe** se čte jako **é** (*Enterobacteriaceae*),
- **ti**, po němž následuje samohláska se čte jako **ci** (*Serratia* spp.),
- **di**, **ti**, **ni** se čte jako **dy**, **ty**, **ny** (*Salmonella* Enteritidis, *Chlamydia* spp.),
- **ph** se čte jako **f** (*Staphylococcus aureus*).

2.2.3.2. Informační (triviální) názvy bakterií

Triviálními (počeštěnými) názvy se obvykle označují rody a vyšší taxonomické jednotky. Tyto názvy se píše malými písmeny, běžným písmem (ne kurzívou) a mohou se skloňovat. Mezi běžně používané patří např. salmonely, stafylokoky, streptokoky, listerie, bacily. Triviální názvy se nikdy **nepoužívají** s názvem druhu.

U názvů odvozených od vlastního jména osoby nebo místa se i v počestěné formě ponechává vlastní jméno v původní podobě, ale vyslovuje se podle zvyklostí příslušného jazyka. Například *escherichie* – „ešerichie“ jsou pojmenovány po objeviteli *Escherichia coli* rakouském lékaři Theodoru Escherichovi; *shigely* – „šigely“ po objeviteli *Shigella dysenteriae* japonském lékaři Kiyoshi Shigovi; *yersinie* – „jersinie“ po objeviteli původce dýmějového moru *Yersinia pestis* francouzsko-švýcarském lékaři Alexandre E. J. Yersinovi.

2.2.4. Identifikace

Identifikace (určování) je postup, kterým zjišťujeme, do kterého a jak pojmenovaného taxonu nově izolovaná bakterie (či bakteriální kmen) náleží. Je tedy praktickou aplikací klasifikace a nomenklatury. Při identifikaci bakterií se běžně využívají klasifikační charakteristiky, ale pozor, klasifikační a identifikační schémata rozhodně **nejsou totožná**, mohou si být pouze podobná!

Identifikační schéma pro určitou skupinu mikroorganismů lze vytvořit až po tom, kdy byla tato skupina klasifikována. Obecně platí, že charakteristiky zvolené pro identifikační schéma by měly být *snadno stanovitelné*, identifikační schémata obvykle obsahují pouze *několik nejvýhodnějších rozlišujících charakteristik* (oproti tomu u klasifikace je jich velký počet). Podmínky, při nichž byly jednotlivé charakteristiky testovány, by měly být standardně popsány (srovnatelnost výsledků jednotlivých laboratoří).

Pro klasifikaci má každá zjištěná charakteristika stejnou váhu. Naproti tomu pro identifikaci mohou být některé znaky zvýhodněny oproti ostatním, a to v závislosti na identifikované skupině (např. koagulasa u stafylokoků či oxidasa u enterobakterií).

Identifikace mikroorganismů původně spočívala na **biochemických testech** založených na růstu bakterií, případně doplněných o stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám. Ve vybraných případech byla doplňkově dělána aglutinace, komplement fixační nebo neutralizační reakce – obecně se jednalo o postupy pracné, s výsledky dostupnými až za několik dnů.

Nyní je bakteriální identifikace z velké části prováděna pomocí **miniaturizovaných komerčních souprav** – tzv. mikrotestů, často polo či plně automatizovaných. Tyto systémy umožňují odečítání výsledků za 2 – 4 hodiny, nejpozději do 24 hodin, jsou rychlé, spolehlivé, standardní, cíleně orientované na klinicky významné taxony a levné. Při rutinní identifikaci se využívá také řada **imunodiagnostických metod** (latexová aglutinace, imunofluorescenční techniky, atd.).

Pro identifikaci bakterií jsou vytvořeny i tzv. dichotomické klíče, běžně používané při identifikaci rostlin a živočichů, ve kterých se diskriminace provádí na základě hodnoty jednoho klíčového znaku. Omezením dichotomických klíčů je mnoho výjimek z pravidla o té které hodnotě toho kterého znaku. Např. přítomnost či nepřítomnost určité enzymové aktivity: stav kdy 100 % kmenů bude + nebo 100 % kmenů bude - je nepravděpodobný. Pravděpodobnější je, že např. 80 % kmenů bude + a 20 % -. Proto je nutný statistický a pravděpodobnostní přístup nejen k taxonomii, ale i k identifikaci bakterií – hovoříme o numerické identifikaci.

Základní podmínku pro provádění identifikace je práce s **čistou kulturou**. Je nutné si uvědomit, že nárůst izolovaných kolonií na misce nemusí znamenat čistou kulturu, zvláště použijeme-li selektivní média, kde může být přítomna živá, avšak téměř nerostoucí kontaminace poblíž izolovaných kolonií, kterou při subkultivaci můžeme přenést spolu se zvolenou kolonií. Z tohoto důvodu jsou při identifikaci upřednostňována neselektivní média (při stanovení mikroorganismů v potravinách je standardním postupem, že jsou suspektní kolonie ze selektivního média před konfirmací preočkovány na vhodné neselektivní médium).

3. KULTIVACE MIKROORGANISMŮ

Při práci s mikroorganismy je nezbytné zajistit jejich dostatečné pomnožení *in vitro* (v podmínkách laboratoře). Při pěstování neboli kultivaci musíme bakteriím zajistit vhodné podmínky tak, aby byl jejich růst co nejlepší. Jedná se především o dostatek vody a nezbytných živin, optimální teplotu, odpovídající složení atmosféry, pH, osmotický tlak, redox potenciál, atd. Obvykle toho dosáhneme použitím vhodných kultivačních (živných) půd a zvolenými podmínkami inkubace.

Problematika kultivace mikroorganismů je detailně zpracována ve skriptech Mikrobiologie potravin – praktická cvičení I. Obecná mikrobiologie; zde jsou uvedeny pouze základní informace.

3.1. Kultivační média

Při kultivaci mikroorganismů *in vitro* se používají kultivační neboli živná média, která slouží jako zdroj energie a živin nezbytných pro jejich růst. Splňují i další nároky daných mikroorganismů – optimální pH, obsah vitamínů, aminokyselin, apod. Laboratoře využívají půdy buď přímo dodávané výrobcem v Petriho miskách, zkumavkách nebo lahvích, případně si půdy připravuje laboratoř sama, a to z komerčních dehydrovaných směsí nebo z jednotlivých složek podle receptury. Jejich sterilita se ve většině případů zajišťuje autoklávováním nebo filtrací přes membránové filtry s póry o průměru 0,22 μm. Kultivační půdy se používají pro různé účely: k transportu živých mikroorganismů, ke konzervaci, resuscitaci, pomnožení, izolaci, atd.

Obecně dělíme kultivační půdy na **přirozené** (komplexní, chemicky nedefinované), jejichž základem je živný bujon, a **syntetické** (chemicky definované), které jsou složeny z chemicky definovaných sloučenin. Podle konzistence rozeznáváme **půdy tekuté** (bujony) a **půdy pevné** (s obsahem 1 – 2 % agaru). V některých případech (např. stanovení pohyblivosti, serologické určení bičíkových antigenů) se používají i **půdy polotuhé** (semisolidní) s přídavkem agaru do 0,5 %. Podle složení dělíme půdy na **základní, obohacené** (krevní agar), **elektivní** (kultivace úzké taxonomické skupiny mikroorganismů – např. proteolytické mikroorganismy), **selektivní** (obsahují inhibitor růstu nežádoucích mikroorganismů), **diagnostické** (obsahují indikátor biochemické aktivity) a **selektivně diagnostické** (kombinace obou), dále pak **chromogenní** (obsahují tzv. chromogen, což je běžný substrát např. cukr s navázanou barevnou molekulou – chromoforem) a **fluorogenní půdy** (na substrát je navázáno fluorescenční barvivo).

3.2. Metody kultivace mikroorganismů

Podstatou kultivace (pěstování) mikroorganismů je přenesení mikroorganismů přítomných v testovaném vzorku – tzv. *inokulum*, do sterilní živné půdy. Tento postup se označuje jako očkování – *inokulace*. Při vlastní práci musíme postupovat zcela asepticky, do kultury ani půdy nesmí vniknout žádné cizí mikroorganismy ze vzduchu, pracovních pomůcek či rukou. Zaočkované živné médium (Petriho misky, zkumavky) následně inkubujeme při podmínkách vhodných pro růst daného mikroorganismu.

3.2.1. Kvantitativní metody

Cílem kvantitativních metod kultivace je co nejpřesnější **stanovení počtu životaschopných buněk mikroorganismů** (všech mikroorganismů, vybraných skupin či určitého druhu) ve vyšetřovaném vzorku. Výsledkem je konkrétní hodnota vyjádřená jako počet KTJ (= kolonie tvořících jednotek, angl. *CFU = colony forming unit*) v 1 ml nebo 1 g vzorku. Každá kolonie je považována za klon jediné buňky; počet kolonií na misce tedy odráží počet buněk v objemu vzorku kultivovaném na misce.

V rutinní potravinářské praxi se nejčastěji používá stanovení za použití pevných živných médií, a to metoda zalévání do agarových pūd (metoda zalití) či metoda roztěru na povrch agarových pūd. Očkování do tekutých pūd se používá při stanovení nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů (metoda MPN – angl. *most probable number*). Metoda MPN se používá pro stanovení počtu mikroorganismů ve vzorcích, kde se očekává jejich velmi nízký počet. Při vyšetření pitné vody či dalších dobře filtrovatelných vzorků lze využít i metodu membránové filtrace.

3.2.2. Kvalitativní metody

Kvalitativní metody kultivace slouží k **průkazu přítomnosti či absence konkrétních mikroorganismů** ve vyšetřovaných vzorcích. Výsledek kvalitativních analýz se vyjadřuje jako přítomnost/nepřítomnost dané bakterie v určitém objemu vzorku (nejčastěji v 10 nebo 25 g či ml).

Stanovení může probíhat jednostupňově nebo dvoustupňově. Rozdíl je v počtu použitých pomnožovacích kroků před vlastním vyočkováním na pevné selektivní nebo selektivně diagnostické pūd. Při jednostupňové kultivaci je vzorek pomnožen v jednom selektivním bujonu – např. bujon podle Boltana při průkazu bakterií r. *Campylobacter*. Ale například při průkazu salmonel se vzorek pomnožuje dvoustupňově: nejprve v neselektivním bujonu (pufrovaná peptonová voda) – resuscitace salmonel, poté v bujonech selektivních (Rappaport-Vassiliadisův bujón se sójovým peptonem a Mueller-Kauffmanův tetracionátový bujón s novobiocinem) – selekce prokazovaných buněk. Pomnožený vzorek je vždy vyočkován (izolován) na pevnou agarovou pūd, narostlé charakteristické kolonie jsou poté podrobeny tzv. konfirmaci, kdy se vhodnými metodami potvrdí, že se skutečně jedná o stanovovaný mikroorganismus.

3.3. Podmínky kultivace

Pomineme-li složení živného média, které má zásadní vliv pro úspěšnost kultivace, je růst mikroorganismů ovlivněn především teplotou, složením kultivační atmosféry, relativní vlhkostí a dobou kultivace.

3.3.1. Teplota

Teplota je obecně jedním z nejvýznamnějších faktorů ovlivňujícím růst a množení mikroorganismů. Každý mikroorganismus má svou optimální, minimální a maximální teplotu růstu, na základě optimální teploty lze rozlišit tři základní skupiny mikroorganismů – **psychrofilní**, **mezofilní** a **termofilní** (tabulka 2). Pro kvalitativní a kvantitativní stanovení mikroorganismů v potravinách je pro každý druh normativně stanovena příslušná teplota kultivace, která se ale nemusí shodovat s optimální teplotou růstu pro daný mikroorganismus. Při stanovení mikroorganismů se proto používají termostaty, které udržují zvolenou teplotu po celou dobu kultivace.

Tabulka 2: Optimální, minimální a maximální teploty růstu psychrofilních, mezofilních a termofilních bakterií. (Jay, 1992 – upraveno)

Skupina bakterií	Teplota růstu (°C)		
	Optimální	Minimální	Maximální
Psychrofilní	10 – 15	< 0	20
Mezofilní	30 – 40	20	45
Termofilní	55 – 65	45	některé druhy až 100

V mikrobiologii potravin má významné postavení skupina **psychrotrofních bakterií**. Psychrotrofní bakterie jsou schopné růstu při teplotách mezi 0 – 7 °C, přestože se mohou množit až do teplot 43 °C a jedná se tedy de facto o mezofilní mikroorganismy. Na rozdíl od psychrofilních mikroorganismů, které se nachází v potravinách pocházejících z extrémně chladného prostředí, příčinou kažení masa, zeleniny a dalších potravin skladovaných při teplotách 0 – 5 °C jsou zpravidla psychrotrofy.

3.3.2. Vztah ke kyslíku

Mikroorganismy se značně liší svými nároky na přítomnost nebo nepřítomnost kyslíku. V závislosti na stupni tolerance vůči molekulárnímu kyslíku je možno mikroorganismy klasifikovat do následujících skupin:

- **aerobní mikroorganismy** vyžadují pro svůj metabolismus jako konečný akceptor elektronů kyslík (např. rody *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Mycobacterium*);
- **fakultativně anaerobní mikroorganismy** mohou růst v aerobních i anaerobních podmínkách, za přístupu kyslíku je jejich rozmnožování rychlejší díky účinnější přeměně substrátu v energii (např. rody *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Bacillus*);
- **mikroaerofilní mikroorganismy** mají anaerobní metabolismus, ale nízké koncentrace kyslíku urychlují jejich množení, mikroaerofilní atmosféra má specifické složení (např. rody *Campylobacter*, *Lactobacillus*);
- **anaerobní mikroorganismy** vyžadují absenci kyslíku v prostředí, kyslík na ně působí inhibičně, příp. toxicky (např. rod *Clostridium*).

Ve většině případů probíhá kultivace za aerobních podmínek – **aerobní kultivace**, vhodných jak pro aerobní, tak i fakultativně anaerobní mikroorganismy. Tyto mikroorganismy kultivujeme na agarových plotnách či ve zkumavkách, kde kyslík proniká difúzí tenkou vrstvou agarové půdy. Při pomnožování mikroorganismů ve větším objemu tekutého živného média je potřeba sytit půdu kyslíkem, což se prakticky provádí *třepáním* na automatických třepačkách nebo *aerací*.

Mikroaerofilní a anaerobní kultivace se provádí v případě mikroorganismů rostoucích za nepřítomnosti nebo snížené tenze vzdušného kyslíku. Toho lze nejčastěji docílit použitím anaerostatů, ze kterých se kyslík odstraňuje chemickou reakcí nebo odčerpáním, dále pak povařením půd a po zaočkování následným převrstvením parafinem.

3.3.3. Relativní vlhkost

Relativní vlhkost má význam zejména při dlouhodobé kultivaci či kultivaci termofilních druhů probíhající při vyšších teplotách. V tomto případě je nutné zabránit nadměrnému vysychání živného média, a to např. vložením odpařovací misky s vodou do termostatu, obalením Petriho misek parafilmem a jejich ukládáním do vlhkých komůrek nebo zabalením kultivačních nádob do polyethylenových sáčků či fólií.

3.3.4. Doba kultivace

Obvyklá doba kultivace potravinářsky významných mikroorganismů se pohybuje v rozmezí 24 až 72 hodin, výjimku tvoří kvasinky a plísně vyžadující pro nárůst charakteristických kolonií minimálně 5 dní. Konkrétní doba kultivace záleží na stanovované skupině mikroorganismů a použitém druhu živné půdy.

4. MORFOLOGIE BAKTERIÍ

Bakteriální buňka je výrazně menší než buňka eukaryot, odpovídá svou velikostí zhruba velikosti mitochondrií. Bakterie jsou pozorovatelné pouze v optickém či elektronovém mikroskopu. Při popisu bakteriálních buněk zohledňujeme jejich velikost, tvar a uspořádání. Z hlediska jejich zařazení je důležitým znakem i barvitelnost Gramovým barvením.

Velikost bakterií se pohybuje v rozsahu od několik desetin po několik desítek μm . Většina potravinářsky významných bakterií měří kolem 1 – 3 μm . Mezi nejmenší bakterie patří mykoplasmata (0,2 – 0,25 μm) a chlamydie (asi 0,33 μm), mezi největší bakterie potom např. spirochety (60 μm). **Tvar** bakterií je kulovitý (koky, řecky *coccos* = jádro) nebo protáhlý. Protáhlým formám říkáme tyčinky (latinsky *bacillus*, řecky *bacterium* ze slova *bactérion* = hůlka). Tyčinky mohou být rovné, prohnuté nebo vytváří tzv. vlákna. Jen výjimečně je bakterie nesymetrického tvaru. Bakteriální buňky se mohou vyskytovat jednotlivě nebo jsou uspořádány do **charakteristických útvarů** – dvojice, řetízky, shluky, palisády, atd.

Tvar bakterií je značně proměnlivý, závisí na řadě vnějších vlivů – růstová fáze, věk kultury, složení živného média. Z tohoto důvodu není vhodné připravovat preparáty z kultur narostlých na selektivních médiích, protože jejich složení může podstatně měnit tvar mikroorganismů. Tvar buněk ovlivňují také antibiotika, chemoterapeutika, bakteriofágy, atd.

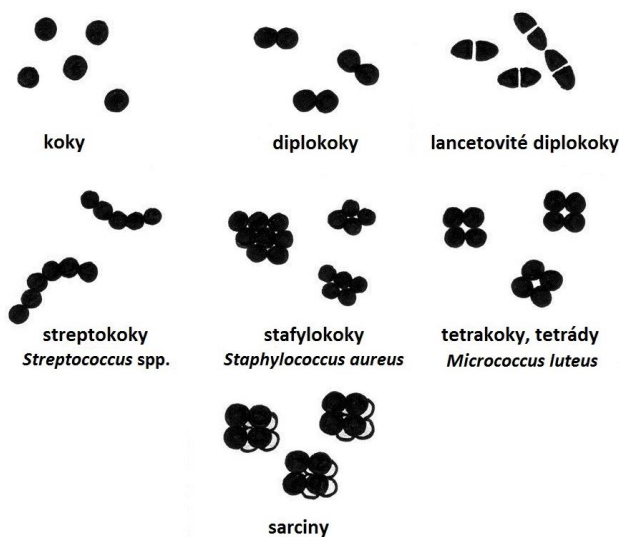
U některých bakterií se setkáváme s tzv. **pleomorfismem** – rozmanitostí tvarů. Rozumí se tím existence odlišných morfologických forem u téhož druhu či kmene mikroorganismu. V jednom preparátu můžeme potom současně pozorovat formy kokobacilární, tyčinky různé délky, příp. i vláknité formy. Pleomorfismus se vyskytuje např. u bakterií mléčného kvašení, *Haemophilus influenzae* či mykoplazmat.

Detailní popis metod hodnocení makroskopické i mikroskopické morfologie mikroorganismů je uveden ve skriptech Mikrobiologie potravin – praktická cvičení I. Obecná mikrobiologie. Revidované vydání.

4.1. Koky

Koky jsou nejčastěji kulaté nebo ovoidní (enterokoky), mohou však být i různě oploštělé (tvar kávového zrna) nebo protáhlé a zašpičatělé – lancetovité (např. *Streptococcus pneumoniae*). Průměrná velikost koků je asi 1 μm .

Dělící se bakterie mohou zůstat přichycené k sobě, vzniklé útvary jsou potom závislé na rovině buněčného dělení. Dva neoddělené koky vytváří **diplokoky**. Pokud se koky dělí stále ve stejné rovině, vytvářejí **řetízky** neboli **streptokoky** (typické pro rod *Streptococcus*). Koky dělící se ve dvou na sebe kolmých rovinách tvoří čtveřice neboli **tetrády** (rod *Pediococcus* nebo mikrokoky). Pokud dochází k dělení ve třech na sebe kolmých rovinách, vznikají balíčky po osmi až několika stech buňkách označované jako **pakety** neboli **sarciny**. Ve zcela nepravidelných prostorových vztazích se dělí bakterie rodu *Staphylococcus*, pro které je charakteristické uspořádání ve **shlucích** či hroznovitých útvarech – tzv. **stafylokoky**.



Obrázek 2: Tvar a uspořádání koků – příklady.

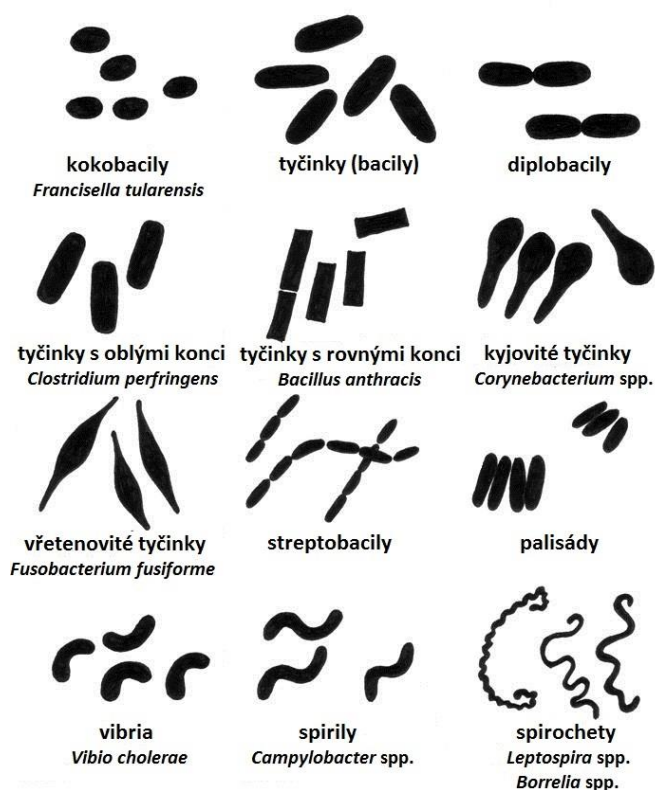
4.2. Tyčinky

Tyčinkovité buňky jsou buď rovné, zakřivené, tvaru pravidelné spirály nebo dlouhé nepravidelné spirály. Průměrná velikost je asi $0,5 - 1,5 \times 1 - 3 \mu\text{m}$.

U prohnutých tyčinek rozlišujeme podle stupně zakřivení následující typy: *vibria* (rohličkovité tyčinky), *spirily* (esovitě zakřivené tyčinky) a *spirochety* (hrubě či jemně zakřivené spirály).

Různé druhy bakterií se liší poměrem délky buňky k šířce, takže se vyskytují jak druhy tvořící velmi krátké tyčinky podobné kokům (*kokobacily*), tak druhy s dlouhými tyčinkami připomínajícími krátká vlákna. Tvarová rozmanitost tyčinek je větší než u koků.

Při popisu tyčinek je důležitý nejen tvar, ale i relativní velikost (tyčinky štíhlé či robustní), ukončení buněk (tyčinky se zaoblenými či rovnými konci) a různá rozšíření (kyjovité tyčinky, vřetenovité tyčinky), které jsou druhově specifické.



Obrázek 3: Tvar a uspořádání tyčinek – příklady.

Tyčinky bývají uspořádány většinou jednotlivě, vzácně zůstávají ve dvojicích – *diplobacily* nebo tvoří krátké řetězky – *streptobacily* (např. rody *Bacillus* či *Lactobacillus*). Tyčinkové bakterie se rozmnožují příčným dělením buňky. Některé rody jsou schopné tvořit sekundární, tzv. *palisádovité uspořádání* (např. korynebakterie nebo *Mycobacterium tuberculosis*).

4.3. Vlákňité a bizarní bakterie

Vlákňitý tvar bakterií se vyskytuje u řádu *Actinomycetales* a je charakterizován *pravým větvením*. Rozmnožování těchto bakterií probíhá třemi způsoby: a) dělením buněk ve vláknech (rozzrůstáním vláken), b) tvorbou jednobuněčných spor vznikajících podél vláken nebo na jejich konci, či c) rozpadem vláken v jednotlivé buňky. Některé rody tvoří endospory.

Další bakterie, např. sirné bakterie *Beggiatoa* spp. či *Thiotrix* spp., tvoří poměrně silná *nerozvětvená ohebná vlákna* složená z řetězce buněk. Jiné bakterie tvoří vlákna tím, že kolem řetězku jejich buněk vnikají *vlákňité pochvy*, které mohou být vyplněny oxidy železa nebo manganu.

Bizarní buňky s dlouhými výběžky tvoří malá skupina *pučících bakterií*. Pupen zůstává spojen s mateřskou buňkou úzkým dlouhým kanálkem (stopkou). U jiných druhů bakterií jsou známé *buňky s nápadnými výběžky*, které však nemají přímou spojitost s rozmnožováním.



Obrázek 4: Vlákňité a bizarní bakterie – příklady.

5. STAVBA BAKTERIÁLNÍ BUŇKY

5.1. Základní struktura

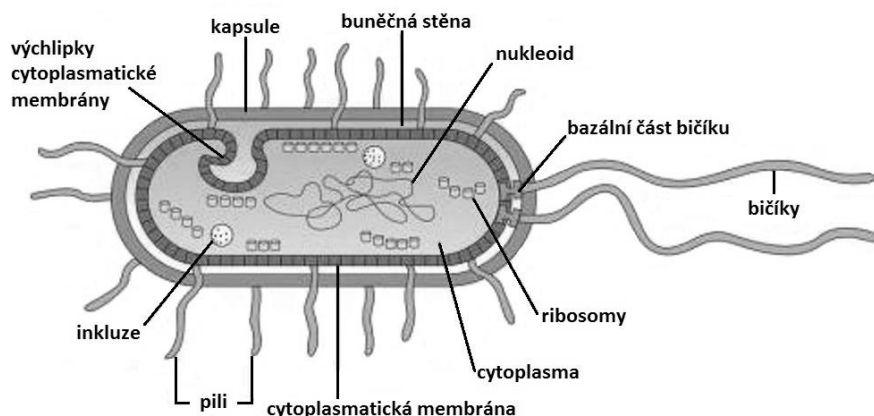
Od eukaryotních buněk – rostlinných a živočišných, se prokaryotní bakteriální buňka liší podstatně jednodušší vnitřní strukturou, základní rozdíly jsou uvedeny v tabulce 3. Mimo rozpustné cytoplasmy má bakteriální buňka vlastně pouze čtyři struktury: jádro, ribosomy, cytoplasmatickou membránu a buněčnou stěnu. Je tvořena jediným, membránami dále neděleným prostorem.

Tabulka 3: Základní rozdíly mezi prokaryotní a eukaryotní buňkou.

Znak	prokaryota	eukaryota
Průměrná velikost	0,5 – 3 μm	> 5 μm
<i>Jádro</i>		
- jaderná membrána	–	+
- jadérko	–	+
- chromosom	1 (cirkulární)	> 1 (lineárních)
- dělení	binární dělení	mitosa
<i>Cytoplasma</i>		
- mitochondrie	–	+
- endoplasmatické retikulum	–	+
- Golgiho aparát	–	+
- lysosomy	–	+
<i>Ribosomy</i>		
- lokalizace ribosomů	rozptýlené v cytoplasmě	připojené k endoplasmatickému retikulu
- sedimentační konstanta ribosomů	70S	80S
- sedimentační konstanta rRNA	16S, 23S, 5S	18S, 28S, 5,85S, 5S
<i>Chemické složení</i>		
- steroly přítomné v membráně	–	+
- peptidoglykan v buněčné stěně	+ (variabilní)	–

(zpracováno podle – Kumar, 2012; Sedláček, 2007)

Na povrchu bakteriální buňky se nachází silná a pevná struktura – **buněčná stěna**, která dává buňce tvar a chrání ji před mechanickými vlivy a účinky osmotického tlaku okolního prostředí. Pod ní je jemná elastická membrána – **cytoplasmatická membrána**, která tvoří osmotické rozhraní buňky a umožňuje transport látek. Cytoplasmatická membrána může vytvářet výčlipky (mesosomy). Ohraničuje vnitřní prostor buňky vyplněný **cytoplasmou**, ve které jsou mimo **jádra** (nukleoid, bakteriální chromosom) u některých bakterií také **plasmidy**, dále **ribosomy** a **zrníčka zásobních látek**. Na povrchu buněčné stěny se mohou vyskytovat **fimbrie** (pili) a polysacharidový **slizový obal** (pouzdro – kapsule, volný sliz či glykokalyx), pohyblivé bakterie mají jeden nebo více **bičků**.



Obrázek 5: Stavba bakteriální buňky. (Kumar, 2012 – upraveno)

5.2. Chemické složení

Obsah **vody** v buněčné hmotě bakterií se pohybuje v rozmezí 70 – 95 % (nejvyšší je u bakterií s polysacharidovými pouzdry). Zbytek tvoří **sušina buněčné hmoty**, která je v převážné míře tvořena 6 základními prvky – uhlíkem (50 % hmotnosti sušiny), kyslíkem (20 %), dusíkem (15 %), dále vodíkem, fosforem a sírou (celkem 12 %). Sušinu buněčné hmoty bakterií tvoří z téměř 97 % makromolekuly – bílkoviny, nukleové kyseliny, polysacharidy a lipidy. Funkce makromolekul je stejná jako v jiných buňkách.

Hlavní podíl sušiny tvoří **bílkoviny** (40 – 80 %), proto je bakteriální hmota bohatým zdrojem plnohodnotných bílkovin pro krmivářské účely. Bílkoviny hrají primární roli v konstrukci bakteriální buňky (strukturální bílkoviny) i v její činnosti (enzymy).

Z nukleových kyselin mají větší zastoupení ribonukleové kyseliny (RNA), jejichž podíl v sušině bakterií tvoří 10 – 30 % (rRNA – 80 %, tRNA – 15 % a mRNA – 2 % z celkové RNA). Deoxyribonukleová kyselina (DNA) představuje pouze asi 2 – 3 % hmotnosti sušiny. Pro vysoký podíl RNA nejsou bakterie vhodné jako náhrada většího podílu živočišných bílkovin ve výživě člověka. Nukleové kyseliny jsou nositelkami genetické informace (DNA) a realizují její přepis a překlad (RNA).

Polysacharidy hrají v bakteriální buňce dvě významné úlohy, a to jako zásobní látka (glykogen) nebo jako konstrukční a funkční součásti buněčné stěny, pouzdra a glykokalyxu (peptidoglykan, lipopolysacharid, teichoové kyseliny). Dále jsou nositeli specifické antigenicity bakterií. Podíl polysacharidů kolísá v rozmezí 5 – 20 % sušiny, přičemž u opouzdřených bakterií je to podstatně více, a to na úkor ostatních složek, především bílkovin.

Obsah **lipidů** je 5 – 10 % sušiny, přičemž v bakteriální buňce jsou zastoupeny prakticky jen lipidy složené (fosfoglyceridy složené z glycerol-3-fosfátu a dvou molekul mastných kyselin). Fosfoglyceridy jsou amfipatické molekuly, díky tomu spontánně vytvářejí ve vodním prostředí dvojvrstvy, a jsou tak konstrukčním prvkem biologických membrán. U převážné většiny bakterií se lipidy vyskytují jen v cytoplasmatické membráně. Některé lipidy asociují s proteiny na tzv. lipoproteiny (vazba mezi lipidem a proteinem je hydrofobní – pojí se přes nepolární hydrofobní části), tyto molekuly hrají zásadní roli ve stavbě a funkci cytoplasmatické membrány.

Minoritní zastoupení mají další organické sloučeniny – meziproducty metabolismu, aminokyseliny, vitamíny a jejich deriváty, barviva, příp. i toxiny či antibiotika. Po zpopelnění suché hmoty buněk stanovíme tzv. **popeloviny** – anorganické složky buněčné hmoty. U bakterií tvoří popeloviny asi 5 – 10 % sušiny buněk. Hlavní složkou popela jsou fosfáty (2 – 6 % sušiny), dále sírany (1 % včetně síry z organických sloučenin), z iontů kovů je nejvíce zastoupen draslík a pak hořčík.

5.3. Buněčná stěna

Jak již bylo zmíněno, hlavní povrchovou vrstvou všech bakterií (s výjimkou mykoplasmat) je buněčná stěna – pevná, tuhá a v podstatě neohebná vrstva, která dává bakteriální buňce tvar a mechanicky ji chrání. Současně ochraňuje bakterii i před chemickými vlivy, proti záření, vyschnutí, nepříznivým osmotickým podmínkám, atd. Buněčná stěna odolává vysokému nitrobuněčnému osmotickému tlaku. Má charakter síta, obsahuje poměrně velké póry, kterými proniká většina molekul s výjimkou vysokomolekulárních látek (bílkoviny, polysacharidy).

Vnější prostředí je pro bakterie většinou hypotonické, tzn. koncentrace solí v něm je nižší než uvnitř buňky. Za této situace má voda tendenci pronikat do bakteriální buňky a tento koncentrační rozdíl vyrovnat procesem zvaným osmóza. Buňka zvětšuje svůj objem, ale nepraská, protože pevná buněčná stěna vysokému osmotickému

tlaku odolává. Oproti tomu v **hypertonickém** prostředí bakterie vodu rychle ztrácejí, podléhají tzv. plasmolyse a hynou. Toho se využívá při uchovávání potravin např. nasolováním nebo přidávkem cukru.

Tabulka 4: Rozdíly ve stavbě buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií.

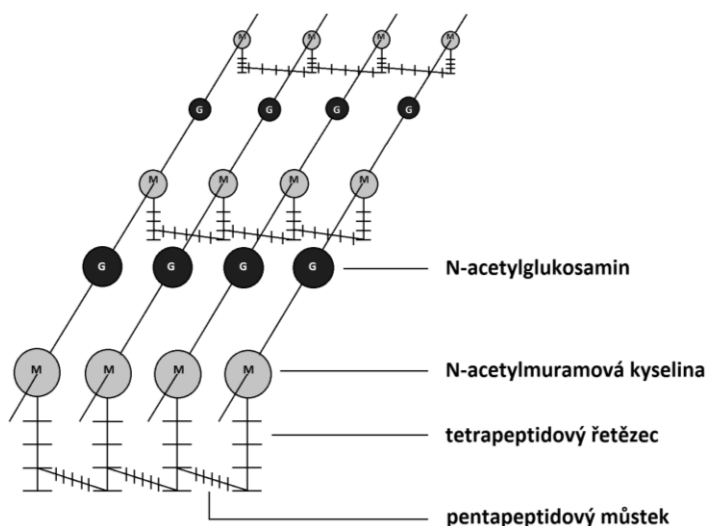
Znak	grampozitivní	gramnegativní
Tloušťka buněčné stěny	silná (20 – 80 nm)	tenká (15 nm)
Peptidoglykanová vrstva	silná (16 – 80 nm)	slabá (2 nm)
Teichoové kyseliny	+	–
Druhové zastoupení aminokyselin	málo druhů	více druhů
Aromatické aminokyseliny	– (vzácně)	+
Aminokyseliny obsahující síru	– (vzácně)	+
Lipidy	– (vzácně)	+
Proteiny	–	+
Lipoproteiny	–	+
Lipopolysacharidy	–	+
Periplasmatický prostor	–	+
Vnější membrána	–	+

(zpracováno podle – Kaprálek, 2000; Kumar, 2012; Mehrotra and Sumbali, 2009)

Unikátní složkou buněčné stěny bakterií je **peptidoglykan** (mukopeptid, murein). Peptidoglykan je polysacharid, tedy lineární polymer dvou pravidelně se střídajících aminocukrů: *N-acetylglukosaminu* a *kyseliny N-acetylmuramové*, které jsou navzájem spojeny β -1-4-vazbami. Tyto vazby jsou hydrolyzovány lysozymem.

Na karboxylovou skupinu kyseliny *N-acetylmuramové* jsou napojeny **tetrapeptidové** postranní řetězce. Typickou kombinací tetrapeptidů je L-alanin-D-glutamová kyselina-variabilní aminokyselina-D-alanin. Variabilní aminokyselinou je nejčastěji L-lysin u grampozitivních bakterií nebo L,L-diaminopimelová kyselina (DAP) u gramnegativních bakterií.

Jednotlivé tetrapeptidové řetězky jsou **vzájemně propojeny**, a to dvojitým způsobem (jedná se o tzv. *transpeptidaci*). U gramnegativních bakterií a některých grampozitivních bacilů je *přímo* spojen koncový D-alanin jednoho tetrapeptidu s předposlední DAP druhého tetrapeptidu. V případě ostatních grampozitivních bakterií je spojení umožněno obvykle **pentapeptidovým řetězcem** (tzv. příčné můstky).



Obrázek 6: Základní struktura peptidoglykanu u grampozitivních bakterií. (Kumar, 2012 – upraveno)

Syntéza peptidoglykanu probíhá ve třech etapách: 1) syntéza prekurzorů buněčné stěny enzymy přítomnými v cytoplasmě; 2) transport prekurzorů přes hydrofobní vrstvu cytoplasmatické membrány v tučích rozpustným přenašečem; a 3) připojení k peptidoglykanu v místě, kde jeho růst probíhá a tvorba peptidové vazby příčného propojení.

Buněčná stěna je rozkládána pomocí enzymu **lysozymu**, který ji hydrolyzuje; **penicilin** a další β -laktamová antibiotika blokují její syntézu. Rozrušíme-li buněčnou stěnu, dostaneme okrouhlé útvary ohraničené cytoplasmatickou membránou – tzv. **protoplasty** u grampozitivních bakterií (zcela bez buněčné stěny) či **sféroplasty** v případě gramnegativních bakterií (zbytky stěny na povrchu buňky). Tyto útvary jsou vždy

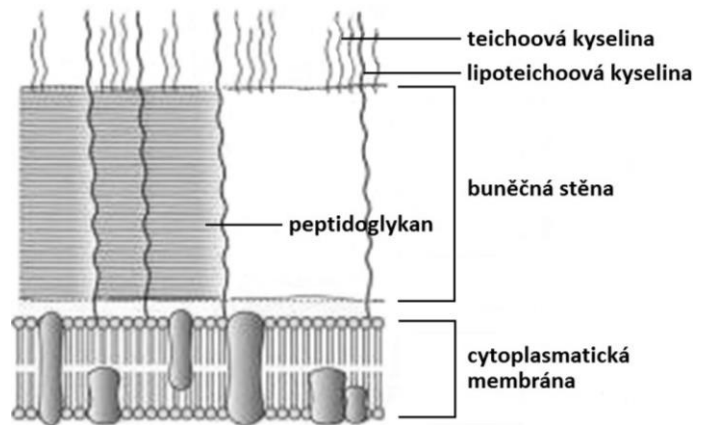
kulovitěho tvaru a musí být udržovány v hypertonickém prostředí. Některé patogenní bakterie mohou i v makroorganismu tvořit tzv. **L-formy** (buňky, které ztratily buněčnou stěnu např. vlivem antimikrobiálních látek), které mohou v prostředí o vhodném osmotickém tlaku přežít, příp. se i množit.

5.3.1. Stavba buněčné stěny grampozitivních bakterií

Buněčná stěna grampozitivních a gramnegativních bakterií má velmi odlišnou stavbu, základní rozdíly jsou uvedeny v tabulce 4.

U grampozitivních bakterií je buněčná stěna silnější (více než 20 nm) a tvoří ji mohutná vrstva **peptidoglykanu**, v níž jsou polysacharidové řetězce uloženy v mnoha vrstvách nad sebou. Na rozdíl od gramnegativních bakterií jsou jednotlivá vlákna peptidoglykanu mnohem více zesíťována příčnými pentapeptidovými můstky.

Peptidoglykanovou vrstvou probíhají kolmo k povrchu buňky lineární řetězce **teichoových kyselin** (kyselé polysacharidy tvořené opakujícími se jednotkami glycerolfosfátu nebo ribitolfosfátu s glykosidicky navázanými cukry). Teichoové kyseliny se nepodílí na pevnosti buněčné stěny, jejich hlavní úlohou je zřejmě vazba kationtů (např. Ca^{2+} a Mg^{2+}) a jsou hlavním **povrchovým antigenem** grampozitivních bakterií.



Obrázek 7: Buněčná stěna grampozitivních bakterií. (Kumar, 2012 – upraveno)

Rozeznáváme dva typy teichoových kyselin: a) **stěnové teichoové kyseliny** kovalentně vázané k peptidoglykanu; a b) **membránové teichoové kyseliny** (lipoteichoové kyseliny), které jsou kovalentně vázané k membránovým glykolipidům a jsou soustředěné hlavně v oblasti mesosomů.

Buněčná stěna grampozitivních bakterií neobsahuje lipidy (výjimka – vosky a lipidy u mykobakterií či korynebakterií) ani proteiny (výjimka – povrchová bílkovinná vrstva streptokoků udělující jim specifické antigenní vlastnosti). Periplasmatický prostor mezi stěnou a cytoplasmatickou membránou je velmi malý.

5.3.2. Stavba buněčné stěny gramnegativních bakterií

Buněčná stěna gramnegativních bakterií je sice tenčí (asi 15 nm), má však mnohem složitější stavbu. Nad tenkou vrstvou **peptidoglykanu** (obvykle pouze jedna vrstva) je tzv. **vnější membrána**, která je jako jiné biologické membrány tvořena dvojitou vrstvou **fosfolipidů** a navázaných **bílkovin**. Relativní obsah fosfolipidů je však menší než v cytoplasmatické membráně, proto jsou fosfolipidy umístěny především ve vnitřní vrstvě vnější membrány. Ve vnější vrstvě jsou nahrazeny molekulami **lipopolysacharidů**.

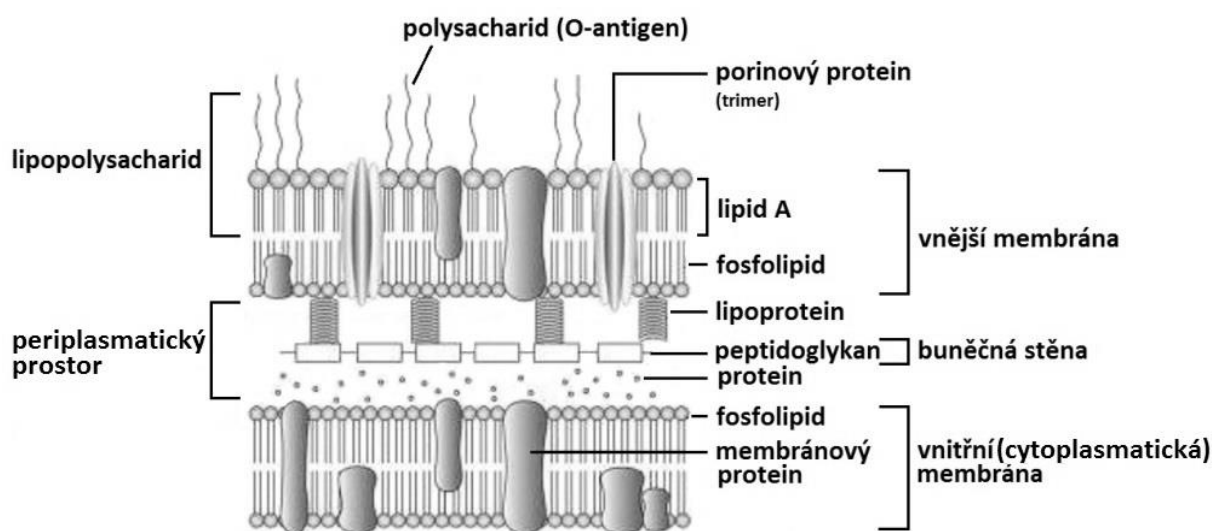
Nejvýznamnější bílkoviny zevní membrány jsou tzv. **poriny**, jedná se o trimery umožňující neselektivní průnik malých hydrofilních molekul skrz vnější membránu. Zakotvení vnější membrány k peptidoglykanu umožňují **lipoproteiny**. Prostor mezi oběma membránami se označuje jako **periplasmatický prostor**, nachází se zde řada molekul – živiny, metabolity, hydrolytické enzymy, enzymy schopné inaktivovat antibiotika (např. β -laktamasy), atd.

Lipopolysacharidy (LPS) jsou unikátní molekuly, které se vyskytují pouze ve vnější membráně gramnegativních bakterií. LPS se skládá se ze tří částí – lipidu A, základního polysacharidu a specifického polysacharidu. **Lipid A**, složený z disacharidu a mastných kyselin, je společný pro všechny LPS a zakotvuje je hydrofobními a hydrofilními silami do lipidové dvojvrstvy vnější membrány. Lipid A je toxický pro vnímavé živočišné buňky a bývá

proto označován jako tzv. *endotoxin*. Na lipid A je navázán *základní polysacharid*, který je společný všem příbuzným druhům bakterií. Na něj potom navazuje *specifický polysacharid* – somatický **O antigen** gramnegativních bakterií, který je velmi dlouhý a vyčnívá ven do prostředí (O antigen je druhově i kmenově úzce specifický).

Mezi vnější a vnitřní membránou existují četná spojení – tzv. **adhezivní místa**, která umožňují pohyb molekul různých látek z jedné membrány do druhé. V tomto místě, mimo jiné, řada bakteriofágů vpravuje svou nukleovou kyselinu do bakteriální buňky.

Zevní membrána umožňuje vstup živin, ale současně brání průniku řady molekul, které jinak snadno pronikají stěnou grampozitivních bakterií. Jedná se např. o některá barviva (krystalová violet), antibiotika či soli žlučových kyselin (proto je možný výskyt gramnegativních bakterií ve střevním traktu savců). Díky stavbě své buněčné stěny jsou gramnegativní bakterie sice mechanicky křehčí, na druhou stranu jsou chemicky odolnější a díky přítomnosti lipopolysacharidů i více chráněné vůči imunitní odpovědi hostitele.



Obrázek 8: Buněčná stěna gramnegativních bakterií. (Kumar, 2012 – upraveno)

5.4. Cytoplasmatická membrána

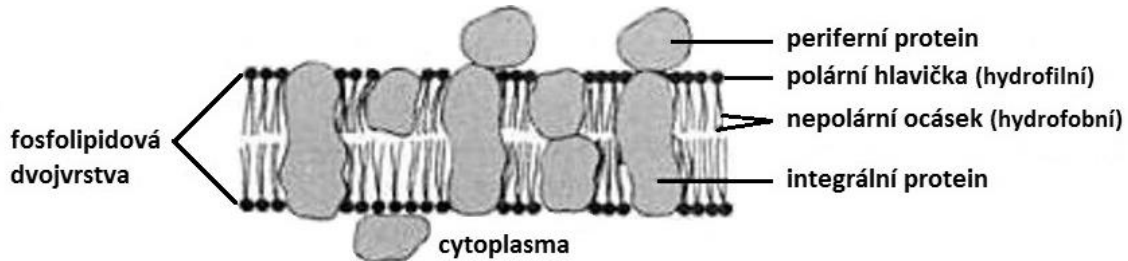
Pod buněčnou stěnou se nachází cytoplasmatická membrána, tenká (asi 5 – 10 nm), obvykle hladká a napjatá membrána obdávající povrch bakteriální cytoplasmy a vytvářející uvnitř bakteriální buňky jediný nedělený prostor. Je viditelná pouze v elektronovém mikroskopu. Protože je to u bakterií **jediná vnitřní biologická membrána**, probíhají na ní všechny buněčné funkce a děje, které nemohou probíhat v roztoku a jsou vázány na membrány (např. oxidativní fosforylace, respirační řetězec).

U řady bakterií pozorujeme různě velké *invaginace* (výchlípky) cytoplasmatické membrány, často označované jako **mesosomy**. V místě invaginací jsou výrazně zmnoženy potřebné enzymové systémy. Mesosomy hrají roli i při dělení bakteriální buňky (vznik přepážky), je na ně navázán enzym DNA polymerasa, která zabezpečuje replikaci nukleové kyseliny svázanou s procesem dělení buňky.

Cytoplasmatická membrána je typická biologická membrána tvořená **dvojvrstvou fosfolipidů** a vmezeřenými **proteiny**. Fosfolipidy vytváří vnitřní hydrofobní a vnější polární (hydrofilní) část, ve které jsou částečně či zcela ponořeny a hydrofobní silou poutány molekuly bílkovin (celou membránou pronikají *integrální proteiny*). Část bílkovin je elektrostatickými silami slabě poutána k povrchové hydrofilní části (*periferní proteiny*). Fosfolipidová dvojvrstva je

tekutá (fluidní), molekuly fosfolipidů i bílkovin mají volnost rotačního i laterálního pohybu. Hovoříme o tzv. *modelu tekuté mozaiky* (obrázek 9).

Chemické složení cytoplasmatické membrány kolísá v závislosti na druhu bakterie a kultivačních podmínkách. Nejčastěji jsou zastoupeny fosfatidylglycerol a fosfatidylethanolamin, cholesterol a další steroly zcela chybí (výjimkou jsou mykoplasmata). Poměr nasycených a nenasycených mastných kyselin se mění v závislosti na kultivační teplotě tak, aby byla zachována potřebná tekutost membrány (nižší teplota – více nenasycených mastných kyselin). Lipidy cytoplasmatické membrány mají mezi glycerolem a vyššími mastnými kyselinami esterovou vazbu, tím se bakterie liší od domény Archaea, kde je tato vazba etherová.



Obrázek 9: Stavba cytoplasmatické membrány. (Mehrotra and Sumbali, 2009 – upraveno)

Cytoplasmatická membrána bakterií je stavebně i funkčně **asymetrická** (většina membránových proteinů je na její vnitřní straně). Nikdy se netvoří *de novo*, ale roste jedině insercí nového materiálu do stávající membrány, což umožňuje správné uspořádání nových membránových molekul.

Hlavní funkce cytoplasmatické membrány bakterií:

1. **semipermeabilita** – regulované a selektivní proudění látek dovnitř bakteriální buňky a jejich vylučování do vnějšího prostředí; malé molekuly (např. voda, O₂, CO₂, jednoduché cukry) membránou volně pronikají (difundují), oproti tomu větší molekuly jsou transportovány pouze pomocí specifických transportních systémů – *permeas*;
2. **osmotická bariéra** – udržuje příznivý osmotický tlak uvnitř bakteriální buňky;
3. **transformace energie** – fotosyntetizující bakterie transformují světelnou energii v energii protonového gradientu; chemotrofní bakterie získávají energii oxidací redukované látky kyslíkem či jiným akceptorem elektronů prostřednictvím respiračního řetězce vytvářejícího protonový gradient; oba tyto systémy jsou lokalizovány na membráně;
4. **místo lokalizace dalších enzymových systémů** – na cytoplasmatické membráně jsou lokalizovány např. enzymy řídící syntézu a hydrolýzu fosfolipidů či syntézu složek buněčné stěny a pouzdrových obalů;
5. **separace molekul DNA** – cytoplasmatická membrána hraje roli také při replikaci DNA, která je připojena k membráně v místě mesosomů; po replikaci jsou dvě nové molekuly DNA fyzicky separovány syntézou nové cytoplasmatické membrány a syntézou buněčné stěny inzercí peptidoglykanových prekurzorů (dělení bakterií, asymetrické dělení buňky při vzniku spor). *Syntéze a inzerci peptidoglykanu, stejně jako rozestupu genetické informace při dělení buňky napomáhá bakteriální cytoskelet.*

Mimo to jsou v cytoplasmatické membráně u pohyblivých bakterií zakotveny bílkoviny tzv. rotoru bakteriálních bičíků. Nachází se zde i specifické proteiny umožňující bakterii sledovat chemické a fyzikální změny ve vnějším prostředí.

5.5. Cytoplasma a struktury v ní uložené

Cytoplasma je koncentrovaný, viskózní, vodný roztok mnoha biomolekul (enzymy, nukleové kyseliny, aminokyseliny, nukleotidy, lipidy, sacharidy, různé metabolity a řada dalších

nízkomolekulárních látek). Obsahuje až 80 % vody a spíše než roztok připomíná měkký gel. Zcela vyplňuje vnitřní prostor bakteriální buňky a probíhá v ní většina metabolických procesů. Cytoplasma obsahuje 4 druhy **strukturálních útvarů**: nukleoid (jádro), ribosomy, granula zásobních látek a vlákna bakteriálního cytoskeletu. U některých bakterií se mohou vyskytovat také plasmidy.

Vodní fototrofní bakterie bývají nadnášeny plynovými vakuolami. Jejich bílkovinná membrána je zcela propustná pro všechny plyny a vodu, vnitřní struktura vakuol je tvořena plynovými váčky cylindrického tvaru s kónickými konci.

U některých bakterií obsahuje cytoplasma také různá **barviva**. Nejčastěji se jedná o **karotenoidní barviva** zbarvující buňky a jejich kolonie žlutě, oranžově, růžově až červeně (např. *Staphylococcus aureus*). U jiných se nachází černá barviva **melanoidního typu**. Karoteny ani melaniny nejsou živými buňkami uvolňovány do prostředí. Naproti tomu řada dalších barviv je do prostředí exkretována a růst bakterií je doprovázen charakteristickými barevnými změnami živného média. Patří sem např. modrá, žlutozelená až červená **barviva fenazinové povahy** tvořená některými pseudomonádami (*Pseudomonas fluorescens*).

Rezervní látky zastupuje především glykogen a kapénky poly- β -hydroxymáselné kyseliny (ta je pro bakterie specifická), dále se může vyskytovat polyfosfát volutin či polysacharid granulosa. U siřných bakterií slouží jako rezervní zdroj energie zrníčka síry, neutrální tuky se u bakterií nevyskytují.

Bakteriální cytoskelet je tvořen řadou vláknitých proteinů (např. protein MreB – analog aktinu, protein FtsZ – analog tubulinu), které regulují tvar bakteriální buňky, ovlivňují její polaritu a napomáhají syntéze peptidoglykanu, rozestupu nukleových kyselin a dělení buňky.

5.5.1. Jádro a plasmidy

5.5.1.1. Jádro bakteriální buňky

Jádro bakteriální buňky (nukleoid, bakteriální chromosom) se v elektronovém mikroskopu jeví jako světlejší oblast uprostřed tmavší cytoplasmy. Jádro prokaryot bývá označováno jako tzv. **nepřavé jádro** – není odděleno jadernou membránou, nemá stálý tvar a je tvořeno **jedinou kovalentně do kruhu uzavřenou molekulou DNA** (výjimkou je např. *Borrelia burgdorferi* jejíž DNA je lineární). Molekula DNA je ve srovnání s bakteriální buňkou nepoměrně delší (asi 1,4 mm v porovnání s asi 2 μm délky bakteriální buňky), proto musí být mnohonásobně poskládána do struktury vyššího řádu (tzv. **superhelicita** – nadšroubovicové vinutí). Molekula DNA je prostřednictvím mesosomu napojená na vnitřní stěnu cytoplasmatické membrány.

Na rozdíl od chromosomů eukaryot neobsahuje bakteriální chromosom **histony** (tj. specifické zásadité bílkoviny), jejich regulační funkci zřejmě vykonávají nízkomolekulární **polyaminy**.

Molekula DNA je dvoušroubovice paralelních řetězců spojených vodíkovými můstky. Polynukleotidová vlákna jsou složena ze čtyř typů nukleotidových podjednotek – purinové báze (adenin, guanin) a pyrimidinové báze (thymin, cytosin). Obě vlákna jsou propojena vodíkovými můstky mezi bázemi nukleotidů, kdy adenin je spojen 2 vodíkovými můstky s thyminem a guanin 3 vodíkovými můstky s cytosinem.

V klidové, nerostoucí buňce je přítomen vždy jen jeden chromosom. V rostoucí buňce probíhá současně s růstem i replikace DNA, která předchází rozdělení buňky, proto se zde může vyskytovat více chromosomů (až 4). Je-li dělení buňky zpomaleno nebo poškozeno, ale replikace DNA probíhá, mohou vznikat vláknité vícejaderné buňky.

Genetická informace bakterií, determinovaná lineárním pořadím nukleotidů v DNA, je **haploidní** a obsahuje daný gen jen v jedné alele (snadný projev případných mutací). Bakterie nezná mitosu, meiosu ani sexuální rozmnožování. **Jaderné dělení** (replikace DNA a prostorové oddálení obou jader) je jednodušší než u eukaryot, bezprostředně na ně navazuje

dělení buněčné (více kapitola 7.1.). Realizace genetické informace (transkripce, translace a proteosyntéza) probíhá podobně jako u ostatních organismů (více kapitola 6.2.).

5.5.1.2. Plasmidy

Některé bakterie mohou, nezávisle na bakteriálním chromosomu, obsahovat další malé kruhové molekuly dsDNA (dvouvláknové DNA) označované jako **plasmidy**, jedná se tedy o mimochromosomální DNA schopnou se autonomně replikovat. Plasmidy představují přídavnou genetickou informaci, která není pro život bakteriální buňky nezbytná, ale na druhou stranu jí může poskytnout řadu výhod. Plasmidy kódují např. rezistenci na antibiotika a chemoterapeutika (R plasmid), rezistenci na těžké kovy, produkci antibiotik, toxinů a bakteriocinů (bílkoviny toxicky působící na jiné příbuzné bakterie), degradaci a oxidaci organických látek (např. ropa, toluen) či tvorbu restričních a modifikačních enzymů.

Plasmid je asi 100× menší než bakteriální chromosom, jeho relativní molekulová hmotnost je řádově $10^6 - 10^8$ daltonů, chromosomu 10^9 daltonů. Plasmidy kódují asi 3 – 100 genů, bakteriální chromosom asi 3 000.

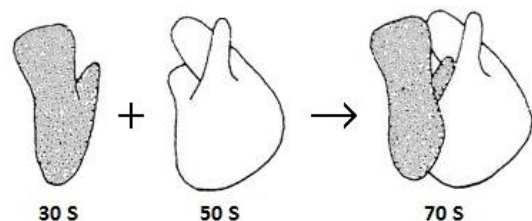
Bakteriální buňka není schopna plasmid sama vytvořit, ale může ho získat od jiné buňky jedním ze tří způsobů **horizontálního přenosu genů** – konjugací, transdukci či transformací (více viz kapitola 6.6.). Při **konjugaci** jsou tzv. **konjugativní plasmidy** (F, F' plasmidy) schopny po spojení donorové buňky s recipientní specifickou fimbrií přecházet z buňky do buňky, a to nejen stejného, ale i různých druhů či dokonce rodů. Nekonjugativní plasmidy mohou být přeneseny **transdukci** – tj. pomocí bakteriofágů. Třetí možností je **transformace**, kdy volná molekula DNA může proniknout do jiné bakteriální buňky a stát se její součástí.

Plasmidy se vyskytují volně v cytoplasmě bakteriální buňky nebo mohou být včleněny do bakteriálního chromosomu (tzv. **integrováný plasmid**). Pokud je integrován konjugativní plasmid, může při konjugaci nastat situace, kdy integrováný plasmid při přechodu do recipientní buňky vleče sebou i chromosom (či jeho část) a dočasně dojde ke vzniku diploidní buňky. Při následujícím dělení se tato situace sama vyřeší.

5.5.2. Ribosomy

V bakteriální buňce se v závislosti na podmínkách růstu nachází 15 000 až 30 000 ribosomů, které tvoří až 40 % sušiny bakteriální buňky. Ribosomy prokaryot mají jinou stavbu a velikost než ribosomy eukaryot, jejich funkce však zůstává stejná. Je to místo, kde se uskutečňuje syntéza bílkovin. Ribosomy bakterií jsou menší (10 – 20 nm) a jsou složeny ze dvou podjednotek **30S** (1 molekula 16S rRNA a 21 molekul bílkovin) a **50S** (5S rRNA, 23S rRNA a 34 molekul bílkovin), obě podjednotky se spojují ve funkční jednotku **70S** (obrázek 10).

Ribosom je tedy asymetrický supramolekulární komplex složený ze 3 molekul rRNA (tzv. ribosomální RNA) a 55 molekul bílkovin. Díky odlišné stavbě ribosomů mohou některá antibiotika (např. aminoglykosidy) inhibovat proteosyntézu bakterií aniž by ovlivnily činnost ribosomů v buňkách makroorganismu. *Ribosomy eukaryot jsou větší, funkční jednotka 80S je tvořena z podjednotek 40S a 60S (S = Svedberg).*



Obrázek 10: Schéma bakteriálního ribosomu. (Kaprálek, 2000 – upraveno)

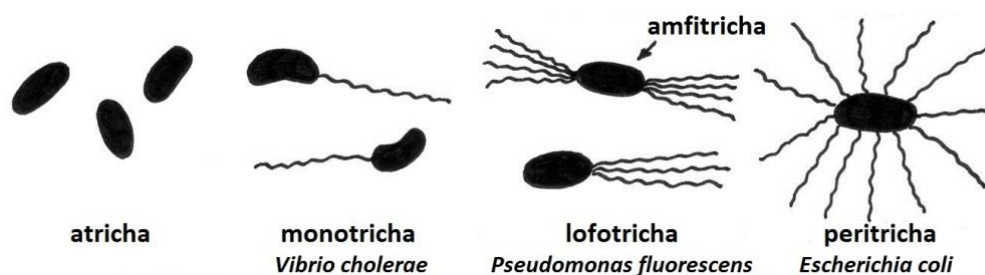
Ribosomy jsou místem, kde se setkává několik různých molekul a kde je genetická informace nesená mRNA (tzv. mediátorová RNA) přeložena (tzv. **translace**) v primární strukturu, tedy sekvenci aminokyselin, bílkovin. Ribosomy se v cytoplasmě vyskytují volně, velký podíl (60 %) se koncentruje v oblasti jádra, kde nasedají na vznikající mRNA a hned ji překládají, část (asi 30 %) nasedá na vnitřní stranu cytoplasmatické membrány, kde syntetizují proteiny

určené do membrány nebo na export. Ribosomy mají tendenci tvořit agregáty různé velikosti – *polyribosomy*, *polysomy*.

Při translaci se genetická informace kódovaná pořadím jednotlivých nukleotidů přepisuje do sekvence aminokyselin. V genetickém kódu je trojici nukleotidů (triplet, kodon) v mRNA vždy přiřazena jedna aminokyselina (některé jsou kódovány větším počtem kodonů). Iniciační kodony jsou AUG (pro methionin) a GUG (pro valin), některé kodony mají funkci terminační. Translace navazuje na transkripci (přepis genetické informace z DNA do mRNA). Ribosom nasedá na mRNA v tzv. vazebném místě (krátká specifická sekvence bází).

5.6. Bičíky

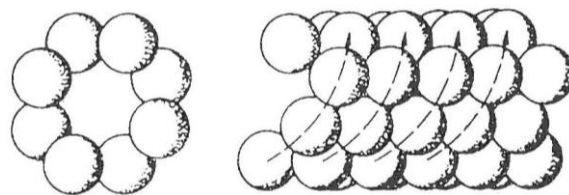
Pohyb bakterií je umožněn díky bičíkům. Bičíky jsou tenká vlákna mnohonásobně delší než bakteriální buňka (tloušťka 20 – 30 nm, délka asi 20 μm). Podle počtu a umístění bičíků rozlišujeme několik typů bakterií (viz obrázek 11). Jedná se o *atrícha* (zcela bez bičíků), *monotrícha* (jediný bičík umístěný na pólu buňky), *lofotrícha* (svazek bičíků umístěný na jednom pólu buňky), *amfitrícha* (svazek bičíků umístěný na obou pólech buňky) a *peritrícha* (bičíky pokrývají celou buňku).



Obrázek 11: Umístění bičíků na buňce bakterií.

I přes jejich délku je tloušťka bičíků tak nepatrná, že jejich pozorování světelným mikroskopem je velmi obtížné. Pro jejich zviditelnění se používají náročné barvicí postupy, např. *stříbření*. Běžně můžeme bičíky pozorovat v elektronovém mikroskopu. Jednoduchým způsobem průkazu pohyblivosti bakterií je jejich kultivace v polotuhých živných půdách.

Každý bičík se skládá ze 3 částí – vlákna bičíku, háčku a bazální části (osa a kruhové destičky). **Vlákno bičíku** je složeno z bílkoviny *flagelinu*. Aminokyselinové složení flagelinu (a tím i jeho antigennost) se u jednotlivých druhů či sérotypů bakterií liší, hovoříme o tzv. *bičíkových H-antigenech*. Molekuly flagelinu jsou uspořádány ve šroubovici, uvnitř je vlákno duté. Po své syntéze v cytoplasmě prochází molekuly flagelinu dutinou uprostřed vlákna bičíku až na jeho rostoucí konec, kde se díky svému tvaru automaticky zapojují mezi prostorově komplementární sousední molekuly.



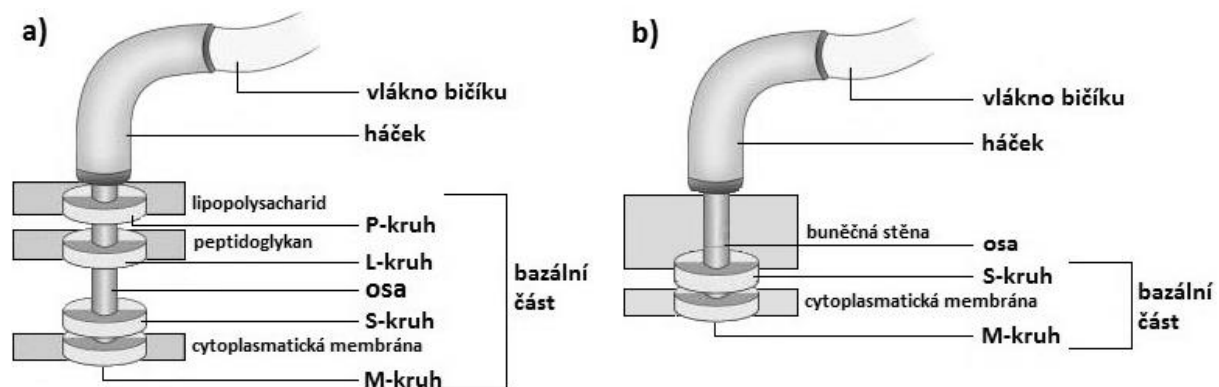
Obrázek 12: Uspořádání molekul flagelinu. (Kaprálek, 2000)

Háček je silnější část zpevňující spodní konec vlákna. Vytváří flexibilní spojení mezi fixovanou bazální částí a rigidním (neohebným) vláknem. Háček je také tvořen z bílkovinných podjednotek, které jsou ale odlišné od flagelinu.

Bazální část kotví bičík v buněčné stěně a cytoplasmatické membráně. U gramnegativních bakterií se skládá ze dvou párů kruhových destiček (P-, L-, S- a M-kruh), jejichž středem prochází osa připojující je k háčku. Grampozitivní bakterie mají pouze spodní dvojici destiček (S- a M-kruh). Spodní prstenec, tedy M-kruh, je v obou případech zakotven v cytoplasmatické membráně, ostatní prstence potom v dalších částech buněčné stěny (viz obrázek 13).

Bičík rotuje na způsob lodního šroubu, kdy volně otáčivý M-kruh funguje z mechanického hlediska jako *rotor* a nepohyblivá sousední destička (S-kruh) funguje jako *stator*. Zdrojem energie pro rotaci je *elektrochemický potenciál* (gradient protonů) na cytoplasmatické membráně. Bakterie má možnost měnit rychlost i směr otáčení bičíku.

Rychlost pohybu bakterie je poměrně velká, až 50 μm za sekundu. Při pohybu bakterie se střídají fáze přímočarého pohybu v náhodném směru s okamžiky, kdy se bakterie zastaví a točí se na místě („kotrmelcování“), potom následuje přímočarý pohyb v novém směru. Pohyb bakterií může být zcela náhodný nebo je ovlivněn přítomností určitých látek v prostředí a bakterie se pohybují do oblasti optimální koncentrace těchto látek – pozitivní či negativní *chemotaxe*. Uplatňují se zde *chemotaktické receptory* v cytoplasmatické membráně. Podobná reakce aerobních či anaerobních bakterií na kyslík se nazývá *aerotaxe*, reakce fototrofních bakterií na světlo potom *phototaxe*. Má-li buňka více bičíků, musí být jejich pohyb koordinován. Bylo prokázáno, že peritrichální bičíky při svém pohybu vytvářejí jediný svazek, který pohání buňku dopředu.



Obrázek 13: Stavba bičíku – a) gramnegativních, b) grampozitivních bakterií. (Kumar, 2012 – upraveno)

Orgánem pohybu spirochet jsou tzv. *axiální vlákna*. Jejich stavba je podobná jako u bičíků, vycházejí z pólů buňky, ale jsou uložena pod jejím povrchem. Svým zkracováním či prodlužováním uvádějí buňku do pohybu, který může být rotační, vývrtkovitý nebo hadovitý.

5.7. Další povrchové struktury

5.7.1. Pili (fimbrie)

Na povrchu gramnegativních bakterií můžeme pozorovat četná velmi křehká, krátká, rovná, dutá vlákna trčící všemi směry. Jedná se o *fimbrie* neboli *pili* (j.č. *pilus*). Na jedné buňce jich může být až několik set. Fimbrie jsou tvořeny proteinovými podjednotkami (tzv. *piliny*), pozorovat je můžeme v elektronovém mikroskopu. Mají antigenní vlastnosti. Jejich tvorba je ovlivněna podmínkami vnějšího prostředí (pH, teplota, obsah kyslíku).

Dělíme je na několik typů. Většina z nich má adhezivní funkci – usnadňují specifickou kolonizaci hostitele. Zvláštním typem jsou fimbrie kódované konjugativním plasmidem (tzv. *F pili* nebo též méně správně *sex pili*), které jsou poměrně velké a ohebné. Z bakterie označované jako buňka donorová vystupuje obvykle jeden sex pilus. Ten při konjugaci vytváří dutý můstek mezi donorovou a recipientní buňkou, kterým prochází plasmidová DNA z jedné buňky do druhé.

Curli (z angl. *curl*, kadeř, kudrna) jsou shluky štíhlých zprohýbaných vláček na povrchu některých escherichií a salmonel, které na sebe váží sérové bílkoviny (fibronektin, bílkoviny nezbytné pro srážení krve) a mohly by odpovídat za některé příznaky sepse.

5.7.2. Pouzdro, glykokalyx, S-vrstva

Některé grampozitivní i gramnegativní bakterie vytváří nad buněčnou stěnou další polysacharidovou vrstvu různé tloušťky a stavby. Tvorba extracelulárních polymerů není pozorována u všech bakterií, je mimo jiné ovlivněna i složením vnějšího prostředí.

Je-li tato vrstva kondenzovaná a ostře ohraničená, označuje se jako **pouzdro – kapsule**. Pouzdro má antigenní vlastnosti (kapsulární K antigen u *E. coli* či *Klebsiella pneumoniae*) a přispívá k virulenci a invazivitě patogenních bakterií (ochrana před napadením bakteriofágy, proti účinku protilátek či zvýšení odolnosti vůči fagocytóze). Pouzdro *Bacillus anthracis* je jako jediné tvořeno polypeptidy, konkrétně poly-D-glutamovou kyselinou.

Polysacharidová vrstva může být také ve formě **volného slizu** (např. u bakterie *Leuconostoc mesenteroides* – rosolovatění slazených minerálních vod či *Bacillus* spp. – nitkovitost pečiva) nebo řídké síťoviny polysacharidových vláken – tzv. **glykokalyx**, která hraje klíčovou roli v adhezenci bakterií na různé povrchy (zubní plak, tvorba biofilmů).

Extracelulární polymery nepřijímají běžná barviva, dají se nejlépe znázornit **negativním barvením** např. pomocí tuše a karbolfuchsinu. Částičky tuše polysacharidovou vrstvou neproniknou, takže ve výsledku pozorujeme na šedočerném pozadí červeně obarvené buňky obklopené prázdným dvorcem.

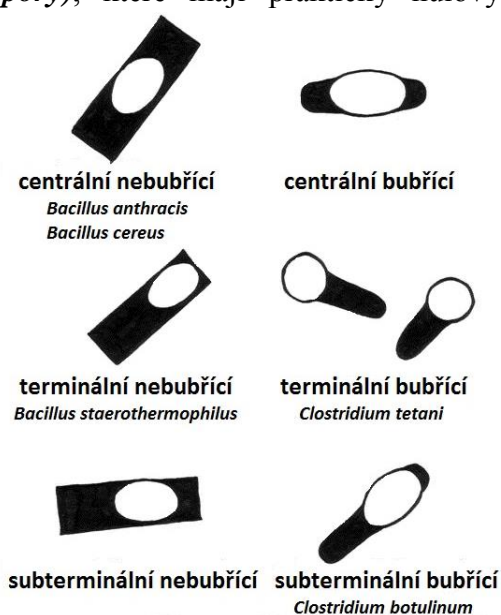
Další objevenou povrchovou strukturou je tenká vrstva strukturovaného proteinu či glykoproteinu, která se označuje jako **S-vrstva**. Jedná se o pravidelnou, plochou, dvojrozměrnou vrstvu monomolekulárních bílkovinných podjednotek tvořících na povrchu buňky určitou síťovinu či „krystalickou mřížku“. Druhově specifické bílkovinné podjednotky mohou mít např. tvar čtverce nebo šestiúhelníku, často vypadají jako dlaždice.

5.8. Bakteriální spory

Některé grampozitivní bakterie, např. rody *Bacillus* a *Clostridium*, mohou za nepříznivých podmínek vytvářet klidová stádia – **spory (endospory)**, které mají prakticky nulový metabolismus a jsou extrémně odolné. Každá bakterie je schopna vytvořit uvnitř své buňky vždy jen jednu endosporu. Spory aktinomycet nejsou endosporami, protože se tvoří na konci vlákna a vzniká jich větší počet.

Pod mikroskopem vyhlíží spory jako vysoce světlolomné útvary, které nepřijímají Gramovo barvení. Lze je obarvit speciálními barvicími postupy, např. barvením za horka.

Tvar, relativní velikost a uložení spor jsou často typické pro různé druhy sporulujících bakterií, čehož lze využít k jejich identifikaci. Spory jsou většinou oválné, méně často kulaté (kulaté spory má např. *C. tetani*). Pro řadu bakterií rodu *Clostridium* je typické, že průměr spory je větší než průměr vegetativní buňky a proto dochází k jejímu vyklenutí neboli zduření (spora buňku tzv. „bubří“),



Obrázek 14: Tvar a uložení endospor.

u bakterií rodu *Bacillus* k duření buňky obvykle nedochází. Spory mohou být v bakteriální buňce uloženy buď *centrálně* (uprostřed), *terminálně* (na konci) nebo *subterminálně* či *paracentrálně* (mezi středem a pólem buňky).

Extrémní **odolnost spor** vůči podmínkám zevního prostředí je dána hned několika faktory: stabilizací makromolekul, ztrátou vody a její náhradou v polymerech vápníkem. Jako spory mohou bakterie přežívat i řadu let. Spory jsou vysoce odolné k vysychání, vysoké teplotě (např. spory *C. botulinum* přežívají až pětihodinový var), mražení, pH, UV záření, do jisté míry i radiačnímu záření, řadě desinfekčních prostředků, atd. **Termorezistenci** spor zvyšuje přítomnost organických látek – bílkovin, lipidů a vyšších koncentrací sacharidů, které mají ochranný efekt. Oproti tomu kyselé pH termorezistenci spor snižuje. Málo kyselé a nekyselé potraviny proto sterilujeme teplotami nad 100 °C, výrazně kyselé potraviny (pH pod 4,0) stačí zahřívát na teplotu 85 až 100 °C, protože přežívající spory bakterií nemohou v kyselém prostředí vyklíčit, tzn. přeměnit se ve vegetativní buňku, pomnožit se a potravinu znehodnotit.

Na spory vůbec nepůsobí ethanol, deriváty fenolu či povrchově aktivní látky. Spolehlivé sporocidní účinky mají např. ethylenoxid, koncentrované louhy a kyseliny či kyselina peroctová (Persteril). Spory ničí autoklárování, tj. působení vodní páry za zvýšeného tlaku, a to minimálně 20 minut při teplotě 121 °C a přetlaku 0,2 MPa.

5.8.1. Tvorba spor – sporulace

Proces tvorby spor se označuje jako **sporulace**. Molekulární mechanismus rozhodnutí buňky sporulovat není dosud přesně znám. Jisté je, že na jedné straně jde o událost kausální (příčinou je chybějící živina, zejména uhlík či dusík), na druhé straně o událost nahodilou (ne všechny buňky v homogenní kultuře sporulují současně). Sporulace nastává při poklesu živin pod určitou hodnotu, obvykle na konci exponenciální fáze růstu, a trvá asi 10 hodin.

Vlastní proces sporulace lze rozdělit do sedmi navazujících morfologických stadií:

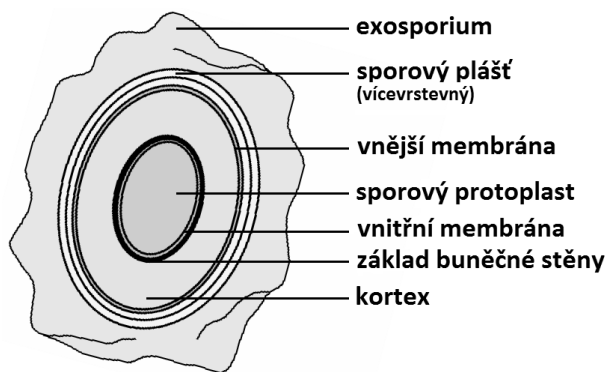
- *stadium 0*: výchozím bodem je vegetativní buňka;
- *stadium I*: mění se morfologie jádra, dochází k **replikaci chromosomu**, původně kruhový chromosom se **linearizuje** a oba chromosomy jsou spojeny v jediné podélně umístěné vlákno;
- *stadium II*: pro toto stadium je charakteristické rozdělení jádra následované rozdělením buňky sporovým septem na dvě nestejně velké části. **Sporové septum** je dvouvrstvá struktura, která vzniká vychlípěním cytoplasmatické membrány směrem do nitra buňky. Uzavřením septa se cytoplazma původní mateřské buňky (tzv. *sporangia*) oddělí od prostředí budoucí spory, které obsahuje chromosom, ribosomy, enzymy, zásobní látky a další složky.
- *stadium III*: v průběhu tohoto stadia putuje budoucí spora dovnitř mateřské buňky za současného prodlužování septa směrem k pólu buňky, čímž se vytvoří **vnitřní a vnější membrána** spory. Na konci této fáze vzniká tedy uvnitř mateřské buňky samostatná buňka obdaná dvojitou membránou, tzv. **prespora**. Prespora je barvitelná a citlivá k nepříznivým podmínkám prostředí. Od tohoto okamžiku je proces sporulace již nevratný.
- *stadium IV*: v následujících stadiích dochází ke tvorbě obalových vrstev spory, nejprve se mezi vnitřní a vnější membránou začne tvořit silná vrstva zvaná **kortex** (peptidoglykan specifické stavby). Nejprve se tvoří jeho vnitřní vrstva, tzv. **sporová stěna**, jejíž stavba je shodná s peptidoglykanem buněčné stěny a ze které při klíčení vznikne buněčná stěna nové vegetativní buňky. Potom se vytvoří vnější silnější vrstva specifického peptidoglykanu kortexu. Začíná se tvořit kyselina dipikolinová a ukládat vápník. Spora se poprvé jeví jako světlolomná.

- *stadium V*: v tomto stadiu se nad vnější membránou vytvoří **plášť spory** – několik vrstev bílkovinné povahy obsahujících velké množství sirmé aminokyseliny cystinu. Současně pokračuje syntéza kyseliny dipikolinové a ukládání vápenatých iontů.
- *stadium VI*: v průběhu **zrání** získává spora své typické vlastnosti – světlolomnost, dehydrataci (spora obsahuje pouze 15 % vody) a odolnost vůči chemickému a fyzikálnímu poškození. Pro sporu je charakteristický obsah *dipikolinátu vápenatého* (kyselina dipikolinová ve vegetativních buňkách chybí). Nízký obsah vody a přítomnost dipikolinátu vápenatého jsou příčinou vysoké termorezistence spor.
- *stadium VII*: dochází k lýzi mateřské buňky a uvolnění spory do prostředí.

U některých druhů se na povrchu spory vytvoří ještě další volná blána, tzv. **exosporium**, které má charakteristický tvar (např. exosporium *B. cereus* tvoří na koncích spory křídla). Exosporium se začíná tvořit od III. stadia sporulace.

Mezi nejvýznamnější **fyzilogické změny** patří: vznik molekul a struktur, které se nevyskytují ve vegetativní buňce (kyselina dipikolinová, peptidoglykan kortexu, bílkoviny sporového pláště), zvýšení aktivity enzymů Krebsova cyklu a rychlosti produkce energie aerobní respirací, tvorba hydrolytických enzymů, hromadění vápníku a dehydratace.

Energii nezbytnou pro syntézu povrchových struktur spory získává bakteriální buňka oxidací poly- β -hydroxymáselné kyseliny (zralé spory ji nemají). U aerobních bakterií je pro sporulaci nezbytná přítomnost kyslíku, u anaerobních kyslík sporulaci inhibuje.



Obrázek 15: Průřez bakteriální sporou.

Dormantní (klidová) spora je tvořena protoplastem obdaným vnitřní membránou, kortexem, vnější membránou, několikavrstevným pláštěm a případně i exosporiem (obrázek 15). Má téměř nulový obsah volné vody a neměřitelný metabolismus.

5.8.2. Klíčení spor – germinace

Germinace neboli **klíčení bakteriální spory** je proces její přeměny ve vegetativní buňku schopnou dalšího rozmnožování. Nastává po přenesení spory do vhodných fyzikálně-chemických podmínek pro růst a množení (dostatek vody a živin, vhodné pH a teplota). Celý proces má tři fáze – aktivaci, vlastní klíčení a fázi diferenační.

Aktivace spory spočívá v porušení nepropustného sporového pláště. Aktivačním zásahem je mechanický oděr, zvýšená teplota, nízké pH, atd. Přirozeným způsobem aktivace je i stárnutí spory. V laboratoři můžeme aktivaci spory navodit mírným záhřevem v přítomnosti vody.

Vlastní klíčení (germinace) je irreverzibilní a metabolický proces. V přítomnosti vody a živin dochází k rozpadu kortexu a uvolnění sporového protoplastu. Aktivovaná spora začne přijímat vodu, tím ztrácí svoji rezistenci a bílkoviny, které v ní vznikly jako stabilizátory, se začínají rozkládat enzymy přítomnými v dormantní (klidové) spoře. Do prostředí se uvolňuje dipikolinát vápenatý, do buňky vstupuje voda, různé ionty (např. K^+ , Mg^{2+}) a molekuly. V průběhu klíčení mizí termorezistence i světlolomnost. Tato fáze probíhá asi 1 minutu.

V **diferenační fázi** se ze vzniklých aminokyselin syntetizují nové proteiny. Sporový protoplast je přestaven ve vegetativní buňku. Celý proces klíčení končí prvním buněčným dělením bakteriální buňky.

6. GENETIKA MIKROORGANISMŮ

Mikroorganismy hrají v poznávání genetických a molekulárně biologických principů důležitou roli. Zejména bakterie *Escherichia coli* posloužila k odhalení řady procesů a stala se oblíbeným modelovým organismem, neboť se velmi rychle množí, snadno roste na různých agarech, pokusy jsou levné a zásahy v její DNA se následně dobře projeví jasně odlišitelnými fenotypovými změnami.

Vědní obor zabývající se dědičností a proměnlivostí se nazývá **genetika**. Dědičnost je schopnost v procesu reprodukce předávat souhrn biologických znaků na potomstvo. V současné době je pozornost věnována nejvíce procesům molekulárně biologickým.

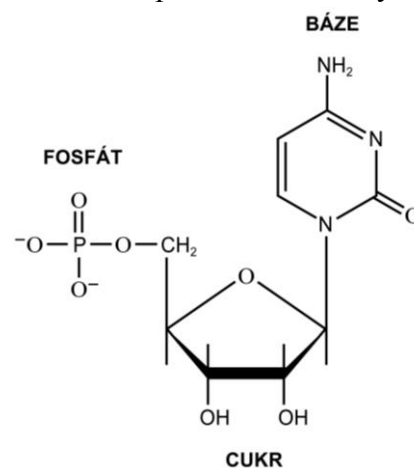
Mezi biomakromolekuly, které mají významnou úlohu při přenosu genetické informace, patří nukleové kyseliny a proteiny. Mezi těmito molekulami je vztah, díky kterému je v živých soustavách zabezpečen metabolismus a reprodukce. Nukleové kyseliny zajišťují přesný přenos genetické informace z rodičů na potomstvo a její přenos na proteiny. Proteiny mají funkci jednak stavební (strukturální proteiny) a jednak biokatalytickou (enzymy).

6.1. Genetická informace a struktura nukleových kyselin

Genetická informace je potřebná k vytvoření a udržení života každého organismu, je uložena v každé živé buňce. Při buněčném dělení přechází z mateřské buňky do buňky dceřiné a tak je v populaci organismů přenášena z generace na generaci (dědí se). Genetická informace je v organismu zapsána ve formě sekvence (pořadí) nukleotidů. V sekvenci DNA může být obsažena informace o primární struktuře proteinu nebo informace o biologicky funkční RNA (transferová – tRNA, ribosomová – rRNA, aj.). Sekvence DNA i RNA mohou obsahovat také informace o vazbě specifických proteinů k těmto sekvencím, které zahajují nebo zastavují transkripci.

Popsání struktury DNA bylo přelomem v biologii dvacátého století. Nukleové kyseliny jsou tvořeny polynukleotidovými řetězci. Jsou to polymery složené z **nukleotidů** spojených navzájem fosfodiesterovými vazbami. Nukleotidy mohou být buď deoxyribonukleotidy tvořící makromolekulu DNA, nebo ribonukleotidy tvořící RNA. Pořadí (sekvence) nukleotidů se označuje jako **primární struktura DNA**, případně RNA. Podle této primární struktury se v průběhu translace vytvoří primární struktura proteinu (polymer aminokyselin spojených navzájem peptidovými vazbami).

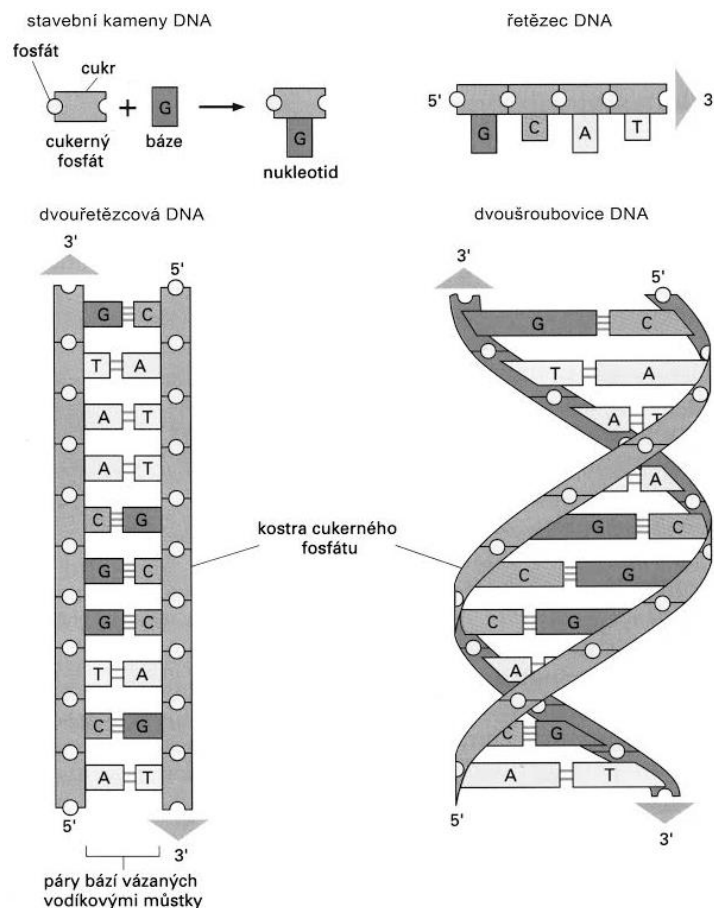
Molekula nukleotidu sestává z pětiuhlíkového sacharidu (pentosy), a to 2-deoxy- β -D-ribosy (u DNA), nebo β -D-ribosy (u RNA), dále z kyseliny trihydrogenfosforečné a z purinové (A – adenin, G – guanin) nebo pyrimidinové (C – cytosin, T – thymin, U – uracil) báze (obrázek 16). Molekula DNA obsahuje báze cytosin, guanin, adenin a thymin, molekula RNA má místo thyminu uracil. Nukleotidy jsou navzájem spojeny fosfodiesterovou vazbou. Jeden konec řetězce je označován jako 3'-konec (tvořen OH- skupinou na C3'-uhlíku) a druhý jako 5'-konec (tvořen fosfátovou skupinou na C5'-uhlíku). Pořadí nukleotidů v řetězci nukleové kyseliny (primární sekvence) se označuje zkratkami bází (např. 5'-AGCCTCGCGGAT-3').



Obrázek 16: Příklad molekuly nukleotidu (β -D-ribosa s připojeným cytosinem na uhlíku C1 a fosfátem na uhlíku C5).

Existují lineární nebo kružnicové molekuly nukleových kyselin. Ty mohou být jednořetězcové (zkratka ss, z anglického *single stranded*, např. ssRNA či ssDNA) nebo dvouřetězcové (ds, *double stranded*, např. dsRNA či dsDNA). U dvouřetězcových molekul mají polynukleotidové řetězce vůči sobě opačný směr (jsou antiparalelní, jeden ve směru 3'→5', druhý 5'→3') a jsou k sobě vázány vodíkovými můstky mezi bázemi (třemi můstky mezi G≡C, dvěma můstky mezi A=T a A=U). Řetězce jsou stočené do dvoušroubovice (obrázek 17). Existují také tři až čtyřřetězcové molekuly DNA.

Přechod dvoušroubovicové struktury v samostatné polynukleotidové řetězce prostřednictvím přerušeni vodíkových můstků mezi bázemi se nazývá denaturace. Obnovení původní dvoušroubovice je renaturace. Proces, při kterém dojde ke komplementárnímu spojení dvou řetězců pocházejících z různých molekul dsDNA, je hybridizace.



Obrázek 17: DNA a její stavební podjednotky. (Alberts *et al.*, 2005 – upraveno)

6.2. Přenos genetické informace

K přenosu genetické informace může docházet buď z nukleové kyseliny do nukleové kyseliny (replikace, transkripce, zpětná transkripce) nebo z nukleové kyseliny do proteinu (translace). Z proteinu do nukleové kyseliny či z proteinu do proteinu přenos možný není.

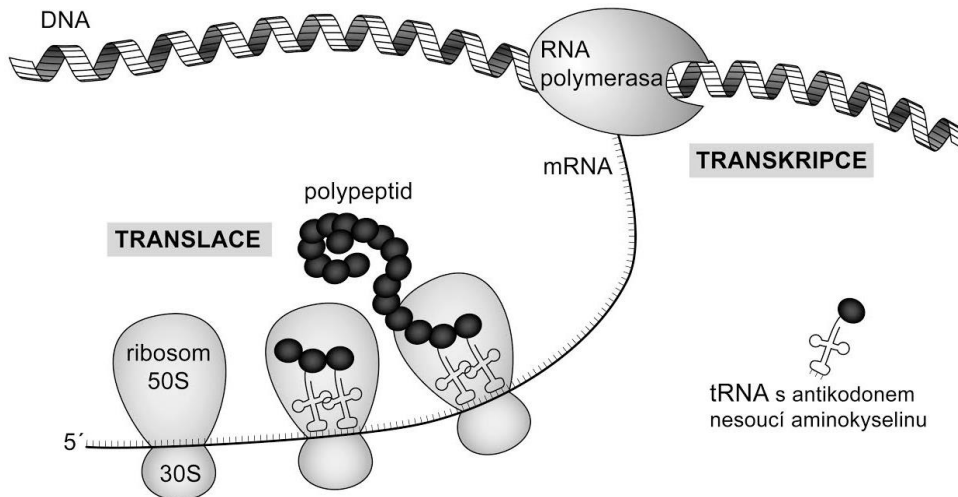
Replikace je tvorba kopií molekul nukleových kyselin zajišťující přenos genetické informace z DNA do DNA nebo z RNA do RNA. Replikace chromosomu bakterií je blíže popsána v kapitole 7.1.1. Proces, při kterém dochází k přepisování genetické informace z RNA do DNA, se nazývá zpětná transkripce a vzniká cDNA (komplementární DNA).

6.2.1. Transkripce

Transkripce je **přepisování** genetické informace z DNA do RNA. Tento přepis katalyzuje enzym transkriptasa (DNA-dependentní RNA-polymerasa, RNA polymerasa). Tento enzym rozpoznává regulační oblast genu, tzv. **promotor** (začátek genu), na který nasedne. Následuje **startovací nukleotid**, od kterého je přepis jednoho nebo více genů zahájen. Jako matrice slouží pro přepis pouze jeden řetězec DNA. Transkripce probíhá až po další regulační oblast, sekvenci zvanou **terminátor**, kde je činnost RNA polymerasy zastavena, přepis je ukončen a hotová mRNA (mediátorová RNA) se uvolňuje. Transkripce probíhá ve **třech fázích**: **iniciace** (navázání transkriptasy na DNA a zahájení syntézy řetězce RNA), **elongace** (polymerizace RNA podle matricové DNA) a **terminace** (ukončující procesy, které mají za následek uvolnění RNA polymerasy z templátové DNA i mRNA). **Transkript** (sekvence vzniklá při transkripci) je komplementární k matricové sekvenci nukleové kyseliny. Zejména u eukaryot mnohdy podléhá postranskripčním úpravám (např. chemické modifikaci a štěpení).

6.2.2. Translace

Jakmile vznikne funkční mRNA, informace v ní obsažená může být ihned použita pro syntézu proteinu. **Překládání** genetické informace z RNA do primární struktury proteinu se označuje jako translace. Z aminokyselin obsažených v cytoplasmě se na ribosomech za účasti tRNA tvoří polypeptidové řetězce podle informace obsažené v mRNA. Stejně jako replikace a transkripce, také translace je rozdělena do **tří částí**: *iniciace* (sestavení iniciačního komplexu: ribosom + mRNA + iniciační tRNA), *elongace* (ribosom se pohybuje po mRNA a dochází k prodlužování polypeptidového řetězce polykondenzací aminokyselin podle informace v mRNA) a *terminace* (zakončení syntézy polypeptidu a jeho uvolnění od ribosomu). Celý proces řídí iniciační, elongační a terminační faktory (proteiny).



Obrázek 18: Schématické znázornění exprese genů bakterií (transkripce a translace).

Protože bakterie nemají jadernou membránu, mohou se ribosomy připojovat ještě k nehotové mRNA. Jakmile se 5' konec mRNA uvolní z DNA, pokryje se ribosomem a začne translace do polypeptidového řetězce (obrázek 18). Na jedné molekule mRNA může být navázáno za sebou i několik ribosomů (tzv. polyribosom, polysom) a současně se tak syntetizuje velké množství stejných proteinů. Genetická informace se z primární struktury mRNA do primární struktury proteinu překládá podle systému pravidel, tzv. **genetického kódu**.

*Genetický kód je univerzální pro všechny žijící organismy. Každá aminokyselina v polypeptidovém řetězci je kódována (určena) trojicí nukleotidů zvanou **triplet**. Základní jednotkou genetického kódu je tripletový **kodon**. Je to pořadí tří nukleotidů v mRNA kódující v polypeptidu určitou aminokyselinu nebo signalizují začátek (iniciační kodon) či konec (terminační kodon) jeho syntézy na ribosomu. Jedna aminokyselina může být kódována několika různými kodony (např. kodony histidinu jsou CAU a CAC, alaninu GCU, GCC, GCA nebo GCG). Aminokyseliny jsou připojeny na molekule tRNA. Při čtení genetického kódu rozeznává transferová RNA specifickým tripletem, tzv. **antikodonem**, kodon na mediátorové RNA pro aminokyselinu, která je na této tRNA nesená. Díky komplementaritě se antikodon přechodně váže na kodon a z aminokyselin vzniká polypeptid.*

6.3. Geny

Jednotkou genetické informace je **gen**. Obsahuje genetickou informaci o primární struktuře polypeptidu či proteinu nebo tRNA, rRNA, atd., zapsanou v sekvenci nukleotidů. Existují geny strukturní, funkční a regulační oblasti.

Strukturní gen kóduje informaci o primární struktuře polypeptidu (popř. proteinu), který vzniká na ribosomu translací mRNA-sekvence. U složeného strukturního genu jsou přítomné kromě **exonů** také **introny**. Introny (nekódující oblasti genů) se při posttranskripční úpravě vyštěpí a v mRNA zůstanou pouze přeepsané geny exonů. Introny mají ve své DNA pouze archaea a mikroorganismy s eukaryotickou buňkou (kvasinky, plísňe, parazité). Bakterie a sinice jsou bez intronů, genetická informace je kódována bez přerušení. **Funkční gen** kóduje tRNA

a rRNA (popř. další RNA). Tento úsek DNA je transkripce přepsán přímo do tRNA či rRNA, nikoliv do mRNA a nepodléhá translaci. Geny, které jsou rozeznávány proteiny signalizujícími zahájení nebo ukončení transkripce se nazývají **regulační oblasti**.

Soubor všech genů buňky (popř. viru) se označuje jako **genom**. Kromě genů uložených v jádře, mohou být součástí genomu i geny nesené na plasmidech. U eukaryotických mikroorganismů jsou součástí genomu také geny na mitochondriové DNA (mtDNA), případně chloroplastové DNA (ctDNA). V dnešní době je genom celé řady mikroorganismů zmapován (je známá nukleotidová sekvence a umístění genů na chromosomu).

Alela je varianta genu lišící se částečně od jiných variant téhož genu v nukleotidové sekvenci. To znamená, že geny kódující určitý polypeptid nebo RNA nemusí mít nutně ve všech případech stejnou nukleotidovou sekvenci, ačkoliv je v nich obsažena informace o stejném funkčním produktu. Bakteriální genom je **haploidní**, neboť bakterie mají pouze po jedné alele každého genu. Oproti tomu mikroorganismy s eukaryotickým typem buňky mají dvě sady genů, označují se jako **diploidní**.

Pojmy genotyp a fenotyp se užívají v souvislosti s určitým organismem. Genetická sestava alel určitého organismu se označuje jako jeho **genotyp**. Soubor znaků a vlastností, kterými se v daném prostředí genotyp organismu projevuje, se označuje jako **fenotyp**.

Struktura nesoucí geny seřazené za sebou, schopná replikace, je **genofor**. U prokaryot, eukaryot a DNA virů jsou genofory tvořeny pouze DNA, u RNA virů jsou tvořeny molekulou RNA. Genofory obsažené v jádře buňky jsou označovány jako **chromosomy**. Bakteriální buňka má pouze jeden chromosom.

Bakterie a některé kvasinky mohou také obsahovat **plasmidy**, nesoucí pro mikroorganismus mnoho výhodných genů (např. kódujících rezistenci k antimikrobiálním látkám, geny zodpovědné za tvorbu sex pilů či tvorbu bakteriocinů).

Někdy bývá součástí bakteriálního genomu také **profág**. Je to do chromosomu začleněná nukleová kyselina temperovaného bakteriofága. Temperované (klidové) fágy (tj. viry, jejichž hostitelskými buňkami jsou bakterie) se po začlenění do chromosomu dělí společně s hostitelskou buňkou a následkem vnějšího podnětu (např. teploty) se životní cyklus fága dokončí: začnou se syntetizovat bílkoviny obalu viru, virová DNA se z chromosomu vyčlení, dokončí se tvorba nových virionů a hostitelská buňka lyzuje.

Na virovém genoforu nejsou geny pro rRNA, tRNA, ani strukturální geny kódující ribosomové proteiny. Proto jsou tyto nebuněčné živé soustavy při tvorbě nových virových proteinů zcela závislé na své hostitelské buňce a jejím translačním systému (tRNA, ribosomech, aminoacyl-tRNA-syntetasy). V tom je molekulární podstata toho, že jsou viry intracelulární parazité.

Oblasti chromosomu patogenních bakterií, které obsahují geny kódující faktory virulence, se označují jako **ostrovy patogenity**. Všechny se mohou exprimovat současně, jediným podnětem (např. teplotou, pH, a_w) a všechny se mohou přenášet najednou na další bakterii.

6.3.1. Exprese genů

Exprese genu je proces dekodování genetické informace v něm obsažené. Expresí se rozumí u **strukturálního genu** vyjádření jeho genetické informace v primární struktuře a funkci polypeptidu (proteinu), u **funkčního genu pro RNA** vyjádření jeho genetické informace v primární struktuře a funkci RNA určené k translaci, u **genu regulační oblasti** vyjádření jeho genetické informace ve schopnosti interagovat s určitými proteiny.

Prostředí může ovlivnit míru exprese (v průběhu transkripce i translace), avšak genetická informace v genech se nemění. Exprese může být vlivem prostředí urychlena, zpomalena, nebo přímo zastavena. Proto některé geny **nemusí být exprimovány** (projeveny navenek). Například pokud kmen *S. aureus* nese geny kódující stafylokokové enterotoxiny, neznamená to, že bude tento kmen toxiny v potravině opravdu vždy produkovat (záleží na pH, a_w , atd.). Bakterie velmi citlivě reagují na změny prostředí a dokáží zapínat či vypínat celou řadu genů souvisejících s metabolismem či virulencí. Mnohé enzymy a faktory virulence se tvoří jen tehdy, pokud jsou pro ně nezbytné (např. po vniknutí bakterie do hostitelského organismu).

6.3.2. Mobilní genetické elementy

Intracelulární přenos genetické informace zajišťují transponovatelné elementy, tzv. **mobilní genetické elementy** (inserční sekvence, transpozony, integrony, genomické ostrovy). Tyto mobilní genetické elementy jsou důležitým zdrojem genetické rozmanitosti. Při *intercelulárním přenosu* to jsou plasmidy a bakteriofágy.

Transpozony jsou úseky DNA, které mají schopnost měnit svou pozici. V genomu se přesunují buď v rámci chromosomu nebo z chromosomu do plasmidu a opačně. Po začlenění transpozonů do genomu mohou vyvolat mutace. Svoji transpozicí mění uspořádání bakteriálního chromosomu a mohou některé geny spouštět i vypínat. Nejjednodušší transpozony jsou **inserční sekvence** (elementy IS). Složené transpozony (značené Tn) přenášejí geny pro rezistenci na antibiotika a geny faktorů virulence.

Integrony jsou genetické elementy, které mají schopnost začlenit do své struktury exogenní **genové kazety**, zajistit jejich správnou expresi a proměnit je ve funkční geny. Integrony samy o sobě nejsou mobilní, nachází se však často na transpozonech a plasmidech a přispívají ke vzniku multirezistentních kmenů.

6.4. Mutace DNA

Aby se mohly organismy lépe přizpůsobit změnám vnějšího prostředí a nedošlo při nich k jejich zániku, není genetická informace zcela neměnná. K jejím změnám může docházet mutací, rekombinací a transpozicí.

Mutace je dědičná změna genotypu. Mutace v jediném nukleotidovém páru může být příčinou zániku celého organismu, nebo mu naopak může poskytnout takovou výhodu, že bude moci přežít v prostředí, ve kterém ostatní organismy bez mutace nepřežijí.

Mutace mohou vznikat spontánně nebo jsou něčím indukovány. Ke **spontánním mutacím** dochází příležitostně v každé buňce, jsou to např. chyby při replikaci DNA. **Indukované mutace** vznikají vnějším zásahem. Mohou je vyvolat fyzikální nebo chemické faktory, tzv. **mutageny**. Ty působí genotoxicky. Mezi fyzikální mutageny patří např. ultrazvuk, UV či ionizující záření. Chemické mutageny často způsobují chybné párování bází (analogy dusíkatých bází, alkylační činidla), nebo se vkládají do DNA a tím brání normální čtení genetické informace (interkalační látky – ethidiumbromid, akridinová barviva, psoraleny).

Mutované buňky se mohou projevit např. výrazně protáhlým tvarem buňky, změnou mukózních kolonií na hladké až drsné, změnou pigmentu kolonií, změnou citlivosti k bakteriofágovým infekcím, změnou schopnosti konjugace, sporulace, změnou metabolické dráhy (ztrátou schopnosti syntetizovat některé růstové faktory – auxotrofní mutanti), atd. Prostřednictvím mutací mohou bakterie získat rezistenci k antimikrobiálním látkám.

*Mutantní organismy mají schopnost některé mutace vrátit zpátky na původní divoký typ pomocí další mutace. Při **reverzní (zpětné) mutaci** dochází k mutaci mutantní alely a tím se úplně nebo částečně změní v původní standardní (divokou) alelu.*

Mikroorganismy, stejně jako další organismy, mají schopnost vzniklé mutace v genotypu opravovat pomocí **reparačních systémů**. Tyto systémy napomáhají spravit také chyby při replikaci DNA. Reparace mohou probíhat prostřednictvím fotoreaktivních enzymů, které jsou aktivovány viditelným světlem (fotoreaktivace), nebo v rámci postreplikačních oprav.

6.5. Rekombinace

Na změnách genetické informace se kromě mutací podílí také **rekombinace** – nové kombinace nukleotidových sekvencí způsobené tzv. crossing-overem.

Crossing-over je proces, při kterém dochází k výměně nukleotidových sekvencí mezi dvěma homologickými molekulami DNA. Dojde ke zlomu DNA, výměně části nukleotidové sekvence a znovuspojení DNA. Organismus se takto změněným genomem se nazývá **rekombinant**. Pokud dojde k přemístění genů stávajících, označuje se rekombinace jako **homologní**. Pokud jsou do genomu vneseny geny nové, jedná se o **heterologní** rekombinaci.

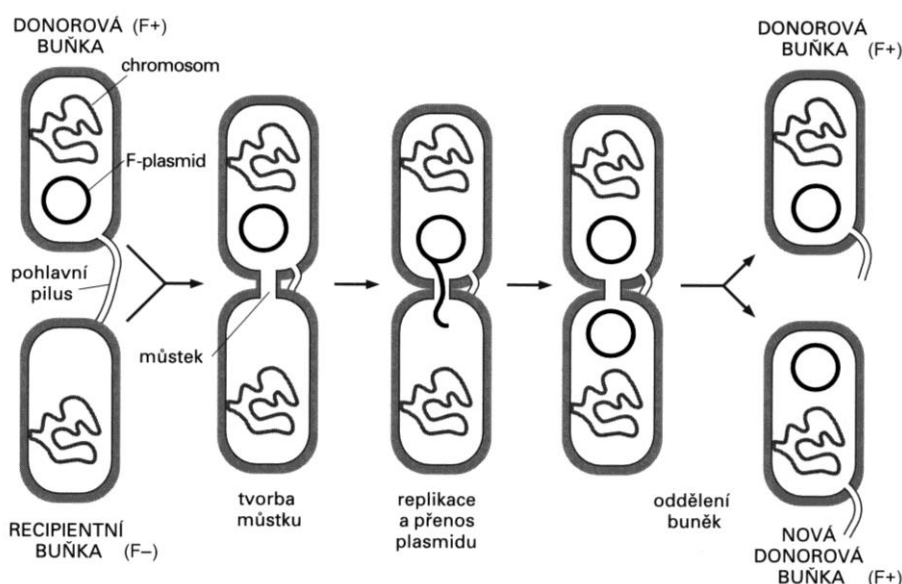
Rekombinace probíhá u všech organismů – při konjugaci, transformaci, transdukci, mezi virovými genomy v hostitelské buňce, u eukaryot během mitosy a meiosy.

6.6. Výměna genetické informace mezi bakteriemi

Přenos genů zvyšuje genetickou variabilitu, a tak i adaptabilitu bakterií. K přenosu genetické informace může docházet jednak uvnitř buněk (intracelulárně) nebo mezi buňkami (intercelulárně). Mezibuněčný přenos může být vertikální či horizontální. **Vertikálně** jsou geny předávány z buňky mateřské na dceřinou. Do potomstva se dostávají kopie chromosomu, plasmidů, nebo i profágů. Pokud jsou geny přenášeny mezi nepřibuznými buňkami (v rámci stejného či jiného druhu, případně rodu), označuje se přenos jako **horizontální**. Mezibuněčný přenos zajišťuje konjugace, transformace a transdukce.

6.6.1. Konjugace

Asi nejběžnějším přirozeným vektorem přenosu genetické informace jsou plasmidy. Proces, při kterém dochází k přenosu genů z *donorové* (dárcovské) buňky do buňky *recipientní* (buňka přijímající cizorodé geny) prostřednictvím plasmidů se nazývá **konjugace**. Tento jev byl pozorován již v roce 1946 Lederbergem a Tatumem u *E. coli*. Recipientní buňka, která přijala DNA, se nazývá **transkonjugant**.



Obrázek 19: Schématické znázornění bakteriální konjugace. Donorová buňka s F plasmidem se s recipientní buňkou spojí pomocí sex pilusu a jeden řetězec DNA plasmidu přejde přes cytoplasmatický můstek k recipientovi. Poté je můstek přerušen. V buňkách dojde k dosyntetizování druhého řetězce plasmidu a obě bakterie se stanou donorovými. (Alberts *et al.*, 2005 – upraveno)

Existuje několik typů transkonjugantů: **plasmidový** transkonjugant (přenáší se konjugativní plasmid, který se v buňce replikuje autonomně), **rekombinantní** transkonjugant (přenesený fragment DNA rekombinuje s chromosomem), **abortivní** transkonjugant (přenesená DNA se nereplikuje, získaný gen se časem vytratí).

Speciálním případem konjugace je tzv. **zygotická indukce**, při které je do recipientní buňky také vnesen profág lyzogenizujícího (aktivního) bakteriofága, který byl začleněn do chromosomu donorové buňky. Profág se v novém hostiteli indukuje, dojde k pomnožení složek fága a jeho maturaci. Proces končí lýzou buňky recipienta.

Aby mohla být konjugace uskutečněna, musí být konjugující buňky opačného typu, který je dán specifickým **fertilním faktorem** (F), což je konjugativní plasmid (**F plasmid**). Tento plasmid nese geny zodpovědné za proces konjugace a také geny determinující specifické

struktury povrchu (např. pili), které jsou pro konjugaci nepostradatelné. Vzájemný kontakt dvou interagujících buněk umožňují právě pili a za vlastní přenos DNA jsou zodpovědné **F pili (sexuální pili)**. DNA prochází **konjugačním můstkem**. Donorová buňka s fertilmním faktorem je označována **F⁺**, buňka recipientní bez F faktoru se označuje **F⁻**. Konjugace může proběhnout pouze mezi buňkami F⁺ a F⁻ (obrázek 19).

Před přenosem F plasmidu musí dojít k naštěpení jednoho jeho řetězce restriční endonukleasou. Naštěpený řetězec F plasmidu přechází svým 5'-koncec prostřednictvím konjugačního můstku z donorové do recipientní buňky, druhý řetězec zůstává v donorové buňce. V donorové i recipientní buňce dojde k dosyntetizování druhého řetězce F plasmidu (obrázek 20).

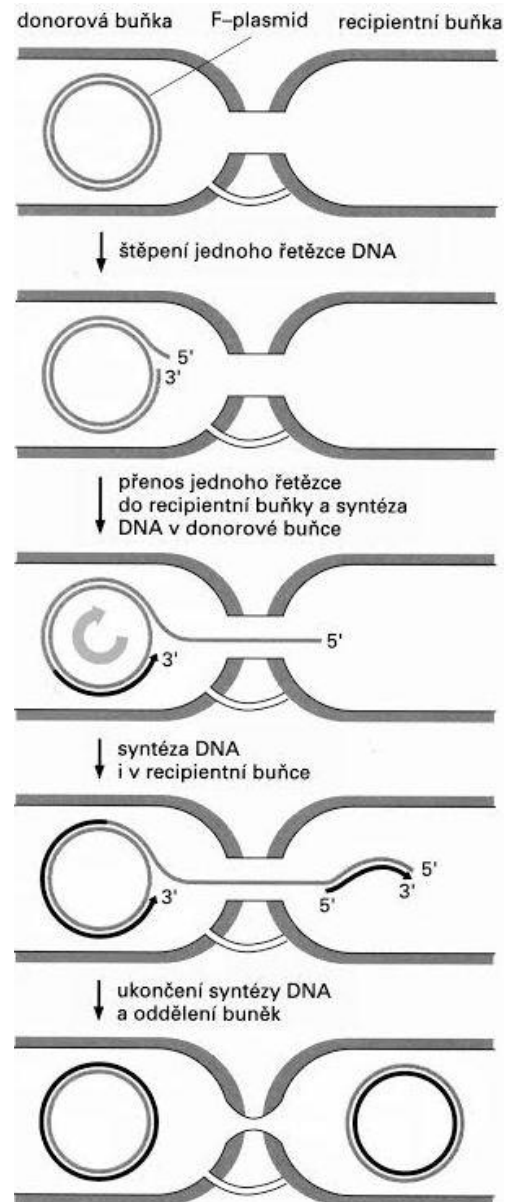
Jako každý plasmid se i F plasmid může vyskytovat v buňce ve stavu volném nebo integrovaném do bakteriálního chromosomu. Buňky, u kterých proběhl *cossing-over* k začlenění plasmidu, se označují jako **buňky Hfr** (high frequency of recombination). Pokud dojde ke konjugaci integrovaného F plasmidu z Hfr buňky do recipientní, přenáší plasmid sebou i část chromosomální DNA. Přenesená část chromosomální DNA může rekombinovat s homologní DNA recipientní buňky a vzniká rekombinantní transkonjugant.

Konjugace může probíhat u gramnegativních i grampozitivních bakterií. U grampozitivních bakterií (např. streptokoky) se konjugace neúčastní pili, ale kontakt je zprostředkován „sex feromonem“, který je tvořen recipientní buňkou. Chemotaxí se buňky dárce a příjemce přiblíží, přilnou k sobě a DNA donora přejde do buňky recipienta.

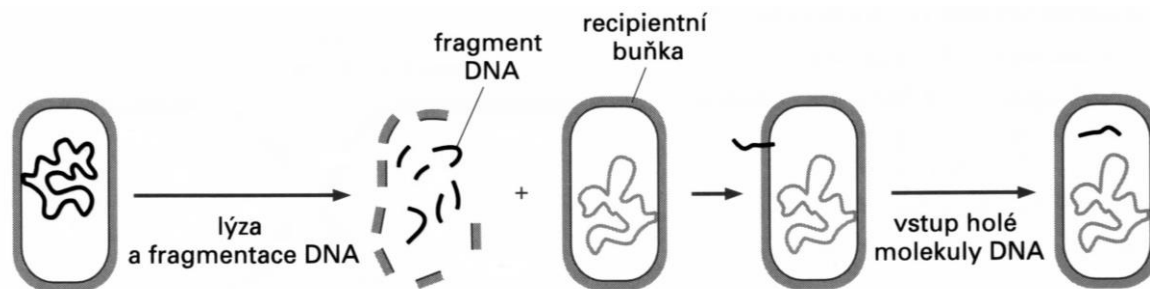
Při konjugaci může docházet k významnému přenosu genů virulence (např. geny kódující tvorbu toxinů) a R plasmidů nesoucích geny rezistence. Konjugace má velký význam v genovém inženýrství.

6.6.2. Transformace

Proces, kdy dojde k přenosu genetické informace přímo molekulou DNA, která vnikla do buňky z vnějšího prostředí bez mezibuněčného kontaktu, se označuje jako **transformace** (obrázek 21). Transformující DNA pochází z rozložených bakterií. V extracelulárním prostředí není tato DNA chráněna proteiny, proto velmi rychle podléhá nukleasám a dochází k její fragmentaci. Aby mohla recipientní buňka přijmout cizorodou DNA, musí být ve *stavu kompetence*. Tento stav závisí na růstové fázi a fyziologickém stavu buňky (přizpůsobení buněčné stěny a cytoplasmatické membrány propustit fragmenty DNA donorové buňky). Tuto vlastnost má asi každá tisící buňka. Transformovaný příjemce se nazývá **transformant**.



Obrázek 20: Přenos a syntéza DNA F plasmidu. Jedno vlákno plasmidové DNA je naštěpeno a 5'-koncec přechází do recipienta, kde proběhne (stejně jako u donora) dosyntetizování druhého řetězce. (Alberts *et al.*, 2005 – upraveno)



Obrázek 21: Bakteriální transformace, při které recipientní buňka přijme fragment DNA ze svého okolí. (Alberts *et al.*, 2005 – upraveno)

Transformant může být buď **rekombinantní** (do buňky byl přenesen fragment chromosomální DNA) nebo **plasmidový** (přenesen byl neporušený plasmid, schopný samostatné replikace). Rekombinantní transformanti vznikají přenosem DNA kmenů stejného nebo velmi příbuzného druhu, aby mohlo dojít ke crossing-overu mezi homologními úseky DNA. Kdežto přenos plasmidové DNA je možné uskutečnit i mezi různými druhy či dokonce různými rody bakterií.

Obdobou zygotické indukce je **transfekce**, kdy je do buňky vnesen purifikovaný genom fága, dojde k infekci, vytvoření nových bakteriofágů a lyzi buňky.

Transformace byla pozorována na příklad u rodů *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Rhizobium* či *Haemophilus*. Význam transformace spočívá v tom, že se do buňky mohou vnést geny kódující virulenci či rezistenci k antibiotikům. Transformací se využívá při produkci nových antimikrobiálních látek, aminokyselin, růstových faktorů, atd.

6.6.3. Transdukce

Transdukce je přenos genetické informace bakterií z buňky donorové do recipientní prostřednictvím bakteriofágů. Bakteriální geny se do bakteriofága dostanou během jeho reprodukce. Po chybném uvolnění profága z bakteriálního chromosomu, je omylem sbalena do kapsidy spolu s nukleovou kyselinou fága také DNA bakterie. Tímto způsobem může být přenesena část chromosomu, případně plasmidu až do velikosti odpovídající délky genomu fága. Buňka, která přijmula DNA nesenou bakteriofágem, se nazývá **transduktant**. Transdukující fág je defektní, neboť jeho genom není tvořen výhradně fágovou DNA a ztrácí schopnost lyzovat buňku hostitele.

Transduktant může být **rekombinantní**, kdy přenesený fragment chromosomální DNA rekombinuje s homologním úsekem DNA recipientní buňky, nebo **abortivní**, kdy po přenosu chromosomální DNA nedochází k rekombinaci a tak se tento fragment nemůže replikovat, po dělení buněk zůstane pouze v jedné buňce dceřině a časem se vytratí. Třetím typem je transduktant **plasmidový** vzniklý po přenesení plasmidu do recipientní buňky.

Transdukce je pozorována např. u bakterií rodu *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Mycobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* a další.

Zejména u grampozitivních bakterií jsou přenášeny transdukci R plasmidy nesoucí rezistenci k antibiotikům. Např. mnohočetnou rezistenci *Staphylococcus aureus* kódují plasmidy, které jsou rozšiřovány prostřednictvím temperovaných bakteriofágů (ve formě profága).

6.7. Genové inženýrství

Poznatků z oblasti genetiky bakterií se dnes využívá zejména v genovém inženýrství. Základem genového inženýrství je příprava rekombinantních molekul DNA a klonování genů. Tento obor vytváří umělé kombinace genů, pozměněné či zcela nové geny, které pak zavádí do genomu organismů s cílem změnit či doplnit jejich genetickou výbavu. Pro vnesení genů

do dalšího organismu a jejich pomnožení v novém prostředí se používají tzv. **vektory**, např. plasmidy, bakteriofágy nebo v laboratoři uměle připravené replikony. Gen upravený metodami genového inženýrství a přenesený do nového hostitelského organismu se nazývá **transgen**. Organismus, jehož genom obsahuje stabilně začleněný transgen se označuje jako **transgenní** nebo také **geneticky modifikovaný organismus (GMO)**. Pro získání jedinců s novými vlastnostmi se mohou použít klasické genetické postupy (např. křížení či indukce mutacemi). Techniky genového inženýrství umožňují přenášet geny do taxonomicky vzdálených organismů a překonávat tak přirozené mezidruhové reprodukční bariéry. Tyto nové vlastnosti by se u daného organismu ani v průběhu evoluce ve volné přírodě pravděpodobně nikdy nevytvořily.

Mezi významné transgenní organismy patří také bakterie a kvasinky. Ty se často využívají při výrobě potravin, nápojů a jako producenti průmyslově důležitých sloučenin (enzymů, antibiotik, organických kyselin, aminokyselin, vitaminů, atd.). Dále se využívá některých transgenních bakterií při čištění odpadních vod a odstraňování škodlivých látek ze životního prostředí, ropných produktů z půdy či odstraňování vedlejších produktů chemické výroby. Významným produktem, který se už od roku 1982 komerčně připravuje prostřednictvím transgenní *E. coli*, je lidský inzulin. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* se využívá k výrobě rekombinantní očkovací látky proti viru hepatitidy B. Také byly vyvinuty transgenní organismy schopné produkovat určité lidské bílkoviny v mléce.

7. RŮST A MNOŽENÍ BAKTERIÍ

V příznivých podmínkách vnějšího prostředí (dostatek vody, živin, vhodná teplota, pH, osmotický tlak, atd.) bakteriální buňky intenzivně rostou. Po dosažení určité velikosti dojde k jejich rozdělení na dvě buňky, které po určité době začnou růst a celý cyklus se opakuje. Rychlost růstu bakterií tedy závisí na jejich druhu a genetické výbavě, chemickém složení živného média, fyzikálních faktorech vnějšího prostředí a koncentraci nepostradatelné živiny.

Jako **generační dobu** označujeme časový usek od vzniku *konkrétní buňky* do jejího rozdělení na dvě buňky dceřiné. Dalším pojmem je **doba zdvojení (T)**, která udává dobu potřebnou k tomu, aby se *v rostoucí populaci* počet buněk zdvojnásobil. Doba zdvojení se může aplikovat i na jiný parametr např. hmotnost biomasy.

Nejkratší dobu zdvojení mají termofilní bakterie (řádově v minutách). Z běžných bakterií patří mezi rychle rostoucí např. Escherichia coli, jejíž doba zdvojení je za optimálních podmínek asi 20 minut. Oproti tomu bakterie rodu Mycobacterium rostou výrazně pomaleji, doba zdvojení je několik hodin až dnů.

Růst a množení bakterií probíhá *geometrickou řadou* s kvocientem 2, kdy z jedné buňky vzniknou dvě, ze dvou čtyři, atd. Dceřiné buňky vzniklé z jedné mateřské jsou sice shodné, ale ne absolutně. V bakteriální kultuře s vyváženým exponenciálním růstem jsou v daném okamžiku přítomny buňky všech velikostí – nejmenší právě vzniklé, větší v různých fázích růstu i největší nacházející se těsně před rozdělením.

Při hodnocení růstu a množení musíme odlišovat růst individuální buňky a růst dané populace bakterií. Růst může být vyvážený (hmotnost buňky, obsah DNA, obsah peptidoglykanu, atd. roste stejnou měrou) či nevyvážený. Rostoucí kultura může být ve stavu ustáleném (vlastnosti populace jsou na čase nezávislé a neměnné) či neustáleném. Dále se může jednat o růst nelimitovaný (všechny živiny v nadbytku) či limitovaný (některá živina je v nízké koncentraci), v tekutém médiu (suspense) či na pevných půdách (kolonie), v čisté či smíšené kultuře, v přirozeném prostředí či in vitro v laboratoři, v chemicky definovaném či nedefinovaném živném médiu, v uzavřeném (zkumavka) či otevřeném systému, atd.

7.1. Životní cyklus bakteriální buňky

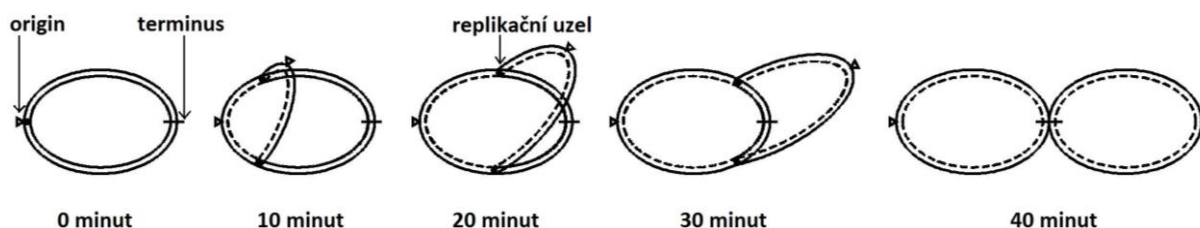
Životní cyklus bakteriální buňky začíná okamžikem jejího vzniku po rozdělení mateřské buňky a končí jejím rozdělením na dvě buňky dceřiné. Mezi klíčové děje patří:

- replikace DNA – autoreprodukce genetického materiálu;
- jaderné dělení – prostorové oddělení obou molekul DNA;
- buněčné dělení – rozdělení mateřské buňky na dvě buňky dceřiné.

7.1.1. Replikace DNA

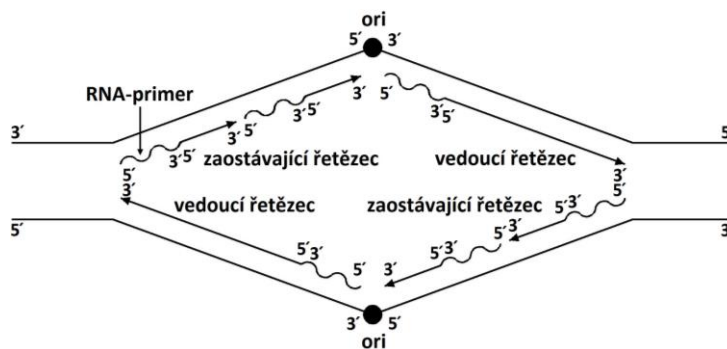
Replikace bakteriálního jádra (chromosomu) je podstatně jednodušší než je tomu u eukaryot a probíhá ve třech fázích – **iniciace** (zahájení) replikace, **elongace** (vlastní replikace) a **terminace** (ukončení) replikace. Rychlost replikace, tj. rychlost pohybu replikačního aparátu po molekule DNA, je konstantní. Je nezávislá na rychlosti růstu. Nová replikace může být zahájena ještě před ukončením replikace předcházející.

Replikace začíná vždy ve stejném specifickém místě bakteriálního chromosomu – tzv. replikační počátek neboli „*origin*“ (místo *ori*), postupuje obousměrně a končí v místě označovaném jako „*terminus*“. Replikační počátek je tvořen specifickou sekvencí nukleotidů rozpoznatelnou iniciačními proteiny. Obecně se předpokládá, že iniciace replikace nastává vždy, když je dosaženo určité kritické velikosti bakteriální buňky. Iniciace nastává pravidelně v intervalech rovných generační době. Výsledkem je vznik dvou kruhových molekul DNA, přičemž každá obsahuje jeden původní a jeden nově syntetizovaný řetězec (obrázek 22).



Obrázek 22: Schéma replikace bakteriálního chromosomu – *E. coli*. (Kaprálek, 2000 – upraveno)

Oba řetězce DNA jsou pevně spojeny vodíkovými můstky mezi komplementárními nukleotidy. K rozrušení vodíkových můstků dochází při replikaci působením iniciačních proteinů. Oddálením obou řetězců DNA se vytvoří tzv. replikační vidlice (obrázek 23). Z nich dochází k rozplétání dvojšroubovice DNA a současně k syntéze nového řetězce. Mezi zúčastněné **enzymy** patří *helikasy* (rozplétají obě vlákna DNA) a *topoisomerasy* (uvolňují vznikající napětí v molekule DNA). Do skupiny topoisomerasy patří i tzv. *gyrasy*, které odstraňují nadbytečné závitky vznikající během replikace. *DNA-polymerasa* syntetizuje DNA pouze jedním směrem, a to od konce 5' ke konci 3'. Toto vlákno je označováno jako vedoucí a je syntetizováno průběžně. Druhé, tzv. zaostávající vlákno, je syntetizováno v podobě krátkých Okazakiho fragmentů, které jsou následně pospojovány enzymem *ligasou*. Případné vzniklé chyby



Obrázek 23: Syntéza vedoucího a zaostávajícího řetězce při replikaci bakteriálního chromosomu. (Rosypal, 2003 - upraveno)

odstraňuje přímo DNA-polymerasa nebo jiný opravný systém. Replikace končí syntézou terminačních proteinů.

Protože je bakteriální chromosom připoután svým počátkem k cytoplasmatické membráně a buněčné stěně, k **prostorovému oddělení** mateřského a dceřiného chromosomu dochází růstem membrány a stěny mezi místy přichycení rodičovských vláken obou chromosomů.

7.1.2. Rozdělení buňky

Pokud proběhlo jaderné dělení a bakteriální buňka dosáhla kritické velikosti, dochází k buněčnému dělení. Většina bakterií se dělí příčně za vzniku dvou stejně velkých, ale fyziologicky ne zcela identických buněk. Asymetrické dělení pozorujeme např. u sporulujících (rod *Bacillus* či *Clostridium*) či pučících bakterií (dceřiná buňka neboli pupen má zpočátku malé rozměry, postupně dorůstá a zůstává spojena s mateřskou úzkým krčkem); u aktinomycet se příčná přepážka tvoří nepravidelně, buňky se větví či tvoří vlákna.

Rozdělení buňky je umožněno tvorbou **příčného septa**, které se tvoří od obvodu buňky (obvykle v ekvatoriální rovině) a roste směrem do jejího středu. Septum fyzicky rozpůlí mateřskou buňku na dvě buňky dceřiné. Dceřiné buňky se mohou zcela oddělit nebo zůstávají spojeny extracelulární hmotou či společnou pochvou do různých útvarů (dvojice, řetízky, shluky, atd.). U grampozitivních mikroorganismů při tvorbě přepážky nedochází k zaškrcení (konstrikci) buněk, u gramnegativních obvykle ano.

Oblasti vzniku nové buněčné stěny se označují jako *stěnové pásy*. V jejich místě dochází k hromadění prekurzorů buněčné stěny. Tvorba septa začíná invaginací (vchlípením) cytoplasmatické membrány. Její růst je následován rozrůstáním vrstvy peptidoglykanu do prostoru mezi membrány. Nově syntetizovaná buněčná stěna se současně vysunuje na obě strany (buňka se protahuje) a vrůstá dovnitř buňky. Současně se syntézou peptidoglykanu působí i lytické enzymy (autolysiny) umožňující štěpení původní buněčné stěny a vytvoření prostoru pro začlenění nových molekul. Aktivita syntetizujících i lytických enzymů je v rovnováze.

7.2. Růstová křivka bakteriální populace

Při **jednorázové (statické) kultivaci** čisté kultury bakterií v tekutém živném médiu obsahujícím nadbytek potřebných živin, dochází postupně k nárůstu bakteriální biomasy. Grafické vyjádření koncentrace biomasy (nebo počtu bakteriálních buněk) v závislosti na čase se označuje jako **růstová křivka** bakteriální populace. Růstová křivka má **4 základní fáze** (lag-fázi, exponenciální fázi, stacionární fázi a fázi odumírání), které doplňují *fáze přechodové*, umožňující plynulý a postupný přechod z jedné hlavní fáze do druhé (obrázek 24).

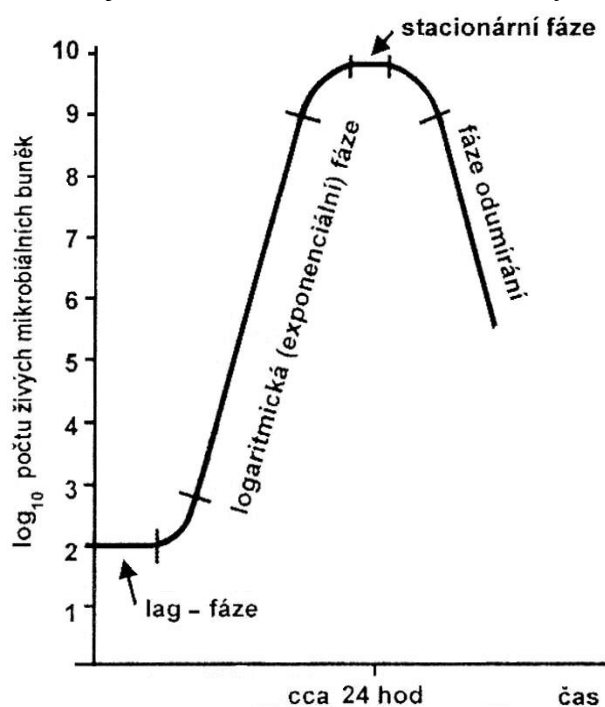
7.2.1. Standardní průběh růstové křivky

Lag-fáze (angl. lag – zpoždění, průtah) je charakterizována adaptací bakterií na prostředí živného média, počet bakterií zůstává konstantní. V této fázi se klidové nerostoucí buňky postupně mění na buňky aktivně rostoucí, případné spory klíčí a přeměňují se na vegetativní buňky. Postupné zvyšování intenzity metabolismu vede k hromadění potřebného množství intermediárních metabolitů a současně dostatečného množství CO₂. V této fázi nedochází k dělení buněk. Délka lag-fáze závisí na druhu bakterií, fyziologickém stavu buněk, velikosti inokula (nepřímá úměra) a složení růstového média.

Lag-fáze přechází do krátkého období, kdy se buňky začínají dělit, ale ne stálou rychlostí (tzv. *fáze zrychleného růstu*). Následuje **fáze exponenciální (logaritmická)**, pro kterou je charakteristický intenzivní a pravidelný růst, dělení buněk probíhá konstantní rychlostí.

Koncentrace bakterií je exponenciální funkcí času. Bakteriální populace se množí dvojnásobnou geometrickou řadou, doba zdvojení je konstantní.

Po určité době dochází k *fázi zpomalení růstu*, která umožňuje plynulý přechod exponenciální fáze do *fáze stacionární*. Příčinou může být buď vyčerpání limitující živiny (rychlý přechod) nebo nahromadění toxických zplodin metabolismu (pozvolný přechod). Ve stacionární fázi růst a množení bakterií ustává, počet bakterií je po určitou dobu konstantní. Délka stacionární fáze závisí na druhu bakterie a charakteru prostředí.



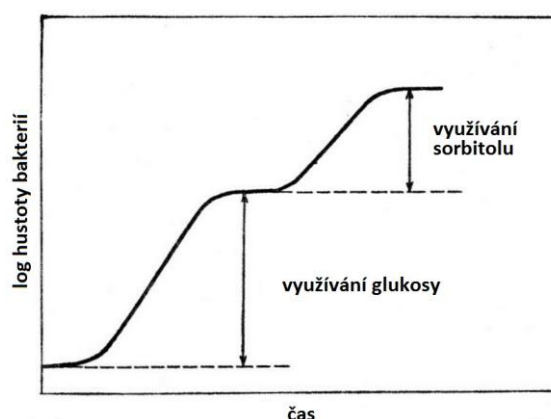
Obrázek 24: Růstová křivka bakteriální populace při jednorázové (statické) kultivaci. (Votava, 2001)

Stacionární fáze přechází ve *fázi odumírání*, kdy hladovějící živé bakterie nerostou, postupně hynou a jejich koncentrace v závislosti na čase klesá. Přechodná fáze se v tomto případě označuje jako *fáze poklesu*. Příčinou hynutí buněk je působení fyzikálních a chemických faktorů (např. záření, zplodiny metabolismu, vysoké pH) na makromolekuly, jejichž poškození již bakteriální buňka není schopna kompenzovat opravnými procesy. U některých bakterií dochází k autolýze účinkem lytických enzymů destrujících buněčnou stěnu (narušení rovnováhy mezi lytickým působením a syntézou buněčné stěny).

7.2.2. Diauxie

Zvláštním typem růstové křivky je tzv. *diauxie* (dvojitá růstová křivka neboli „dvojrůst“), což je v podstatě křivka složená ze dvou růstových křivek oddělených časovou prodlevou (obrázek 25). Její tvorbu můžeme pozorovat v případě, že živné médium obsahuje dvě různé živiny se stejnou fyziologickou funkcí, např. dva různé cukry.

Může nastat situace, kdy první cukr inhibuje adaptaci buňky na cukr druhý. Jinými slovy, bakteriální buňka díky svému kontrolnímu mechanismu vyloučí utilizaci jednoho cukru jako nadbytečný a ekonomicky nevýhodný proces. Druhý cukr je potom využíván až po vyčerpání toho prvního. Prakticky dochází k tomu, že se bakteriální buňky po skončení logaritmické fáze, dostávají zpět do lag-fáze, během které syntetizují nové enzymy schopné využít druhý substrát. Tento fenomén není omezen pouze na cukry, ale platí i pro jiné živiny.



Obrázek 25: Příklad diauxie u *E. coli*. (Rosypal *et al.*, 1981)

7.3. Kontinuální kultivace bakterií

Nejen v průmyslové mikrobiologii se často využívá **kontinuální kultivace** – systém v němž jsou do rostoucí kultury bakterií nepřetržitě dodávány potřebné živiny a část kultury současně odtéká, v případě potřeby dochází i k provzdušňování živného média. Díky tomu může být bakteriální populace udržována v exponenciální fázi po neomezeně dlouhou dobu. Systém může být koncipován jako otevřený či uzavřený, v obou případech potom jako homogenní či heterogenní. Technické uspořádání může být velmi rozdílné.

Základním typem je tzv. **fermentor** – otevřený homogenní jednostupňový systém představovaný kultivační nádobou s míchadlem a přívodem vzduchu, do které neustále ze zásobníku přitéká čerstvé médium a současně stejné množství kultury odtéká pryč.

V případě turbidostatu je kultivační nádoba vybavena čidlem pro měření koncentrace bakterií. Po překročení zvolené koncentrace dojde k zapnutí ventilu ovládajícího přítok čerstvého média. V chemostatu probíhá kultivace zpočátku jako jednorázová, po vyčerpání limitující živiny je zahájen přítok čerstvého živného média, a to takovou rychlostí, že se kultura sama dostane do ustáleného stavu.

7.4. Planktonický růst a růst v podobě biofilmu

Jako **planktonický růst** označujeme růst bakterií v podobě izolovaných buněk. Druhou formou je růst v podobě **biofilmu**, který se často vyskytuje v přirozených podmínkách (slizké povlaky na povrchu předmětů ve vlhkém prostředí).

7.4.1. Biofilmy

Biofilm je definován jako strukturované mikrobiální společenství, uložené v mezibuněčné hmotě a adhezující k inertním i živým povrchům. Biofilmy představují vyšší a složitější způsob života mikroorganismů, mohou být tvořeny jedním nebo více druhy (např. *Enterococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp.). Oproti planktonickým formám zde pozorujeme výrazně úspěšnější horizontální přenos genů, např. genů rezistence.

Mikrobiální buňky v biofilmu se svými vlastnostmi zásadně liší od buněk planktonických. Jsou **vysoce odolné** k zevním vlivům – vysychání, napadení bakteriofágy, účinku toxických či desinfekčních látek, atd. V makroorganismu jsou buňky v biofilmu chráněny proti účinku makrofágů, protilátek či antibiotik (chronické infekce).

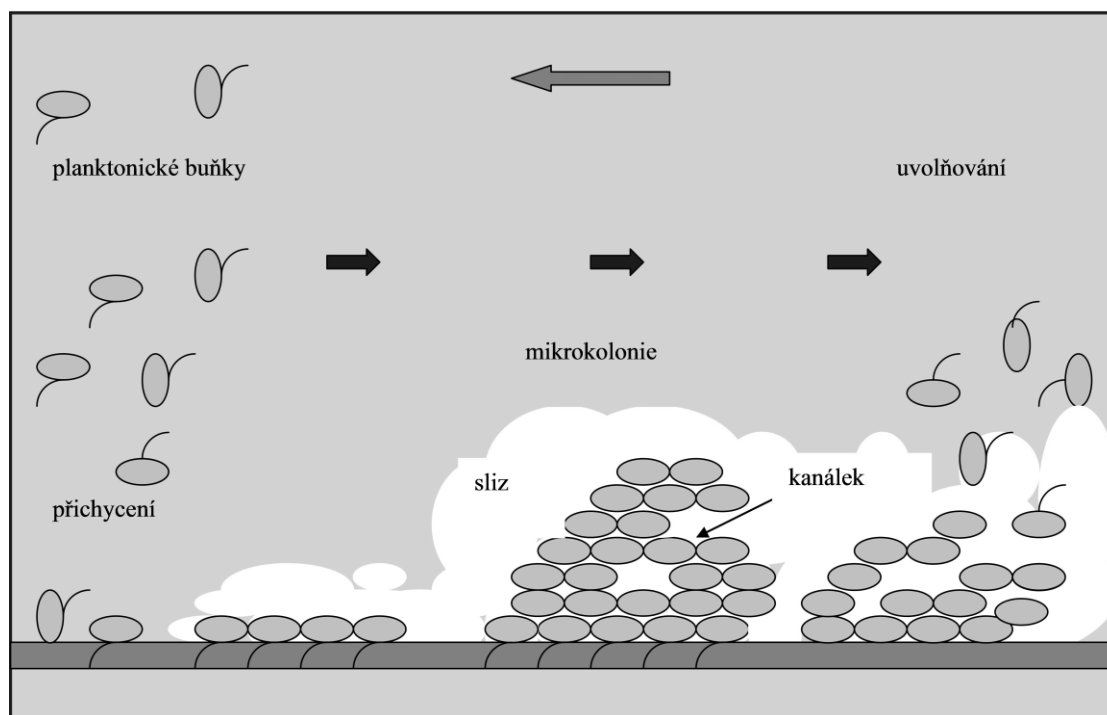
Biofilm má trojrozměrnou stavbu. Základní strukturální jednotkou jsou **mikrokolonie bakterií**, které jsou obklopeny slizovitou **mezibuněčnou matrix** (polysacharidová pouzdra či exopolysacharidy, dále proteiny, nukleové kyseliny, fosfolipidy, atd.). Složitá struktura biofilmu obsahuje volné, poměrně **široké prostory** či **kanálky**, kterými proudí voda přinášející živiny a odvádějící zplodiny metabolismu. Tvar biofilmu je dynamický a závisí například v potrubí na rychlosti toku (houbovitý, vláknitý) a působení tlaku (hladkost, pevnost).

Tvorba biofilmu je poměrně pomalý proces. Začíná adhezí bakterií na vhodný povrch s následnou produkcí tenkých polysacharidových vláken. Postupně se formují mikrokolonie a vytváří se struktura biofilmu (kanálky, póry). Ireverzibilně spojené bakteriální buňky rostou a dělí se, mikrokolonie se zvětšují a spojují se do vrstvy buněk pokrývající povrch. Další nárůst biofilmu se uskutečňuje nánosem nebo zapojením dalších organických nebo anorganických látek z okolní kapalné fáze. Při stárnutí biofilmu dochází k oddělení bakterií z jeho povrchu a jejich rozptýlení, což může vést ke kolonizaci nových míst.

Velký význam mají biofilmy v medicíně, kdy je nacházíme v zubním plaku, na dásních či ve zvukovodu. Nežádoucí je tvorba biofilmů na intravenózních katetrech, umělých srdečních chlopních, kloubních náhradách, atd. V potravinářském průmyslu se biofilmy tvoří na

povrchu výrobních zařízení a v prostorách výrobních hal (potrubí, podlahy, hadice odpadních vod, ohyby hadic, ventily, defekty a nerovnosti vnitřních povrchů), příp. i povrchu potravin.

Biofilmy jsou obecně obtížně odstranitelné, proto je třeba klást důraz na výběr materiálu pro vybavení a zařízení provozů, jejich správnou konstrukci a kvalitu a hladkost zařízení. Nezbytná je správná sanitace povrchů (účinný sanitační program, volba vhodných detergentů a desinfekčních látek a kontrola účinnosti sanitačního procesu) s případným využitím bakteriocinů a bakteriálních enzymů.



Obrázek 26: Schéma tvorby biofilmu. (Schindler, 2001 - upraveno)

8. VÝŽIVA BAKTERIÍ A PŘÍJEM ŽIVIN

8.1. Výživa bakterií

Pro svůj růst a množení, musí mít bakteriální buňka k dispozici všechny nezbytné prvky, a to v různé chemické formě. Živé prostředí musí obsahovat zejména vodu, zdroj energie, zdroj uhlíku pro syntézu buněčné hmoty (cukry, alkoholy, organické kyseliny, CO_2), zdroj dusíku pro tvorbu amino- a iminoskupin aminokyselin a organických bazí (amonné soli, dusitany, močovina, aminokyseliny, peptidy, bílkoviny, vzdušný N_2), zdroje dalších minerálních prvků (síra, fosfor, stopové prvky) a nezbytné růstové látky (např. vitamíny, aminokyseliny, puriny, pyrimidiny).

8.1.1. Dělení bakterií podle způsobu získávání energie

Podle způsobu získávání energie dělíme bakterie do dvou skupin – na bakterie fototrofní a bakterie chemotrofní.

Fototrofie je zjednodušeně přeměna světelné energie v energii chemickou. Světelná energie je zachycena vhodnou molekulou (např. bakteriochlorofyl) a transformována v energii excitovaného elektronu této molekuly. Energeticky bohatý elektron může *redukovat molekulu* NAD(P) na NAD(P)H_2 , který je následně použit k produkci CO_2 .

V tomto případě musí být doplňovány chybějící elektrony např. vodou, H₂S, sírou, H₂ nebo jednoduchými redukovatelnými organickými látkami (např. acetát). Druhou možností je *syntéza ATP z ADP* při návratu excitovaného elektronu na původní energetickou hladinu přes kaskádu elektronových přenašečů (chinony, cytochromy). Tento způsob může být cyklický a nezávislý na prvním způsobu. Energie je v tomto případě uchována v makroergických vazbách v ATP.

Chemotrofie je získání energie oxidací chemických sloučenin, kdy zdrojem elektronů je redukováná látka. Prakticky se jedná o kaskádu dílčích oxidoredukací, při některých z nich dochází k syntéze ATP. Je-li redukováná látka anorganická (např. H₂S, HN₄⁺), označujeme takové bakterie jako **chemolitotrofní (chemoautotrofní)**, jedná-li se o látky organické (např. glukosa), označujeme tyto bakterie jako **chemoorganotrofní (chemoheterotrofní)**.

8.1.2. Dělení bakterií podle zdroje uhlíku

Podle zdroje uhlíku dělíme bakterie do dvou skupin – bakterie **autotrofní** (zdrojem uhlíku je CO₂) a bakterie **heterotrofní** (zdrojem uhlíku jsou organické látky). Některé bakterie mohou získávat uhlík obojím způsobem, označujeme je jako **mixotrofní**.

Na rozdíl od eukaryot není autotrofie u prokaryot vázána pouze na fotosyntézu, ale může se vyskytovat i u chemotrofních bakterií. I v případě autotrofie tedy hovoříme o dvou skupinách bakterií – **fotoautotrofní** (fotolitotrofní) a **fotoheterotrofní** (fotoorganotrofní).

Oba způsoby získávání energie a získávání uhlíku jsou volně kombinovatelné. Souhrnně tedy můžeme **podle způsobu výživy**, tj. způsobu získávání energie a zdroje uhlíku, mikroorganismy rozdělit do následujících 4 kategorií:

- fotoautotrofní** – tato skupina je reprezentována sinicemi (fotoredukce CO₂ vodíkem z vody) a zelenými sírnými bakteriemi (fotoredukce CO₂ jinou látkou než vodou – H₂S, sírou či H₂). Zdrojem energie těchto mikroorganismů je světlo, zdrojem uhlíku CO₂.
- fotoheterotrofní** – do této kategorie spadají purpurové sírné bakterie a purpurové bezsírné bakterie, jejich zdrojem energie je světlo, zdrojem uhlíku organická látka.
- chemoautotrofní** – tento způsob výživy je znám pouze u bakterií. Chemoautotrofní bakterie nevyžadují organické látky, zdrojem uhlíku je CO₂ fixovaný Calvinovým cyklem a zdrojem energie redukovatelné anorganické látky. Do této skupiny patří nitrifikační, sírné či železité bakterie.
- chemoheterotrofní** – tento typ výživy je charakteristický pro většinu bakterií, včetně těch potravinářsky významných. Zdrojem uhlíku a energie jsou různé organické látky, každá chemoheterotrofní bakterie má obvykle schopnost využívat jako zdroj několik látek (*E. coli* například více než dvacet).

8.1.3. Akceptory elektronů u chemotrofních bakterií

Již bylo zmíněno, že chemotrofní bakterie získávají energii prostřednictvím oxidoredukčních dějů, které jsou podmíněny přítomností *donora elektronů*, kterým je zdroj energie v živném médiu (např. glukosa či HN₄⁺), a *akceptora elektronů*.

Akceptor elektronů u chemotrofních může mít trojí podobu, čemuž odpovídají i 3 základní mechanismy oxidoredukce:

- Fermentace (kvašení)** – akceptor elektronů vzniká katabolismem donoru elektronů (zdroje energie) a nemusí být v prostředí přítomen jako samostatná látka. Například při mléčném kvašení, kdy zdrojem energie je cukr, je donorem elektronů glycerinaldehydfosfát

a akceptorem elektronů pyruvát, který je následně redukován na laktát. Tento typ oxidoredukce se vyskytuje pouze u bakterií a kvasinek.

2. Při **aerobní respiraci** je akceptorem elektronů kyslík.
3. Je-li akceptorem elektronů jiná látka než kyslík, mluvíme o **anaerobní respiraci**, která se opět vyskytuje pouze u bakterií. V tomto případě mohou být akceptorem elektronů např. dusičnany postupně redukovány na dusitany nebo až na plynný dusík (nitrátová respirace), dále sírany redukovány na sirovodík (sulfátová respirace) či oxid uhličitý redukován na metan.

Některé bakterie mohou realizovat pouze jeden z uvedených dějů (*Pseudomonas* spp. – aerobní respirace), některé dva, případně všechny tři (např. *Escherichia coli*).

Kyslík hraje v životě bakterií zásadní roli. Některé bakterie nemohou růst bez jeho přítomnosti (aeroby), pro některé je naopak kyslík toxický (striktní anaeroby). Fakultativně anaerobní bakterie mohou růst jak za přítomnosti kyslíku, tak bez něj, v obou případech však realizují zcela jiné enzymatické systémy. Vliv na růst a metabolismus aerobních a fakultativně anaerobních bakterií má zejména nízká rozpustnost kyslíku ve vodě.

8.1.4. Růstové faktory

Jako růstové faktory označujeme molekuly, které bakterie nedovede sama syntetizovat. Obvykle se jedná o organické látky nezbytné pro růst daných bakterií. Z pohledu nutnosti saturace růstových faktorů v živném médiu můžeme bakterie rozdělit do dvou skupin – na bakterie prototrofní a autotrofní.

Prototrofní bakterie (např. *E. coli*) růstové faktory nevyžadují, jsou schopny z běžných živin syntetizovat veškeré potřebné molekuly. Oproti tomu pro **auxotrofní bakterie** je přítomnost růstových faktorů v živném médiu nezbytná (např. některé bakterie mléčného kvašení – *Lactobacillus* spp.). Růstovými faktory jsou nejčastěji aminokyseliny, dusíkaté baze (puriny a pyrimidiny), vitamíny či koenzymy.

8.2. Příjem živin bakteriální buňkou

Díky nepatrné velikosti bakteriální buňky je zde velký poměr povrchu buňky k jejímu objemu, tedy velká plocha pro kontakt buňky s vnějším prostředím a díky tomu i vysoká rychlost výměny molekul mezi buňkou a prostředím a vysoká rychlost metabolismu.

Oboustranný transport látek je realizován skrz semipermeabilní cytoplasmatickou membránu, která tvoří osmotické rozhraní mezi bakteriální buňkou a vnějším prostředím. Transportní mechanismy prokaryot se nijak zásadně neliší od transportu probíhajícího v eukaryotních buňkách. U bakterií rozlišujeme dva základní typy transportu – nespecifický a specifický.

8.2.1. Nespecifický transport

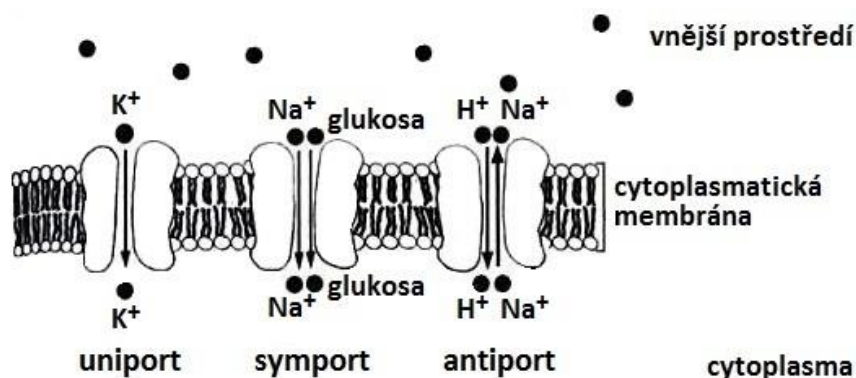
Nespecifickým způsobem je **prostá difuze**, kdy jemnými póry cytoplasmatické membrány volně prostupují molekuly vody a některých nízkomolekulárních látek. Jedná se zejména o hydrofilní molekuly bez elektrického náboje – nedisociované slabé kyseliny a zásady, ethanol, lineární monosacharidy, atd. Volná difuze vody cytoplasmatickou membránou je poměrně rychlá, její intenzita stoupá v prostředí o vyšším osmotickém tlaku, kdy dochází ke ztrátám vnitrobuněčné vody.

V omezené míře mohou lipidovou částí membrány volně procházet i některé molekuly rozpustné v tucích (lipofilní látky či sloučeniny s lipofilní složkou jako jsou povrchově aktivní látky) či látky rozpouštějící lipidy (např. aceton, diethylether). Ve vyšších

koncentracích však mohou povrchově aktivní látky a rozpouštědla tuků způsobit poškození cytoplasmatické membrány a smrt buňky.

8.2.2. Specifický transport

Specifický přenos látek je realizován pomocí různě specifických **bílkovinných přenašečů**, může být pasivní (bez spotřeby energie) nebo aktivní (vyžaduje vynaložení energie). V bakteriální buňce probíhají následující typy specifického transportu látek – pasivní transport, aktivní transport a transport spojený s přeměnou transportované látky. Podle stechiometrie transportního systému rozeznáváme **uniport** (přenos jedné látky), **symport** (přenos dvou látek, obě jsou transportovány stejným směrem) a **antiport** (přenos dvou látek, které jsou transportovány opačným směrem). Řada substrátů může být transportována více než jedním způsobem, např. *E. coli* má nejméně pět transportních systémů pro galaktosu, tři pro glutamát či leucin a dva pro ionty draslíku.

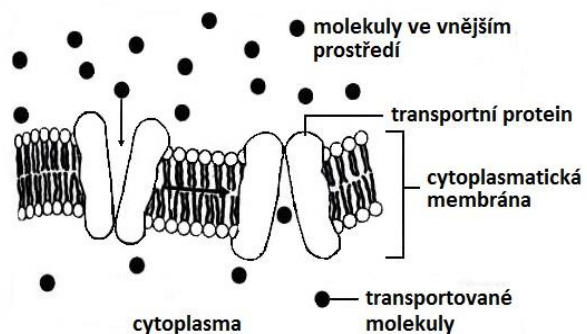


Obrázek 27: Stechiometrie aktivního transportu. (Mehrotra and Sumbali, 2009 – upraveno)

Bílkoviny zprostředkávající aktivní transport anorganických iontů bývají označovány jako přenašeče a jsou konstitutivní povahy. Přenašeče organických látek bývají označovány jako permeasy nebo translokasy a jsou v některých případech indukovatelné (jsou přítomné pouze v přítomnosti transportované látky).

8.2.2.1. Pasivní transport

Pasivní transport neboli *usnadněná difuze* je přenos uskutečňovaný po směru koncentračního spádu bez spotřeby energie. K transportu je využíván specifický přenašeč, se kterým je daná molekula transportována rychleji, než kdyby pronikala cytoplasmatickou membránou sama (např. transport glycerolu u *E. coli*). U bakterií není tento typ příliš častý, typičtější je pro eukaryotické buňky (např. transport monosacharidů u kvasinek). Při pasivním transportu je v daném okamžiku přenášena pouze jedna molekula – uniport transport.



Obrázek 28: Schéma usnadněné difuze. (Mehrotra and Sumbali, 2009 – upraveno)

8.2.2.2. Aktivní transport

Přenašečem je v tomto případě integrální bílkovina cytoplasmatické membrány, která spříženě transportuje ionty po koncentračním spádu a živiny proti koncentračnímu spádu. Může se jednat o symport nebo antiport. Tímto způsobem je u bakterií transportována řada živin (anorganické ionty, oligosacharidy, aminokyseliny, puriny, pyrimidiny, vitamíny).

Nezbytná energie pro transport je získána buď z ATP činností membránové ATPasy (*primární aktivní transport*) nebo ji dodává protonový gradient (*sekundární aktivní transport*). Zvláštním typem je *aktivní transport zprostředkovaný vazebným proteinem*, při kterém se uplatňují vysokoafinitní proteiny vyskytující se v periplasmatickém prostoru. Tyto proteiny na sebe váží transportovanou molekulu a přenáší ji k integrálnímu proteinu, který ji proti koncentračnímu gradientu přeneše do cytoplasmy. Zdrojem energie je ATP.

Látky schopné ovlivnit aktivní transport označujeme jako ionofory. Ionofory jsou rozpustné v lipidové části membrány, mohou působit jako přenašeče, modifikovat, zrušit či vyvolat elektrické potenciály nebo koncentrační gradienty iontů nebo vytvořit v membráně kanálky pro volnou difuzi iontů či malých molekul. Mezi ionofory patří třeba peptidová (valinomycin, gramicidin A, atd.) nebo polyenová antibiotika (např. nystatin).

8.2.2.3. Transport spojený s přeměnou transportované molekuly

Někdy je tento způsob označován také jako skupinová translokace. Transportní membránový protein současně katalyzuje chemickou přeměnu transportované molekuly. Typickým příkladem je *fosfotransferázový systém* fakultativně anaerobních a anaerobních bakterií umožňující přenos monosacharidů, disacharidů a alkoholických cukrů. Přenášené cukry jsou fosforylovány, donorem fosfátu a energie je fosfoenolpyruvát. Fosfor je přenášen postupně přes čtyři různé bílkoviny až na transportovaný cukr. První dvě bílkoviny (enzym I a HPr) se vyskytují volně v cytoplasmě bakterie a jsou nespecifické, druhé dvě (enzym II a enzym III) jsou periferní proteiny vázané na cytoplasmatickou membránu, jsou indukovatelné a specifické pro určitý cukr. Fosfotransferázový systém je velmi účinný, pro transport a fosforylaci jedné molekuly glukosy je zapotřebí pouze 1 molekula ATP.

8.2.3. Příjem vysokomolekulárních látek

Bakteriální buňky mohou přijímat i vysokomolekulární látky – peptidy, některé bílkoviny (např. bakteriociny), fágovou či volnou bakteriální DNA. Přesný mechanismus tohoto procesu není znám, předpokládá se přítomnost **receptorů** pro externí bílkoviny. Po jejich obsazení danou bílkovinou dochází zřejmě k lokální změně permeability cytoplasmatické membrány.

Při příjmu extracelulární DNA dochází nejprve k její adsorpci na bílkovinné receptory cytoplasmatické membrány a poté následuje její vtažení do buňky. Celý proces je energeticky velmi náročný.

Pinocytóza, typická pro eukaryotní buňky, se u bakterií **nevyskytuje**. Setkáváme se s ní pouze u mikrobiálních eukaryot, např. kvasinek. Pro pinocytózu je typická tvorba výchlípků cytoplasmatické membrány, která vytvoří kolem externí molekuly měchýřek, jež je následně vyprázdněn dovnitř buňky. Stejným způsobem probíhá i exkrece vysokomolekulárních látek z buňky.

8.2.4. Mechanismus vstupu antimikrobiálních látek

Protože je pro řadu látek cytoplasmatická membrána bakteriální buňky nepropustná, mechanismus vstupu antimikrobiálních látek je závislý na jejich chemické struktuře. Slabé kyseliny mohou do buňky vstupovat prostou difuzí, analogy dusíkatých bazí, aminokyselin a vitamínů využívají stávající transportní systémy příbuzných chemických látek (tj. purinů, pyrimidinů, aminokyselin a vitamínů). Řada antimikrobiálních látek působí přímo na obaly bakteriální buňky – poškozují buněčnou stěnu či její syntézu (např. peniciliny) nebo poškozují cytoplasmatickou membránu a negativně ovlivňují její funkci (polypeptidy, formaldehyd, silná oxidační činidla, rozpouštědla tuků, atd.).

8.2.5. Exkrece látek z bakteriální buňky

Pro bakteriální buňku je typický velmi aktivní katabolismus, jehož výsledkem je velké množství odpadních produktů. Řada látek opouští buňku prostou difuzí (např. CO₂, ethanol a vyšší alkoholy), mechanismus vylučování dalších látek (organické kyseliny, aminokyseliny, atd.) není dosud přesně objasněn.

Pro řadu potravinářsky významných bakterií je důležitá **exkrece extracelulárních hydrolytických enzymů** jako jsou např. proteiny, amylasy, celulasy či lipasy. Polypeptidové podjednotky těchto enzymů jsou syntetizovány na ribosomech a prochází cytoplasmatickou membránou. K jejich spojení do funkčních makromolekul dochází pravděpodobně buď v periplasmatickém prostoru nebo až po jejich průchodu póry buněčné stěny.

Podobný mechanismus se nachází také u sacharolytických kvasinek. Mimo to dochází u kvasinek a plísní k vylučování některých vysokomolekulárních látek do periplasmatického prostoru pomocí Golgiho aparátu, příp. i pinocytózou.

9. METABOLISMUS BAKTERIÍ

Z širšího pohledu můžeme metabolismus definovat jako tok hmoty, energie a informace živým systémem, přičemž mezi jednotlivými složkami existuje vzájemná souvislost. Základními biologickými ději v bakteriální buňce jsou – replikace genetické informace (udržování, zdvojování a předávání potomkům) a realizace genetické informace a její transformace ve struktury a funkce buňky.

Tok informace představuje: 1) replikaci DNA, 2) transkripci, 3) translaci, 4) příjem informací z prostředí, 5) přenos vnější informace na genom a tím modulaci procesů 2 a 3, příp. i 1; a 6) poskytování informací pro své okolí díky tvorbě metabolitů, antibiotik a adhesinů.

Tok energie je proces, kdy volná energie přijatá z vnějšího prostředí jako světelné záření (fototrofní bakterie) nebo redukované chemické molekuly (chemotrofní bakterie) je přeměněna na biologickou práci buňky a teplo, které odchází zpět do prostředí. Přijatá energie je transformovatelná do řady forem, přičemž centrální postavení má energie protonového gradientu na membráně a energie molekuly adenosintrifosfátu (ATP). Obě formy jsou vzájemně převeditelné: z energie protonového gradientu může vznikat ATP a současně štěpením ATP může vznikat protonový gradient.

Tok hmoty zahrnuje: 1) rozklad živin přijatých z prostředí na malé molekuly a metabolity, které slouží pro 2) syntézu aminokyselin, nukleových bazí a dalších stavebních kamenů nové biomasy a jejich polymerizaci v makromolekuly; 3) produkci redukujících molekul NAD(P)H₂ a 4) produkci potřebné energie, tj. syntézu ATP.

Intenzita metabolismu mikroorganismů je silně ovlivněna podmínkami vnějšího prostředí, zejména přísunem živin, teplotou a pH prostředí. Za optimálních podmínek je velmi intenzivní, např. *Escherichia coli* dvojnásobí svoji buněčnou hmotu za 20 minut, kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* do dvou hodin. Obrovská biosyntetická aktivita mikroorganismů je mimo jiné dána tím, že přijímají živiny celým povrchem těla, mají velmi bohatě vyvinutý proteosyntetický aparát (vysoký obsah ribosomů a RNA) a velmi aktivní katabolismus zajišťující dostatek energie.

Nedostatek živin má za následek zastavení rozmnožování a zpomalení metabolismu, který slouží pouze k zachování základních životních funkcí. Energie je získávána z rezervních látek, příp. i buněčných struktur, dochází k tzv. samosprávování buňky až smrti. *Nízké teploty* metabolismus zpomalují a prodlužují životnost buněk při hladovění, rychlé zamrazení

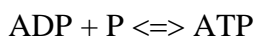
metabolismus zastaví a buňky dlouhodobě přežívají. Negativní vliv na metabolismus mají i *teploty vyšší než optimální*, které způsobují poškození enzymů a následnou smrt buňky.

Z pohledu potravinářské mikrobiologie mají největší význam chemoorganotrofní mikroorganismy, jejich metabolismu je věnována pozornost v následujícím textu.

9.1. Metabolismus chemotrofních bakterií – základní informace

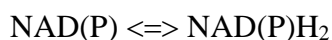
Metabolismus má dvě protichůdné, ale spolupůsobící stránky – katabolismus a anabolismus. **Anabolismus** představuje syntézu látek, tedy tvorbu složitějších biomolekul, makromolekul a supramolekulárních útvarů z jednoduchých živin. **Katabolismus** je energetický metabolismus poskytující dostatek volné energie pro průběh biologických dějů (syntéza živé hmoty, transport látek, pohyb, atd.). Syntéza látek nemůže probíhat samostatně, musí být spřažena s katabolickou reakcí v jediný celek, což se děje prostřednictvím *katalyzujícího enzymu*. Díky tomu může být energie „uvolněná“ katabolickou reakcí „zachycena“ v produktu reakce anabolické.

Univerzálním přenašečem energie formou přenášení fosfátu je **adenosintrifosfát (ATP)**, který vzniká fosforylací adenosindifosfátu (ADP) anorganickým fosfátem (P):

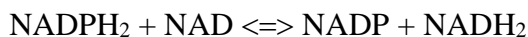


ATP je v buňce využíváno zejména při biosyntéze (polysacharidy, lipidy, proteiny, RNA, DNA), transportu látek a mechanické práci (pohybu), doplňkově při vzniku elektrického potenciálu, bioluminiscence (světla) a tepla. ATP vzniká jednak na cytoplasmatické membráně procesem membránové fosforylace a také přímo v cytoplasmě transfosforylací z energeticky bohatých fosforylovaných produktů.

Univerzálním přenašečem vodíku (či jiných redukujících ekvivalentů) nezbytným pro průběh oxidoredukčních reakcí je systém **nikotinamidadenin nukleotid (NAD)** a jeho fosforylovaný derivát **nikotinamidadenin nukleotid fosfát (NADP)**:



Role redukovaných nukleotidů v buňce spočívá v předávání vodíků a elektronů respiračnímu řetězci, v němž je vodík oxidován kyslíkem na vodu za vzniku ATP (uplatňuje se NADH₂). Současně slouží jako zdroj vodíku a elektronů při redukčních biosyntetických reakcích (zde se uplatňuje NADPH₂). Potřebná koncentrace obou redukovaných nukleotidů je udržována enzymem NAD(P)-transhydrogenasou podle rovnice:



9.1.1. Katabolismus

Katabolismus v chemotrofní buňce probíhá ve čtyřech navazujících etapách, jejichž výsledkem je vznik intermediárních metabolitů, ATP a NAD(P)H₂. **První etapu** představuje rozklad vysokomolekulárních látek na jednoduché molekuly (tuků na mastné kyseliny a glycerol, bílkovin na aminokyseliny a polysacharidů na jednoduché cukry).

Ve **druhé etapě** jsou tyto látky postupně metabolizovány za vzniku *kyseliny pyrohroznové* (pyruvátu) a *acetylkoenzymu A* (acetyl-CoA), dvou ústředních metabolitů bakteriální buňky. Hlavní osou katabolismu je rozklad cukrů procesem označovaným jako *glykolýza*, kdy je molekula glukosy postupně přeměňována až na pyruvát za vzniku 2 molekul ATP. Pyruvát je dále oxidován na acetyl-CoA (mimo procesu anaerobní fermentace). Acetyl-CoA je dílčím metabolitem také katabolismu aminokyselin a mastných kyselin.

Acetyl-CoA vstupuje do *Krebsova cyklu*, kde je postupně oxidován za vzniku CO₂ (**třetí etapa**). Odejmuté vodíky ve formě NADH₂ vstupují do *dýchacího řetězce* lokalizovaného na

cytoplasmatické membráně a redukuje kyslík na vodu, příp. jiný terminální akceptor elektronů na jeho redukovanou formu, za současného vzniku ATP (*čtvrtá etapa*). Paralelně s glykolýzou probíhá tzv. *fosfoglukonátová dráha*, která generuje NADPH₂ pro potřeby biosyntézy.

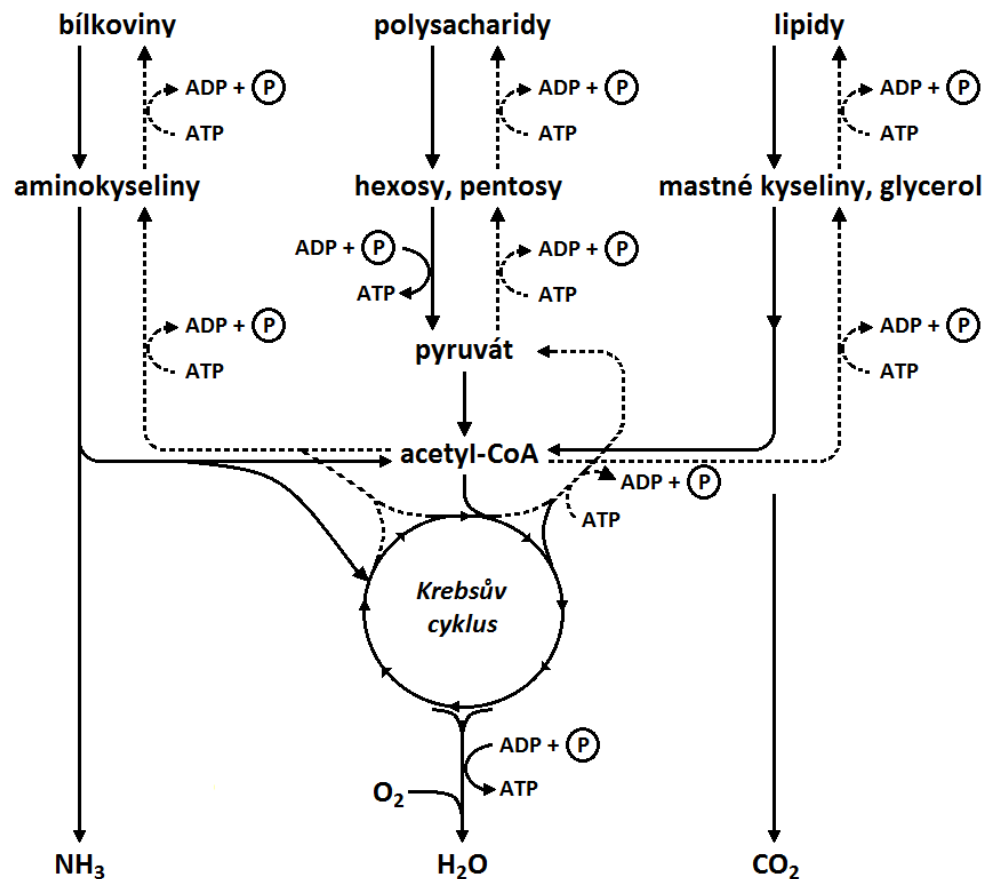
9.1.2. Anabolismus

Jednotlivé etapy anabolismu můžeme definovat následujícím způsobem. Výchozím bodem jsou základní živiny (CO₂, H₂O, NH₃, HPO₄²⁻), ze kterých vznikají jednotlivé metabolické intermediáty (acetyl-CoA, pyruvát, oxalacetát). Ty jsou podkladem pro vznik základních stavebních kamenů živé hmoty – aminokyselin, nukleotidů, monosacharidů a mastných kyselin. Z nich jsou následně syntetizovány makromolekuly (DNA, RNA, bílkoviny, polysacharidy, peptidoglykan, lipidy), které mohou být dále uspořádány do supramolekulárních útvarů – ribosomů a cytoplasmatické membrány. Výsledkem anabolismu je vznik všech potřebných struktur bakteriální buňky.

Anaboličké a kataboličké dráhy na sebe v řadě případů těsně navazují, velmi zjednodušeně můžeme říci, že anabolismus je obráceným průběhem katabolismu. To ovšem platí pouze v hrubých rysech, protože ne všechny enzymové reakce jsou reverzibilní a probíhají v obou směrech.

Příkladem může být glykolýza (kataboličká dráha) a glukoneogeneze (anaboličká dráha). Glykolýza zahrnuje 10 enzymových reakcí, z nichž 7 je reverzibilních (jsou katalyzovány stejným enzymem v obou směrech). Zbývající tři jsou irreverzibilní, a proto při glukoneogenezi musí být místo nich použita jiná enzymová reakce.

Hlavní kataboličké a anaboličké dráhy se sbíhají v metabolickém uzlu – Krebsově cyklu, který je součástí obou z nich (obrázek 29). Je tzv. amfibičkový (z řeckého *amphi* = obojí).



Obrázek 29: Základní schéma katabolismu a anabolismu v bakteriální buňce. Souvislá čára – katabolismus, přerušovaná čára – anabolismus. (Kaprálék, 2000 – upraveno)

9.1.3. Bakteriální enzymy

Řada mikroorganismů je schopna přizpůsobit metabolismus podmínkám vnějšího prostředí upravením svého enzymového vybavení či změnou aktivity přítomných enzymů. Mikrobiální enzymy můžeme rozdělit do několika skupin:

- **konstitutivní enzymy** přítomné v buňce za všech podmínek (např. enzymy glykolýzy),
- **indukovatelné enzymy**, které jsou syntetizovány pouze při přítomnosti tzv. *induktoru*, tedy sloučeniny, jejíž přeměnu katalyzují (např. enzymy dýchacího řetězce u kvasinek, kde induktorem je kyslík),
- **reprimovatelné enzymy**, které jsou produkovány pouze v případě, že v prostředí není přítomna živina produkovaná metabolickým řetězcem, jehož jsou součástí (např. enzymy nezbytné pro syntézu některé aminokyseliny jsou přítomny pouze tehdy, není-li aminokyselina přítomna v živném prostředí),
- **indukovatelné enzymy podléhající represí**, ke kterým patří např. indukovatelné katabolické enzymy, jejichž tvorba je reprimována přítomností snáze využitelného zdroje energie. Pro vysvětlení, indukce enzymu štěpícího oligosacharid či polysacharid je potlačena (reprimována) v případě, že je v živném prostředí mimo induktor (tj. daného oligo- či polysacharidu) přítomno i dostatečné množství glukosy či jiné hexosy. Využití glukosy je zajištěno konstitutivními enzymy. Hovoříme o **glukosové** či **hexosové represí** (tzv. katabolická represe), která je příčinou postupného využívání substrátů vedoucího např. k diauxii (viz kapitola 7.2.2.). Dalším příkladem jsou deaminasy uplatňující se při anabolických procesech syntézy bílkovin.

Pro indukci syntézy enzymů podléhajících katabolické represí je nezbytný cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). Toho je v přítomnosti vysokých koncentrací hexos v buňce nedostatek, a proto k indukci dalších katabolických enzymů nedochází. Hexosové represí podléhá i indukce dýchacích enzymů u většiny fakultativně anaerobních bakterií. Je pro ně jednodušší využívat přítomný cukr anaerobním procesem, i když je zisk energie nižší.

Některá antibiotika či chemoterapeutika selektivně inhibují bakteriální enzymy, a to dvojitým způsobem. Struktura kompetitivních inhibitorů je natolik podobná přirozenému substrátu, že se vážou na aktivní místo enzymu, avšak nemohou být přeměněny na normální produkt reakce. Nekompetitivní inhibitory se vážou na jiné než aktivní místo a způsobují konformační změny enzymu, jejichž výsledkem je snížení až zastavení tvorby produktu.

9.1.3.1. Oxidoredukční enzymy

Významnou skupinu katabolických enzymů chemoorganotrofních mikroorganismů představují oxidoredukční enzymy, jejichž **kofaktor** slouží jako přenašeč vodíku nebo elektronů. Při oxidaci substrátu tedy dochází k jeho redukci. Podle síly vazby kofaktoru na bílkovinnou část enzymu (apoenzym), rozlišujeme *koenzymy* (snadno disociují) a *prostetické skupiny* (jsou pevně vázány). Příkladem koenzymu je NAD(P), k prostetickým skupinám patří flavinové kofaktory – flavinadenin dinukleotid (FAD) a flavinmononukleotid (FMN).

Regenerace kofaktoru (dehydrogenace jeho redukované formy ve formu schopnou dehydrogenovat další molekulu substrátu) probíhá buď aerobně, nebo anaerobně. Při anaerobním způsobu předá kofaktor dva vodíky jiné části substrátu za vzniku redukované sloučeniny bohaté na energii – dále nevyužitelný produkt anaerobního procesu. Za aerobních podmínek jsou redukované kofaktory postupně oxidovány respiračním řetězcem. Výsledkem je vznik vody z vodíků a vzdušného kyslíku a produkce velkého množství energie ve formě ATP (hovoříme o aerobní neboli oxidativní fosforylaci).

9.1.3.2. Extracelulární enzymy

Z praktického hlediska mají pro potravinářskou mikrobiologii velký význam extracelulární enzymy, které umožňují mikroorganismům štěpit velké makromolekuly přítomné ve vnějším

prostředí na jednoduché molekuly schopné transportu skrz cytoplasmatickou membránu. Tyto enzymy jsou ve velké míře zodpovědné za kažení potravin.

Extracelulární **proteasy** a **lipasy** jsou termostabilní enzymy, které si zachovávají svoji aktivitu i v pasterovaných a částečně i v UHT (vysokotepečně ošetřených) výrobcích. Enzymy jsou aktivní v poměrně širokém rozmezí pH i teplot, optimální bývá většinou přibližně neutrální pH a teplota kolem 20 °C. Psychrotrofními mikroorganismy jsou extracelulární enzymy produkovány i při chladničkových teplotách (pod 4 °C). Mezi nejvýznamnější producenty proteas patří gramnegativní psychrotrofní bakterie rodů *Pseudomonas* (*Ps. fluorescens*, *Ps. fragi*), *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Shewanella*, *Serratia* a *Acinetobacter*, k producentům lipas potom *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes*, *Shewanella*, *Acinetobacter* a *Serratia*. Mimo gramnegativních bakterií mohou extracelulární proteasy a lipasy produkovat také bakterie *Bacillus* spp., některé kvasinky a plísně. K produkci enzymů dochází ke konci logaritmické fáze růstu, první sensoricky zjevné změny se objevují při kontaminaci řádově 10⁶ KTJ (kolonie tvořících jednotek) v 1 ml či 1 g potravin. Účinkem extracelulárních enzymů dochází k rozkladu bílkovin (kapitola 9.3.3.) a lipidů (kapitola 9.3.2.), který je doprovázen výraznými sensorickými změnami. Producenti extracelulárních proteas a lipas nejčastěji kontaminují syrové produkty živočišného původu (mléko, maso).

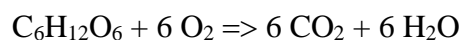
Extracelulární *sacharolytické enzymy* se podílejí na metabolizaci polysacharidů (kapitola 9.3.1.2.). Kažení způsobené sacharolytickými mikroorganismy se často vyskytuje u potravin rostlinného původu. Typickým příkladem je plesnivění chleba nebo tzv. nitkovitost pečiva, která vzniká v důsledku růstu některých druhů *Bacillus* spp.

Řada enzymů je průmyslově či medicínsky využitelná, např. některé proteasy se používají jako přísada do biologicky aktivních pracích a čisticích prostředků, uplatňují se také v pivovarnictví nebo při tenderizaci (zkřehčování) masa. Vhodnými producenty jsou bakterie Bacillus spp. a plísně rodu Aspergillus. Lipasy nachází využití v kosmetickém průmyslu.

Průmyslově získané amylasy se používají v pivovarnictví, dále ke štěpení škrobu při výrobě sladidel nealkoholických nápojů a v textilním průmyslu. Pektolytické enzymy jsou používány ke konzervaci ovocných šťáv či v textilním průmyslu k uvolnění celulózových vláken z textilních rostlin. V medicíně se používají např. proteasy a amylasy plísní jako enzymatické preparáty při nedostatečné funkci pankreatu.

9.2. Energetický metabolismus chemoorganotrofních bakterií

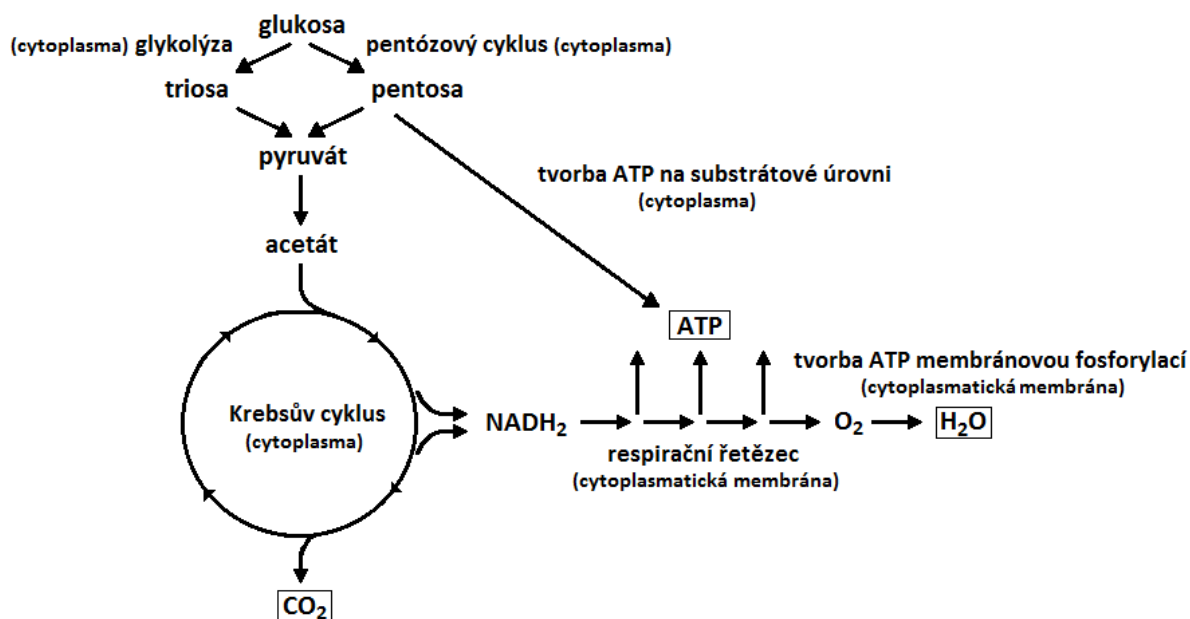
Naprostá většina bakterií, včetně potravinářsky významných druhů, je chemoorganotrofní. Tyto bakterie získávají energii oxidací organických látek. Typickým zdrojem energie je glukosa, která je za přístupu kyslíku postupně oxidována až na oxid uhličitý a vodu:



Oxidace glukosy je sledem řady dílčích reakcí doprovázených uvolněním energie ve formě ATP. V závislosti na typu katabolismu, může z jedné molekuly glukosy vzniknout až 38 molekul ATP. Obecné schéma katabolismu chemoorganotrofů je uvedeno na obrázku 30.

I. etapa – redukováná organická látka (např. glukosa) je v průběhu tzv. **glykolízy** rozštěpena na dvě triosy, které jsou následně oxidovány na pyruvát. Uvolněná energie je využita k syntéze ATP (**tvorba ATP na substrátové úrovni**). Alternativní cestou je **pentózový cyklus**, kdy je glukosa nejprve přeměna na pentosu a poté na pyruvát.

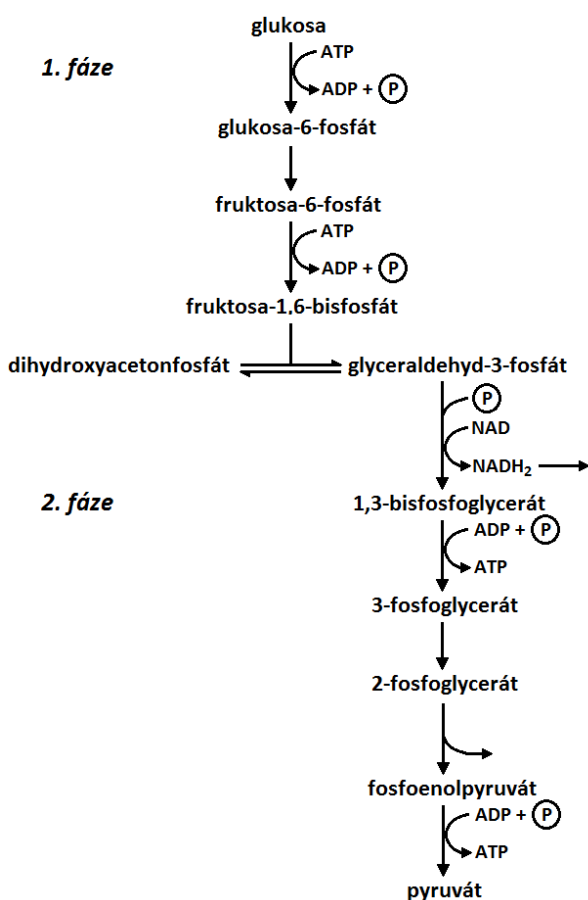
II. etapu představuje oxidace pyruvátu přes acetát tzv. **Krebsovým cyklem**. Uhlík odchází jako CO₂, vodík je předán NAD (vzniká NADH₂). V průběhu *III. etapy* vstupuje NADH₂ do **respiračního řetězce**, který je u bakterií lokalizován na cytoplasmatické membráně. Respirační řetězec je sled oxidoredukci, kterými je vodík oxidován kyslíkem na vodu. Uvolněná energie je využita k syntéze ATP tzv. **membránovou fosforylací** (*IV. etapa*).



Obrázek 30: Obecné schéma katabolismu chemoorganotrofních bakterií. (Kaprálek, 2000 – upraveno)

Katabolismus chemoorganotrofních bakterií má tři varianty – fermentaci, aerobní respiraci a anaerobní respiraci. Celý cyklus uvedený na obrázku 30 probíhá za přítomnosti kyslíku, označujeme jej tedy jako **aerobní respiraci**. Na rozdíl od rostlin a živočichů jsou bakterie schopny žít chemoorganotrofně i za anaerobních podmínek. Při **anaerobní respiraci** je rozdíl pouze v tom, že konečným akceptorem elektronů může být opět kyslík, nikoli však vzdušný, ale vázaný v anorganické molekule (např. ve formě nitrátu, který je redukován na nitrit). Třetí možností je **fermentace** neboli kvašení, které opět probíhá za anaerobních podmínek. Při fermentaci je zdroj energie (glukosa) v průběhu katabolismu rozštěpen na dvě látky, z nichž jedna je oxidována a druhá redukována (ta funguje jako akceptor vodíku a elektronů odejmutých první látkou).

Již bylo zmíněno, že hlavní osu katabolismu tvoří **glykolýza** (Embdenova-Meyerhofova metabolická dráha). Zjednodušené schéma glykolýzy je uvedeno na obrázku 31. Glykolýza je sled 10 reakcí katalyzovaných 10 enzymy, který probíhá v cytoplasmě bakteriální buňky. Funkcí glykolýzy je uvolnit z glukosy energii a transformovat ji v energii molekuly ATP a současně produkovat uhlíkaté stavební kameny pro anabolismus. V první fázi je molekula



Obrázek 31: Schéma glykolýzy.

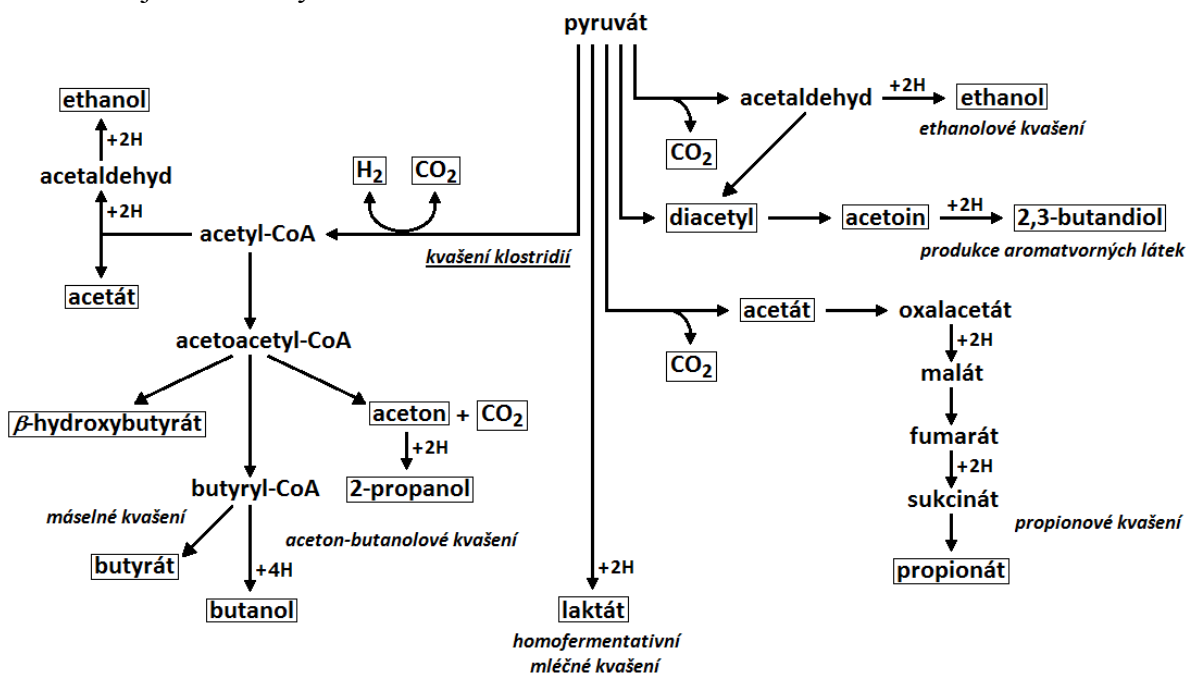
glukosy dvakrát aktivována fosforylací a následně rozštěpena na dva vzájemně převeditelné triosofosfáty, současně dochází ke spotřebě 2 molekul ATP.

Ve druhé fázi je 1,3-bisfosfoglyceraldehyd oxidován a současně fosforylován až na pyruvát, v průběhu této fáze dojde k syntéze dvou molekul ATP na jednu molekulu pyruvátu (tvorba ATP na substrátové úrovni). Na jednu molekulu glukosy tedy vznikají v úvodu glykolýzy čtyři molekuly ATP, po odečtení spotřebované energie je čistý zisk 2 molekuly ATP.

9.2.1. Fermentace

Fermentace je vývojově nejstarší a málo výkonný způsob katabolismu, její výhodou je, že nepotřebuje exogenní nezávislý akceptor vodíku a elektronů. Fermentující bakterie jsou schopny využít celou řadu substrátů. Fermentace začíná glykolýzou, vzniklý pyruvát je za anaerobních podmínek metabolizován různými bakteriemi různým způsobem. Cílem přeměny pyruvátu je vždy současná přeměna NADH_2 na NAD, který je schopný dehydrogenovat další molekulu substrátu při glykolýze.

V potravinářství má fermentace nezastupitelnou roli, ať už se jedná o procesy využívané při výrobě potravin (mléčné, propionové, ethanolové kvašení, atd.) nebo procesy uplatňující se při jejich kažení (např. máselné kvašení). Schopnost bakterií fermentovat různé cukry či další látky je také velmi důležitým taxonomickým a identifikačním znakem. Hlavní typy fermentace jsou uvedeny na obrázku 32.



Obrázek 32: Schéma hlavních typů fermentace pyruvátu (konečné produkty jsou v rámečku). (zpracováno podle Kaprálek, 2000 a Šilhánková, 2002)

9.2.1.1. Mléčné kvašení

Asi největší význam má v potravinářství mléčné kvašení, při kterém je pyruvát redukován na laktát (anion kyseliny mléčné). Je-li pyruvát produktem glykolýzy, hovoříme o tzv. **homofermentativním mléčném kvašení**, které je typické pro bakterie rodů *Streptococcus*, *Lactococcus* či některé laktobacily. Konečným produktem je téměř výhradně laktát.

Druhým způsobem je tzv. **heterofermentativní mléčné kvašení**, typické pro *Leuconostoc* spp. a některé laktobacily. V tomto případě neprobíhá klasická glykolýza, ale alternativní

tzv. **fosfoketolázová dráha**, jejímž výsledkem je produkce ekvimolárního množství *laktátu*, *ethanolu* a CO_2 .

Fosfoketolázová dráha začíná stejně jako pentózový cyklus oxidativní dekarboxylací glukosa-6-fosfátu na ribulosa-5-fosfát. Ten je epimerasou změněn na xylulosa-5-fosfát, který je fosfoketolásou štěpen na 3-fosfoglyceraldehyd a acetylfosfát. První je glykolytickými enzymy metabolizován na pyruvát a laktát, druhý je redukován nejprve na acetaldehyd a posléze na ethanol.

Samovolné mléčné kvašení patří mezi nejstarší postupy konzervace potravin, využívá se při konzervaci zelí, okurek a zelené píce (silážování). Dostatečné okyselení produktu brání rozvoji hnilobných bakterií. Homofermentativní bakterie mléčného kvašení se využívají při průmyslové produkci kyseliny mléčné. Asi nejširší využití má mléčné kvašení při výrobě mléčných výrobků (kysané mléčné nápoje, jogurty, sýry, atd.). Bakterie rodu *Leuconostoc* se využívají k průmyslové výrobě dextranu ze sacharosu, dextran se používá v medicíně (náhražky krevní plasmy) nebo např. v gelové chromatografii.

9.2.1.2. Ethanolové kvašení

Ethanolové (alkoholové) kvašení se u bakterií vyskytuje zcela výjimečně, typické je pro kvasinky. Pyruvát je nejdříve dekarboxylován na acetaldehyd, který je redukován na ethanol (obrázek 32). Z jedné molekuly glukosy vznikají dvě molekuly *ethanolu* a dvě molekuly CO_2 , čistý zisk energie jsou dvě molekuly ATP. Na počátku kvašení, při nedostatku acetaldehydu, vzniká ještě malé množství glycerolu.

Průmyslové využití má ethanolové kvašení při výrobě alkoholických nápojů (víno, pivo), výrobě ethanolu pro potravinářské a lékařské účely a při použití pekařského droždí (ke kynutí těsta dochází v důsledku tvorby CO_2 při ethanolovém kvašení, vzniklý ethanol se během pečení odpaří). Typickým producentem je např. kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*.

Doprovodnými produkty ethanolového kvašení jsou, při jeho průmyslovém využití, i vyšší jednosytné alkoholy (propanoly, butanoly a pentanoly – výroba laků) či estery organických kyselin a ethanolu (součást buketu vína).

9.2.1.3. Produkce aromativních látek

Při ethanolovém kvašení se z pyruvátu vzniklého glykolýzou tvoří malé množství silně aromativních látek. První z nich je *diacetyl*, který vzniká kondenzací acetaldehydu s pyruvátem v acetylmléčnou kyselinu, která je posléze samovolně oxidačně rozložena na diacetyl. Diacetyl může být redukován na *acetoin* a ten na *2,3-butandiol* (obrázek 32).

Velmi nežádoucí je produkce diacetylu a dalších aromativních látek v pivovarnictví, kde nepříznivě ovlivňují chuť piva již ve velmi malých koncentracích. Značné množství diacetylu tvoří zejména bakterie rodu *Pediococcus*. Naopak v mlékárenství je produkce těchto látek žádoucí. Producentem diacetylu je zde *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, součást smetanové kultury používané při výrobě zakysané smetany, některých druhů másla či sýrů. Diacetyl dodává těmto produktům typické příjemné aroma.

Velké množství acetoinu a 2,3-butandiolu vytváří *Bacillus* spp. a *Enterobacter* spp., některé druhy se využívají při průmyslové kvasné výrobě 2,3-butandiolu (využití v gumárenství).

9.2.1.4. Propionové kvašení

Propionové kvašení je charakteristické pro bakterie rodu *Propionibacterium*. Jejich činností je pyruvát dekarboxylován na acetát za uvolnění *oxidu uhličitého*, acetát je přeměněn na oxalacetát, který je postupně metabolizován až na *kyselinu propionovou* (obrázek 32).

Velké využití má propionové kvašení v sýrařství, kde se propionové bakterie používají při výrobě sýrů s oky v těstě (např. ementál, moravský blok). Typická oka vznikají při zrání sýrů

hromaděním vyprodukovaného volného CO_2 . *Propionibacterium* spp. se používá také pro kvasnou výrobu propionátu. Propionát vápenatý je protiplísňové činidlo využívané například v potravinářských obalech (papírové obaly a další obalové materiály).

9.2.1.5. Kvašení bakterií rodu *Clostridium*

Zcela specifický typ fermentace pyruvátu probíhá u sacharolytických klostridií (např. *Clostridium butyricum*, *C. acetobutylicum*). Pyruvát je oxidačně dekarboxylován za součinnosti koenzymu A na acetyl-CoA. Koenzymem oxidoreduktasy katalyzující tuto reakci je ferredoxin, díky němuž je reakce doprovázena uvolněním plynného vodíku. Silná produkce plynů – CO_2 a H_2 , má velký význam při kažení potravin vlivem klostridií. Kondenzací dvou acetyl-CoA vzniká acetoacetyl-CoA, který je následně metabolizován řadou různých reakcí na jednotlivé metabolické produkty: *butyrát* (anion kyseliny máselné), *butanol*, *aceton*, *2-propanol*, *kyselinu β -hydroxymáselnou* a v malé míře i kyselinu octovou a ethanol.

Kyselina máselná je velmi nepříjemně a intenzivně páchnoucí tekutina. Máselné kvašení je nežádoucí zejména při výrobě zrajících sýrů, kdy kontaminace klostridii může vést k tzv. pozdnímu duření sýrů (silná tvorba plynů a produkce kyseliny máselné, může být doprovázena i proteolytickými změnami). Velmi nežádoucí je máselné kvašení při výrobě fermentovaných krmiv – siláží, kdy dochází k jejich znehodnocení. Nekvalitní siláže mohou být zdrojem alimentárních patogenů, např. *Listeria monocytogenes*. Na druhou stranu se průmyslová produkce kyseliny máselné využívá k přípravě vonných esterů ve voňavkářství.

Aceton-butanolové kvašení, doprovázené tvorbou malého množství ethanolu, má význam při výrobě rozpouštědel a výbušnin. Anaerobní bakterie, včetně klostridií, se uplatňují při anaerobním čištění odpadních vod a vyhnívání organického materiálu v bažinách a stojatých vodách. Produkované plyny – vodík a oxid uhličitý, jsou zde využívány methanovými bakteriemi.

9.2.1.6. Fermentace nevázaná na glykolýzu

Základní osou fermentace cukrů je glykolýza, jejíž produkt – pyruvát, je následně metabolizován různým způsobem. Některé fermentující bakterie jsou schopny produkovat pyruvát i jiným způsobem než glykolýzou. Alternativní dráhu představuje již zmíněné **heterofermentativní mléčné kvašení** (kapitola 9.2.1.1.) nebo **ketodeoxyglukonátová** (Entnerova-Doudoroffova) dráha.

Při ketodeoxyglukonátové dráze je první krok zpracování glukosy shodný s glykolýzou i pentózovým cyklem (glukosa-6-fosfát) a druhý krok s pentózovým cyklem (kyselina 6-fosfoglukonová). Následuje dehydratace kyseliny 6-fosfoglukonové specifickou dehydratasou na 2-oxo-3-deoxy-fosfoglukonát, který je aldolasou rozštěpen na 3-fosfoglyceraldehyd a pyruvát. Další metabolizace obou molekul je shodná s glykolýzou.

Dalším specifickým postupem je tzv. **fosfoklastické štěpení pyruvátu**, jehož výsledkem je produkce kyseliny mravenčí (štěpena na H_2 a CO_2) a acetylfosfátu (transfosforyluje ADP na ATP). Reakce se vyskytuje např. u *E. coli*.

Potřebnou energii ve formě ATP mohou některé bakterie (např. klostridia) získávat i anaerobní fermentací dalších organických látek, nejen cukrů. Jedná se především o aminokyseliny. Příkladem je tzv. **Sticklandova reakce**, kdy je energie získávána anaerobní oxidoredukcí probíhající mezi dvěma aminokyselinami, z nichž jedna je oxidována (slouží jako donor elektronů) a druhá redukována (akceptor elektronů). Tyto reakce probíhají při rozkladu bílkovin a bývají doprovázeny produkcí nepříjemně páchnoucích látek (např. amoniaku či sirovodíku). Bakterie rodu *Peptococcus* zkvašují také puriny a pyrimidiny.

9.2.2. Aerobní respirace

Aerobní respirace je fylogenetická i funkční návazba na glykolýzu, kterou rozšiřuje o tři operační celky – Krebsův cyklus, respirační řetězec (elektrontransportní systém) a membránovou fosforylaci (tvorbu ATP na membránové úrovni) (obrázek 30).

V Krebsově cyklu je pyruvát oxidován na CO₂. Vodíky odejmuté dehydrogenázami jsou kaskádou oxidoredukci představovanou respiračním řetězcem na cytoplasmatické membráně (zprostředkovává transport vodíku a elektronů ke kyslíku) oxidovány kyslíkem na vodu. Uvolněná energie je využita k syntéze ATP na membránové úrovni.

Hromadění částečně oxidovaných produktů, které vznikají při nedostatečné oxidaci organických látek aerobní respirací, může mít při výrobě potravin negativní dopad. Příkladem je tzv. octovatění vína či piva za přístupu vzduchu, na kterém se podílí bakterie rodu *Acetobacter* či *Gluconobacter*. Na druhou stranu průmyslové využití nachází aerobní respirace při výrobě octa, kyseliny citronové a dalších organických kyselin.

9.2.2.1. Krebsův cyklus

Krebsův cyklus (citrátový cyklus, cyklus trikarboxylových kyselin) je amfibolický proces, ve kterém se vzájemně prolínají obě stránky metabolismu – katabolismus (oxidace zdroje energie až na CO₂) a anabolismus (produkce vhodných uhlíkatých molekul pro tvorbu vlastních aminokyselin, nukleových bazí, mastných kyselin, atd.). U bakterií je lokalizovaný na cytoplasmatické membráně. Aby nedošlo k jeho zastavení, jsou jednotlivé intermediáty Krebsova cyklu průběžně doplňovány přídatnými, tzv. anaplerotickými reakcemi (karboxylace pyruvátu, štěpení isocitrátu, glyoxylátový cyklus).

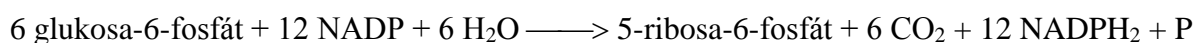
Do Krebsova cyklu vstupuje acetyl-CoA. Dvouuhlíkový acetát je jednou otočkou cyklu oxidován na dvě molekuly CO₂. Současně vznikají 4 páry vodíkových atomů, z toho 3 ve formě NADH₂ a jeden ve formě FADH₂. Všechny čtyři páry vodíků končí po průchodu respiračním řetězcem na kyslíku redukovaném na vodu. Při oxidaci jedné molekuly acetylu a následné oxidační regeneraci kofaktorů vznikne až 12 molekul ATP. Zdrojem acetylu je pyruvát vytvořený glykolýzou z glukosy, při aerobní respiraci jedné molekuly glukosy vzniká celkem až 38 molekul ATP.

Mimo pyruvátu jsou Krebsovým cyklem využívány i další produkty glykolýzy – ethanol, glycerol a laktát, dále dikarboxylové a trikarboxylové kyseliny, vyšší mastné kyseliny a většina deaminovaných aminokyselin. Citrátový cyklus slouží mikroorganismů jako zdroj oxokyselin pro syntézu aminokyselin.

Průmyslové využití nachází řada intermediátů Krebsova cyklu. Za zmínku stojí průmyslová produkce kyseliny citronové plísněmi (např. Aspergillus niger) či produkce kyseliny glutamové některými koryneformními bakteriemi. Plíseň Rhizopus nigricans a někteří zástupci rodu Mucor produkují fumarát (tzv. fumarové kvašení), který se využívá při výrobě plastů či přípravě esterů používaných v kosmetickém průmyslu.

9.2.2.2. Pentózový cyklus

Alternativní drahou ke glykolýze a Krebsovu cyklu je **fosfoglukonátová dráha** neboli **pentózový cyklus** (také nazýván jako přímá oxidace glukosy či hexosamonofosfátový zkrat). U bakterií se může vyskytovat buď minoritně jako paralela ke glykolýze nebo jako dominantní katabolická dráha. Jedná se o cyklickou dráhu, jedno otočení pentózového cyklu lze popsat následující sumární rovnicí:



Pentózový cyklus je zdrojem redukovaného koenzymu NADPH₂ a dále pentos pro syntézu nukleotidů a nukleových kyselin. Molekuly NADPH₂ jsou využitelné buď při biosyntetických reakcích nebo mohou být respiračním řetězcem, po předchozím převedení na NADH₂,

oxidovány kyslíkem na vodu. Oxidací jedné molekuly NADPH_2 vznikají tři molekuly ATP, z jedné molekuly glukosy vzniká 12 molekul NADPH_2 , tj. 36 molekul ATP. Po odečtení jedné molekuly ATP na počáteční fosforylaci glukosy je *čistý výtěžek pentózového cyklu 35 molekul ATP*, přičemž všechno ATP vzniká na membránové úrovni.

9.2.2.3. Elektrontransportní systém (respirační řetězec)

Respirační řetězec můžeme obecně popsat jako molekulární soustavu umožňující postupnou oxidaci určitého intracelulárního redukováného metabolitu vzdušným kyslíkem tak, že uvolněná energie neuniká jako teplo, ale je transformována v energii molekuly ATP. Respirační řetězec je vždy lokalizován na biologické membráně, u eukaryotních buněk na vnitřní membráně mitochondrií, u bakterií na cytoplasmatické membráně. V dýchacím řetězci jsou oxidovány redukované kofaktory NADH_2 , FADH_2 a FMNH_2 . Kofaktor NADPH_2 zde oxidován není, musí proběhnout jeho přeměna NAD(P) -transhydrogenasou v NADH_2 .

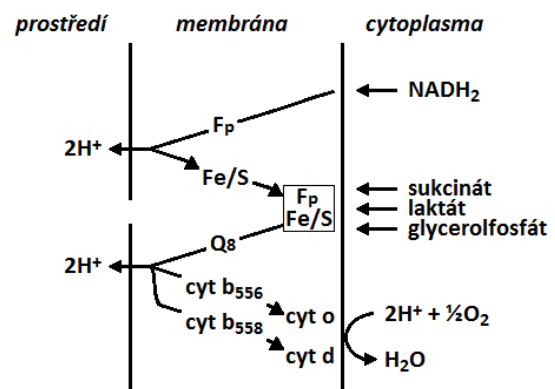
Prakticky je respirační řetězec *soustava redoxních systémů* uspořádaných vzestupně podle svého redoxpotenciálu a tvořených bílkoviny vázanými v membráně – oxidoredukčními enzymy a neenzymovými bílkoviny sloužícími jako přenašeči elektronů. Redoxní systémy přijímající celý vodík (H^+ a elektron) – flaviny, chinony a kyslík, se střídají s redoxními systémy přijímajícími pouze elektrony (nehemové železo, cytochromy). Díky rozložení oxidace do dílčích reakcí s menšími nároky na změny volné energie, může vznikat větší počet molekul ATP. Jednotlivé komponenty jsou organizovány do tří supramolekulárních komplexů – I., II. a III., z nichž každý může dát vznik jedné molekule ATP. Na rozdíl od vývojově ustáleného mitochondriálního respiračního řetězce, je respirační řetězec bakterií značně proměnlivý, obsahuje více vstupů i výstupů a počet komponent je proměnlivý v závislosti na druhu bakterie a podmínkách vnějšího prostředí.

U některých bakterií se vyskytují, mimo respiračního řetězce, ještě další přenašeče elektronů – malé proteiny obsahující jako prostetickou skupinu železo a síru (ferredoxiny) nebo flavinmononukleotid (flavodoxiny). Uplatňují se např. ve fotosyntéze, při fixaci vzdušného dusíku či fermentativních reakcích anaerobů.

9.2.2.4. Tvorba ATP na membránové úrovni (membránová fosforylace)

Způsob spřažení exergonické (reakce uvolňující energii) oxidace NADH_2 kyslíkem v respiračním řetězci na membráně s endergonickou (reakce spotřebovávající energii) syntézou ATP z ADP a fosfátu byl detailně objasněn až ve druhé polovině minulého století. Základní princip membránové fosforylace můžeme vysvětlit tzv. *Mitchelovou teorií protonového gradientu*:

1. Membrána, v níž je situovaný respirační řetězec a ATPasa je nepropustná pro ionty, zejména pro H^+ .
2. Respirační řetězec současně s tokem vodíku a elektronů od donoru k akceptoru provádí translokaci protonů z jedné strany membrány na druhou. Zřejmě je toho dosaženo střídáním přenašečů vodíku a přenašečů elektronů a jejich uspořádání napříč membránou do smyček. Díky tomu jsou protony H^+ uvolňovány na jednu stranu membrány, ale následujícím přenašečem celého vodíku jsou sbírány z její druhé strany. Zjednodušeně tedy, z vnitřní strany membrány jsou protony



Obrázek 33: Pravděpodobná funkční organizace aerobního respiračního řetězce *Escherichia coli*. (Kaprálek, 2000 – upraveno)

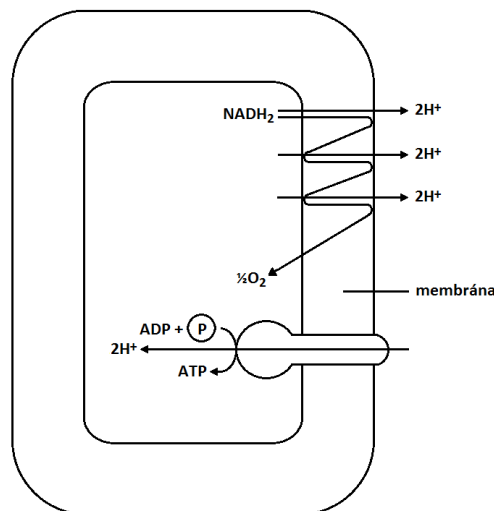
Legenda: Fp – flavoproteidové dehydrogenasy, Fe/S – proteiny obsahující nehemové Fe a reaktivní síru, Q – chinony, cyt – cytochromy

sbírány, zatímco na vnější straně jsou uvolňovány do vodného prostředí. Translokace protonů z jedné strany membrány na druhou dává vzniknout protonovému gradientu na membráně (obrázek 33).

3. Enzym ATPasa katalyzuje reverzibilní reakci $ADP + P \rightleftharpoons ATP$. Syntéza ATP je spřažena s translokací protonů po koncentračním spádu z vnějšího prostředí skrz membránu do prostředí vnitřního (obrázek 34). Protonový gradient generovaný respiračním řetězcem tak „pohání“ syntézu ATP, vybíjí se prostřednictvím ATPasy a při tom vykonává práci. Jedná se o uzavřený okruh. V případě bakteriální ATPasy se na jednu vytvořenou molekulu ATP spotřebují dva protony.

Vzniklý protonový gradient se může vyrovnat zpět činností jiných membránových proteinů, které translokují protony po spádu zpět a spřaženě s tím konají buněčnou práci. Konkrétně se jedná o syntézu ATP, transport látek skrz cytoplasmatickou membránu proti koncentračnímu spádu (aminokyseliny, cukry, sodík, vápník), transhydrogenaci a otáčení bakteriálního bičíku umožňující pohyb bakteriální buňky, ve zvláštních případech i o produkci světla a tepla.

U řady bakterií může být protonový gradient vytvořen i jiným iontem než H^+ , např. Na^+ -redoxní pumpa a Na^+ -ATPasa u methanogenních bakterií, sodíková pumpa u anaerobních a fakultativně anaerobních bakterií (bakterie rodu *Clostridium*, *Salmonella* či *Klebsiella*).



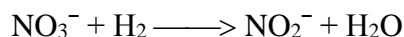
Obrázek 34: Spřažení aerobní respirace se syntézou ATP prostřednictvím protonového gradientu v mitochondrii a v bakterii. (Kaprálek, 2000 – upraveno)

9.2.3. Anaerobní respirace

Anaerobní respirace se vyskytuje pouze u bakterií. Jediný rozdíl oproti aerobní respiraci spočívá v tom, že konečným akceptorem elektronů není kyslík, ale jiná látka. Určité drobné odlišnosti jsou také v transportu elektronů respiračním řetězcem. Energeticky je anaerobní respirace vždy méně výhodná než respirace aerobní.

9.2.3.1. Nitrátová respirace

Nejnámějším typem anaerobní respirace je nitrátová respirace, při které je nitrát NO_3^- redukován na nitrit NO_2^- (obvyklý způsob), příp. až na plynný dusík N_2 (tzv. denitrifikace, vyskytuje se pouze ojedinele). Vzniklé reakční produkty jsou vylučovány do prostředí. Jedná se o významný taxonomický a identifikační znak řady bakterií, např. bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* – rody *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, atd. Redukce nitrátů na nitrity probíhá podle rovnice:



Donorem vodíku a elektronů může být $NADH_2$, sukcinát, laktát, formiát, glycerolfosfát a vodík. Elektrontransportní systém je lokalizován na cytoplasmatické membráně. Zahrnuje příslušnou dehydrogenasu a terminální nitrátoreduktasu, mezi kterými jsou jako přenašeči elektronů cytochrom b a chinon. U fakultativně anaerobních bakterií je systém propojen s aerobním respiračním řetězcem, kdy některé komponenty jsou společné a jiné specifické pro anaerobní respiraci. Na dva přenesené elektrony vznikají 2 molekuly ATP. Aktivita nitrátoreduktasy je indukována přítomností nitrátů a anaerobním prostředím, přítomnost kyslíku ji reprimuje.

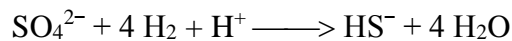
Proces *denitrifikace* (redukce nitrátů až na molekulární dusík) je velmi důležitý z ekologického hlediska, přispívá ke koloběhu dusíku v přírodě. Probíhá v půdě i ve vodě. Zástupcem denitrifikačních bakterií je např. gramnegativní bakterie *Paracoccus denitrificans*.

Respiraci nitrátu je třeba odlišit od asimilace nitrátu jako zdroje dusíku, kdy je nitrát redukován až na NH₃, ale pouze v množství potřebném pro biosyntézu. Při asimilaci nedochází k jeho hromadění v prostředí.

9.2.3.2. Další typy anaerobní respirace

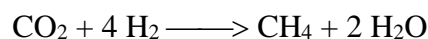
U řady bakterií (zejména gramnegativních) se vyskytuje *fumarátová respirace*, při které je fumarát redukován na sukcinát, či *tetrathionátová respirace*, kdy je tetrathionát redukován na thiosulfát. V obou případech dochází k produkci ATP.

Pro bakterie rodů *Desulfovibrio* a *Desulfomaculum* je typická *sulfátová respirace*. Jedná se o striktně anaerobní bakterie žijící v bahně a produkující redukcí síranů plynný sulfan, který reaguje s kovy přítomnými v bahně za vzniku černých sulfidů (příčina černé barvy bahna).



Sulfátoredukující bakterie se podílejí na koloběhu síry v prostředí. Opět je třeba odlišit sulfátovou respiraci od asimilace síranů, která je zdrojem biogenního prvku síry.

Výsledkem *respirace CO₂* je produkce methanu. Provádí ji několik druhů tzv. methanogenních bakterií, které patří mezi *Archaea*. K produkci methanu dochází v anaerobním prostředí, jako jsou bahna, sedimenty, odpadní vody, skládky, ale také v zažívacím traktu (bachoru) přežvýkavců.



Mezi anaerobní respirace můžeme zařadit i produkci plynného vodíku, redukcí trojmocného železa na dvojmocné či redukcí čtyřmocného manganu na dvojmocný.

9.3. Vstup substrátů do katabolismu chemoorganotrofních bakterií

Velmi častým, a do jisté míry i modelovým, zdrojem uhlíku a energie je glukosa. Bakterie jsou však schopny využívat řadu různých substrátů, a to nejen sacharidů. Cytoplasmatická membrána bakterií je selektivně propustná pouze pro jednoduché molekuly. Přesto jsou bakterie schopny využít i vysokomolekulární látky jako jsou polysacharidy, bílkoviny či lipidy, a to díky produkci extracelulárních enzymů. Tyto enzymy štěpí vysokomolekulární látky mimo bakteriální buňku na jednoduché molekuly schopné transportu skrz cytoplasmatickou membránu. Produkce extracelulární enzymů je jedním ze stěžejních mechanismů kažení potravin.

9.3.1. Vstup sacharidů a polysacharidů

Hexosy jsou nejvhodnějším zdrojem energie a uhlíku pro většinu chemoorganotrofních bakterií. Enzymy umožňující transport hexos a jejich metabolizaci jsou konstitutivní povahy (trvale přítomné v buňce). Výjimkou je galaktosa, jejíž transport a přeměna je induktivní, tj. příslušné enzymy jsou produkovány až při poklesu koncentrace ostatních hexos pod určitou úroveň. Hexosy jsou metabolizovány glykolýzou, obvykle po předchozí fosforylaci, příp. konverzi. Pentosy a tetrosy vstupují do katabolismu prostřednictvím pentózového cyklu.

9.3.1.1. Disacharidy a oligosacharidy

Disacharidy (sacharosa, laktosa, maltosa, celobiosa, atd.) a oligosacharidy jsou bakteriemi snadno využívány. K indukci transportu oligosacharidů do buňky a k produkci příslušných enzymů dochází po vyčerpání dostupných hexos (pokles koncentrace pod hraniční hodnotu).

Intracelulárně jsou disacharidy a oligosacharidy obvykle *hydrolyticky štěpeny* na monosacharidy, které jsou následně metabolizovány odpovídajícím způsobem. Disacharidy mohou být štěpeny také *fosforolýzou* – štěpení kyselinou fosforečnou za vzniku jejího esteru, např. maltosa je štěpena na glukosa-1-fosfát a glukosu.

Dalším způsobem je štěpení disacharidů na jeden *monosacharid* a *polymer druhého monosacharidu*. Setkáváme se s tím např. u bakterie *Leuconostoc mesenteroides*, která štěpí sacharosu na fruktosu (ta slouží jako zdroj energie a uhlíku) a glukosu, která je ihned štěpícím enzymem přenesena na jinou glukosu, resp. již vytvořený dextran (polymer glukosy). Dextrany, produkované ve formě volného slizu, mají viskózní charakter a způsobují významné problémy v cukrovarnictví nebo při výrobě potravin s vysokým obsahem sacharosy (marmelády, cukrovinky, slazené nápoje, koncentráty ovocných šťáv, atd.).

9.3.1.2. Polysacharidy

Polysacharidy jsou *extracelulárními sacharolytickými enzymy* štěpeny na oligo- či monosacharidy. Produkce extracelulárních enzymů je indukována využitím hexos vzniklých z oligosacharidů. Extracelulární enzymy štěpí také pektiny přítomné v rostlinných pletivech, což se prakticky projevuje nežádoucím měknutím ovoce (tzv. měkká hniloba).

Škrob a glykogen, tvořené proměnlivým podílem amylasy (lineární řetězce) a amylopektinu (větvené řetězce), jsou hydrolyzovány amylasami (α -amylasy, β -amylasy) na směs maltosy a glukosy. Amylasy produkují např. sporotvorné bakterie *Bacillus* spp. (nitkovitost pečiva) a *Clostridium* spp. či některé plísně.

Hydrolyza celulosy enzymem celulasou probíhá jak ve volné přírodě, tak v předžaludku přežvýkavců. Jedná se o poměrně pomalý proces, který navíc vyžaduje přítomnost tzv. prehydrolytického faktoru C_1 , který způsobuje nezbytné zvýšení hydratace celulosy. Výsledkem štěpení je disacharid celobiosa. Celulasy jsou produkovány např. bakteriemi rodů *Clostridium*, *Cellulomonas* či *Cellvibrio*, dále některými plísněmi a aktinomycetami.

Řada sacharolytických enzymů je získávána průmyslovým způsobem a má další využití. Z kvasinek Saccharomyces cerevisiae se získává invertasa (štěpí sacharosu na glukosu a fruktosu), která má extracelulární charakter. Používá se při výrobě cukrovinek a v pekárenství, kde zabraňuje tvrdnutí jemného pečiva. Intracelulární laktasa, opět kvasinkového původu, se používá při výrobě zahuštěných mléčných výrobků, kde zabraňuje krystalizaci laktosy. Z krmivářského hlediska mají pozitivní význam celulolytické bakterie.

9.3.2. Vstup lipidů

Jako zdroj energie a uhlíku slouží nejčastěji triglyceridy a fosfolipidy. Bakterie schopné produkovat *extracelulární lipasy* je hydrolyzují na mastné kyseliny a glycerol. Glycerol po převedení na 3-fosfoglyceraldehyd vstupuje do glykolýzy, kde je přeměněn na pyruvát, který je za aerobních podmínek oxidován v Krebsově cyklu.

Volné mastné kyseliny podléhají tzv. *β -oxidaci mastných kyselin*, při které jsou postupně aerobně oxidovány za vzniku acetyl-CoA a mastné kyseliny kratší o dva uhlíky. Jedná se v podstatě o „spirálovitě“ probíhající proces, který se opakuje až do úplné oxidace celé mastné kyseliny se sudým počtem uhlíků. Vzniklý acetyl-CoA vstupuje do Krebsova cyklu. Současně mohou vznikat sensoricky významné látky jako methylketony, sekundární alkoholy a těkavé kyseliny. β -oxidace mastných kyselin je významným zdrojem energie pro bakteriální buňku.

Rozklad tuků je nežádoucí zejména u potravin s jejich vysokým obsahem, např. másla. Velmi často jej vyvolávají psychrotrofní mikroorganismy, které jsou schopny metabolismu i za nízkých (chladničkových) teplot, např. bakterie Pseudomonas spp. či některé plísně. Vzniklé nižší mastné kyseliny – máselná (C4), kapronová (C6), kaprylová (C8) či kaprinová (C10), významně ovlivňují sensorické vlastnosti potravin (žluklá chuť, cizí pach) a zvyšují číslo kyselosti. Vznik methylketonů je typický pro zrání plísňových sýrů.

9.3.3. Vstup aminokyselin a bílkovin

Z dusíkatých látek jsou nejdříve využívány aminokyseliny, teprve po jejich spotřebování vstupují do katabolismu i peptidy a bílkoviny.

9.3.3.1. Aminokyseliny

Prvním krokem katabolismu aminokyselin je jejich deaminace nebo transaminace. Při *deaminaci* je aminoskupina odštěpena a uvolněna do prostředí ve formě amoniaku (prostředí se tím alkalizuje). Vzniklé organické kyseliny nejčastěji vstupují do glykolýzy a Krebsova cyklu. Konečnými uhlíkatými produkty katabolismu aminokyselin jsou pyruvát, acetát a některé intermediáty Krebsova cyklu. Při deaminaci vznikají sensoricky nežádoucí látky jako amoniak, indol, skatol či sirovodík.

Při *transaminaci* je aminoskupina přenesena z aminokyseliny na oxokyselinu, ze které vzniká příslušná aminokyselina. Nejčastějšími akceptory jsou kyselina α -ketoglutarová, oxaloctová a pyrohroznová. Transaminace je využitelná i v opačném směru při biosyntéze aminokyselin, kdy jako zdroj dusíku slouží ion NH_4^+ z prostředí.

Můžeme se setkat i s *dekarboxylací aminokyselin* za vzniku CO_2 a primárních aminů, které mohou být velmi toxické, např. kadaverin z lysinu či putrescin z ornitinu. Jejich producenty jsou zejména bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* či pseudomonády. Velmi závažné jsou **biogenní aminy** vzniklé dekarboxylací aromatických aminokyselin histidinu (histamin), tyrosinu (tyramin) a tryptofanu (tryptamin). Při zvýšeném výskytu mohou u citlivých jedinců vyvolat intoxikaci.

Histamin způsobuje bolesti hlavy, zvracení, bolesti břicha a poruchy krevního oběhu, častým zdrojem jsou ryby bohaté na histidin (makrely, tuňák). Tyramin vzniká zejména v dlouho zrajících sýrech a trvanlivých salámech, způsobuje zvýšení krevního tlaku a bolesti hlavy. Biogenní aminy mohou vznikat i v potravinách rostlinného původu. Mezi významné producenty patří např. enterokoky.

9.3.3.2. Peptidy a bílkoviny

Peptidy a bílkoviny jsou nejprve hydrolyzovány *extracelulárními proteasami* na jednotlivé aminokyseliny, které po průchodu cytoplasmatickou membránou vstupují do katabolismu. Extracelulární proteasy jsou produkovány zejména řadou tzv. hnilobných bakterií, které způsobují rozklad bílkovin masa a dalších produktů za vzniku amoniaku, sirovodíku a dalších sensoricky nežádoucích látek (indol, skatol, atd.). Mezi významné producenty patří např. bakterie rodů *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* či *Proteus* a plísň. Všechny bílkoviny v prostředí jsou díky činnosti mikroorganismů mineralizovány na konečné produkty (CO_2 , H_2O a NH_3) a vráceny tak do koloběhu látek v přírodě.

Po spotřebování bílkovin z prostředí dochází k využívání ostatních, vzácnějších, organických látek, jako jsou třeba alifatické a aromatické uhlovodíky a jejich deriváty (bakterie *Pseudomonas* spp. či některé plísň) či jednouhlíkové sloučeniny obsahující methylskupinu CH_3 – např. methan či methylalkohol (methylotrofní bakterie).

9.4. Anabolismus chemoorganotrofních bakterií

Syntéza buněčné hmoty – anabolismus, je úzce spjata s produkcí energie a nezbytných stavebních komponent – katabolismem. Velmi zjednodušeně lze říci, že anabolismus je do jisté míry obrácenou dráhou katabolismu. Řada reakcí a metabolických drah je reverzibilní a může probíhat oběma směry, na druhou stranu řada kroků je v anabolismu jinak organizována či katalyzována jinými enzymy. Vzhledem k velkému počtu sloučenin, podílejících se na stavbě bakteriální buňky, jsou anabolické procesy mnohem rozmanitější. Přispívá k tomu i produkce tzv. *sekundárních metabolitů*, tj. různých barviv, antibiotik či toxinů.

9.4.1. Tvorba malých molekul

Hlavní osou biosyntézy malých molekul je opět glykolýza a Krebsův cyklus. Jednoduché **cukry (hexosy a pentosy)** syntetizuje chemoorganotrofní bakterie ze tříuhlíkatých či čtyřuhlíkatých intermediátů procesem glukoneogeneze. Glukoneogeneze je do jisté míry obrácenou drahou ke glykolýze (7 reakcí je společných, 3 v glykolýze nevratné reakce jsou nahrazeny jinými). Při využití dvouuhlíkatého acetátu musí být tento nejprve glyoxalátovým cyklem přeměněn na čtyřuhlíkatý sukcinát. Interkonverze (vzájemná přeměna) cukrů uvnitř buňky je vždy realizována na úrovni jejich fosfátů nebo cukerných nukleotidů.

Výchozí látkou pro syntézu **mastných kyselin** se sudým počtem uhlíků je acetyl-CoA, v případě větvených mastných kyselin s lichým počtem uhlíků potom jiné intermediáty (např. propionyl-CoA). Nenasycené mastné kyseliny vznikají aerobním i anaerobním způsobem.

Zcela zásadní roli hrají ve stavbě bakteriální buňky **purinové a pyrimidinové nukleotidy**. Syntéza purinů začíná ribosa-5-fosfátem, výchozí látkou syntézy pyrimidinů je kyselina asparagová a karbamoylfosfát. Deoxyribonukleotidy jsou získány redukcí příslušných ribonukleotidů, obvykle na úrovni nukleosiddifosfátů. Mimo syntézy nukleotidů „de novo“, jsou bakterie schopné využívat i nukleové baze či nukleosidy přítomné v živném médiu.

Řada chemoorganotrofních bakterií je schopna syntetizovat **aminokyseliny** i v případě, že jedinou organickou látkou v živném médiu je glukosa a ostatní látky jsou anorganické. Syntéza všech 20 aminokyselin je rozdělena do 6 biosyntetických drah – glutamátová, aspartátová, pyruvátová, serinová, aromatická a histidinová. Jednotlivé dráhy se liší výchozí látkou (různé intermediáty glykolýzy a Krebsova cyklu) a počtem dílčích operací (transaminace, fosforylace, redukce, atd.). Zdrojem dusíku pro tvorbu aminokyselin je amoniak NH_3 , který může být fixován trojím způsobem.

Většina bakterií vyžaduje dusík ve formě amoniaku, nitrátu či organické dusíkaté látky, pouze omezený počet je schopný fixovat a využívat vzdušný dusík (např. Clostridium pasteurianum, Azotobacter spp., Klebsiella pneumoniae). Některé z nich žijí symbioticky a intracelulárně (Rhizobium spp.), jiné volně. Fixace vzdušného dusíku spočívá v redukcí N_2 na NH_3 enzymem nitrogenasou, vyžaduje přítomnost redukujících ekvivalentů a značného množství energie. Jedná se o striktně anaerobní proces, proto musí aerobní bakterie zabránit přístupu kyslíku k místu redukce N_2 .

Je zajímavé, že i heterotrofní bakterie potřebují fixovat určité množství plynného CO_2 . Heterotrofní fixace CO_2 slouží jednak k doplňování intermediátů Krebsova cyklu, jednak jako zdroj CO_2 pro biosyntézu složitějších molekul (např. purinů a pyrimidinů).

Sekundární metabolity (pigmenty, antibiotika, vonné látky, toxiny, atd.) jsou organické látky pro bakteriální buňku postradatelné. Tvoří se z primárních metabolitů (velmi často je výchozí látkou acetyl-CoA), v nepatrném množství a jsou druhově specifické. Tvorba sekundárních metabolitů (tzv. sekundární metabolismus) obvykle začíná až poté, co se zastavil růst a množení buňky, u sporulujících bakterií a plísní probíhá současně se sporulací (konec exponenciální fáze růstu a její přechod do fáze stacionární).

9.4.2. Tvorba makromolekul

Polysacharidy mají dvě základní funkce – stavební (peptidoglykan, teichoové kyseliny, lipopolysacharidy, příp. pouzdro a glykokalyx) a zásobní (glykogen). Jejich syntéza není řízena žádnou maticí.

Glykogen je polymer tvořený molekulami α -D-glukosy, které jsou lineárně spojovány vazbou 1,4 a větví se prostřednictvím vazeb 1,6. Výchozí látkou je glukosa-1-fosfát (vzniká z glukosa-6-fosfátu), který reaguje s ATP za vzniku ADP-glukosy a difosfátu. Vzniklá adenylovaná glukosa slouží k tvorbě glykogenu. Syntéza glykogenu vyžaduje přítomnost již existující glykogenové molekuly, tzv. očka (obsahuje minimálně 4 monomery), větvení glykogenu zajišťuje zvláštní větvicí enzym.

Peptidoglykan je syntetizován ve formě prekurzorů, které jsou transportovány přes hydrofobní vrstvu cytoplasmatické membrány a napojeny na již existující peptidoglykan (kapitola 5.3.). *Lipopolysacharidy* jsou syntetizovány v cytoplasmě jako krátké polysacharidové úseky, přenášeny skrz membránu a na vnější straně polymerizovány a připojeny k lipidu A.

Hlavními lipidy bakteriální buňky jsou **fosfolipidy** podílející se na stavbě cytoplasmatické membrány. Výchozí látkou pro jejich syntézu je dihydroxyacetonfosfát (intermediát glykolýzy). Kvantitativní zastoupení jednotlivých fosfolipidů je dáno jednak geneticky, dále kultivačními podmínkami a růstovou fází.

Syntéza **DNA** (replikace DNA) je detailně popsána v kapitole 7.1.1., syntéza jednotlivých typů **RNA** (transkripce) potom v kapitole 6.2.1.

Syntéza **bílkovin** (translace, proteosyntéza) je složitý a detailně prostudovaný proces. Obecně se jedná o překlad genetické informace nesené mRNA (sekvence nukleotidů) v primární strukturu bílkovin (sekvence aminokyselin). Proteosyntéza probíhá na ribosomech (kapitola 5.5.2.), kde se setkává mRNA a jednotlivé aktivované aminokyseliny. Základní kroky proteosyntézy jsou uvedeny v kapitole 6.2.2.

Velmi rychle probíhající anabolismus umožňuje mikroorganismům během krátké doby přeměnit méně hodnotné či odpadní látky na buněčnou hmotu bohatou na bílkoviny a vitaminy. Typickým příkladem je buněčná hmota kvasinek, která se používá jako hodnotné bílkovinné krmivo či vitaminový doplněk (zdroj vitaminů skupiny B). Z kvasinek, a také některých plísní, se dále získává ergosterol (provitamin D) či β -karoten (provitamin A). Mikroorganismy se dále využívají k produkci aminokyselin (lysin, kyselina glutamová), nukleotidů, koenzymů či dalších intermediátů metabolismu.

*Buněčná hmota mikroorganismů je důležitým zdrojem enzymů pro průmyslové, lékařské či vědecké účely (glukosaoxidasa, glukosaisomerasa, DNA polymerasa, restriční endonukleasy, atd.). Z extracelulárních produktů anabolismu mikroorganismů se průmyslově získávají polysacharidy tvořící slizový obal buněk – např. dextran, xanthan či kyselina hyaluronová. Velký význam má produkce antibiotik bakteriemi *Streptomyces* spp. a dalšími aktinomycetami, příslušníky rodu *Bacillus* či plísněmi.*

10. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PŘEŽÍVÁNÍ MIKROORGANISMŮ V POTRAVINÁCH

Vnitřní a vnější faktory potravin určují druh mikrobiálních změn, rychlost množení mikroorganismů a rychlost, s jakou se dostávají z lag fáze do exponenciální fáze růstu nebo naopak odumírají, a tím ovlivňují bezpečnost a trvanlivost poživatin.

Vnitřní faktory (*Intrinsic Factors*) jsou popisovány jako fyzikálně-chemické vlastnosti potravin. Řadí se k nim:

- složení potravin,
- pH (koncentrace vodíkových iontů),
- aktivita vody (a_w),
- redoxní potenciál (E_h),
- textura,
- obsah přirozených antimikrobiálních látek.

Vnější faktory (*Extrinsic Factors*) jsou představovány podmínkami uchovávání a skladování potravin, což je:

- teplota prostředí,
- relativní vlhkost vzduchu,
- složení atmosféry,
- čas.

K **dalším faktorům** ovlivňujícím přežívání mikroorganismů v potravinách patří: tlak, záření, ultrazvuk, mechanické vlivy, působení cizorodých antibakteriálních látek, desinfekčních prostředků apod.

Vedle výše uvedených faktorů má na trvanlivost potravin z mikrobiálního hlediska vliv také počet mikroorganismů a druhové zastoupení mikroflóry. Čím méně je v potravine mikroorganismů a čím méně jsou aktivní (se schopností množit se a metabolizovat), tím delší čas je potřeba k jejich pomnožení a vzniku senzorických změn z důvodu dlouhé lag fáze a delšího generačního času.

Počáteční počet a druhové složení se uplatňují zejména při nízkých skladovacích teplotách. Při těchto teplotách se lag fáze a generační doby mikroorganismů různě prodlužují v závislosti na jejich druhu a počtu. Při optimálních podmínkách pro růst, rozmnožování a metabolismus mikroorganismů (především při optimální teplotě) je vliv počátečního počtu mikroorganismů malý.

10.1. Vnitřní faktory

10.1.1. Složení potravin

Významný vliv na údržnost potravin a rychlost množení mikroorganismů má obsah vody v potravine, obsah látek, které jsou zdrojem energie (např. sacharidy, alkoholy, aminokyseliny) a dusíku (proteiny, peptidy, aminokyseliny), obsah vitaminů a růstových faktorů (vitaminy skupiny B) a minerálních látek.

Obecně platí, že potraviny obsahující více **nízkomolekulárních látek** a větší množství **vody** se kazí rychleji. Důvodem je skutečnost, že nízkomolekulární látky mohou mikroorganismy metabolizovat přímo bez předchozího štěpení. Bílkoviny a vysokomolekulární sacharidy (škrob, pektin, celulóza) musí být nejprve mikrobiálními exoenzymy rozštěpeny na nízkomolekulární produkty a teprve pak jsou metabolizovány endoenzymy. Štěpení bílkovin extracelulárními proteasami nastupuje až poté, co jsou spotřebovány snáze dostupné nízkomolekulární složky. Extracelulární enzymy produkují zejména bakterie rodu *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* a některé druhy čeledi *Enterobacteriaceae* (např. *Proteus* spp.). Hnilobné produkty jako sirovodík, amoniak, aminy a organické kyseliny nepříznivě ovlivňují senzorické vlastnosti potravin.

Jako **zdroj energie** využívají mikroorganismy v potravinách cukry, alkoholy, aminokyseliny. Jen málo mikroorganismů je schopno využít komplexní sacharidy jako jsou škrob a celulóza na jednoduché cukry. Tuhy jsou jako zdroj energie využívány jen velmi malým počtem mikroorganismů.

Primárním **zdrojem dusíku** pro heterotrofní mikroorganismy jsou aminokyseliny. Mnohé mikroorganismy jsou schopny využívat celé bílkoviny, jiné nižší složky – peptidy a aminokyseliny. Většina potravin je na bílkoviny bohatá. Mikroorganismy přeměňují všechny dusíkaté látky na amoniak a tento pak využívají k syntéze vlastních buněčných bílkovin. Jen malá část mikroorganismů nepotřebuje žádnou dusíkatou sloučeninu, protože asimiluje elementární dusík přímo ze vzduchu.

Ke svému růstu vyžadují mikroorganismy v malých dávkách **vitaminy skupiny B**. Většina potravin má dostatek B-vitaminů pro ty mikroorganismy, které je nejsou schopny syntetizovat. Obecně nejmenší schopnost syntetizovat růstové faktory a vitaminy mají grampozitivní bakterie, proto musí být těmito složkami zásobeny před započítím růstu. Gramnegativní bakterie a plísně jsou schopny syntézy většiny potřebných látek, proto mohou růst i na potravinách s nízkým obsahem B-vitaminů. V ovoci vitaminy skupiny B chybí, a proto je napadáno plísněmi a kvasinkami, které je dovedou syntetizovat.

Minerální látky využívají mikroorganismy ve formě anorganických solí (např. MgSO_4 – zdroj hořčíku a síry). V některých případech však mikroorganismy raději asimilují minerální látky z organických sloučenin, např. síru z bílkovin nebo aminokyselin či fosfor z nukleotidů.

10.1.2. Koncentrace vodíkových iontů – pH

Růst mikroorganismů i jejich biochemická aktivita jsou silně ovlivněny hodnotou pH potravy. Každý mikrobiální druh se může rozmnožovat pouze v určitém rozmezí pH. Pro optimální růst většiny bakterií je toto rozmezí poměrně úzké, zatímco například u většiny plísní je podstatně širší. Extrémní pH může mikroorganismy usmrtit.

Faktor pH nabývá hodnot od 0 do 14 a je definován jako záporně vzatý dekadický logaritmus koncentrace oxoniových kationtů: $\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+]$. Neutrální pH se pohybuje kolem hodnot 7, „kyslejší“ potraviny mají hodnoty nižší, „zásaditější“ naopak vyšší. Princip stanovení pH spočívá v měření potenciálu vznikajícího na rozhraní dvou fází oddělených membránou měřící skleněné elektrody, ponořené do vyšetřovaného vzorku extraktu nebo vzorku. Tento potenciál se snímá v porovnání s konstantním potenciálem druhé – referenční elektrody (např. kalomelové nebo argentochloridové). Měření pH lze provádět ve výluhu (zpravidla 10% vodní výluh rozmělněné potraviny) nebo vpichem (u vzorků tuhé konzistence – např. vpichem přímo do svalové tkáně).

Hodnota pH má vliv na **rozmnožování** bakterií, rychlost **růstu a vitalitu**, dále pak na intenzitu a charakter **metabolismu** a ovlivňuje **permeabilitu cytoplasmatické membrány**. Při nízkém pH je membrána saturována ionty H^+ což limituje pronikání esenciálních kationtů. Opačně při vysokém pH saturace membrány hydroxylovými ionty limituje pasáž esenciálních aniontů. Velmi úzký vztah je mezi pH prostředí a **termorezistencí** mikroorganismů. Odolnost buněk ke zvýšeným teplotám je tím menší, čím větší je odchylka od optimálního pH, což platí jak pro vegetativní buňky, tak pro spory. Hodnota pH může dále ovlivňovat **dostupnost kovových iontů**. Hořčík a fosfor tvoří v alkalickém prostředí nerozpustné komplexy, i když se při nižším pH vyskytují ve volné formě. Rovněž železo, zinek a vápník se v alkalickém prostředí stávají nerozpustnými. Také je známo, že kyselé pH (< 4,0) zabraňuje **klíčení spor**. U bakteriálních spor rodů *Bacillus*, *Clostridium* a *Desulfotomaculum* zabraňuje kyselé pH klíčení spor a jejich přeměně na vegetativní formu. Této skutečnosti se využívá u potravin sterilovaných teplem: kyselé potraviny o pH nižším než 4,0 (ovocné kompoty a šťávy, zelenina v kyselém nálevu) se sterilizují teplotami do 100 °C, neboť přežívající bakteriální spory zde nemohou vyklíčit.

Tabulka 5: Průměrné hodnoty pH vybraných potravin. (Görner aValík, 2004 – upraveno)

Potravina	pH	Potravina	pH
Vaječný bílek	až 9,6	Zelenina (mnoho druhů)	6,6 – 5,7
Mléko	6,7 – 6,5	Rajčata	4,4 – 4,0
Drůbeží maso	6,7 – 6,3	Kysané mléčné výrobky	4,2 – 3,8
Ryby	6,6 – 5,7	Majonézy	4,1 – 3,0
Maso	5,8 – 5,4	Ovoce (mnoho druhů)	4,5 – 3,5
Bílé pečivo	6,0 – 5,0	Citróny	2,4 – 2,2

Většina **bakterií** roste v neutrálním nebo slabě alkalickém pH (6,6 – 7,5). Mezi bakterie přežívající extrémní pH patří střevní bakterie, u nichž je schopnost odolat velmi nízkému pH žaludečních šťáv i alkalickému pH žluči pro přežití v daném prostředí nezbytná. Kyselé pH přežívají také druhy tvořící jako hlavní produkty metabolismu kyseliny (octové, mléčné nebo propionové bakterie), i tyto se však při příliš nízkém pH přestávají množit a ustává jejich metabolická činnost. Naproti tomu hnilobné bakterie jsou velmi citlivé k nízkému pH, čehož se využívá při konzervaci potravin (marinované ryby, zelenina v kyselém nálevu nebo mléčně zkvašená zelenina). **Minimální hodnota pH pro většinu bakterií, které se podílí na kažení potravin je 4,4 – 4,6.**

Kvasinky vyžadují pro růst kyselé prostředí (optimum pH 4,2 – 5,5) a již slabě alkalické prostředí jejich růst zastavuje. Optimální pH většiny **plísní** je poblíž neutrálního bodu, avšak mohou se rozmnožovat ve velmi širokém rozmezí pH (1,2 – 11,0). Při silně kyselém pH prostředí (do 2,0) se rozmnožují druhy tvořící značné množství organických kyselin (např. někteří zástupci rodu *Penicillium* či *Aspergillus*).

Hodnota pH potravin může určovat typy mikroorganismů, které jsou schopny se v dané potravine rozmnožovat, stávat se dominantními a případně působit kažení, žádoucí fermentaci nebo mohou představovat zdravotní riziko. Řada potravin je přirozeně kyselých (fermentované mléčné a masné výrobky, kysané zelí, atd.), kyseliny mohou být do potravin záměrně přidávány nebo jsou produkovány enzymatickou činností mikroorganismů.

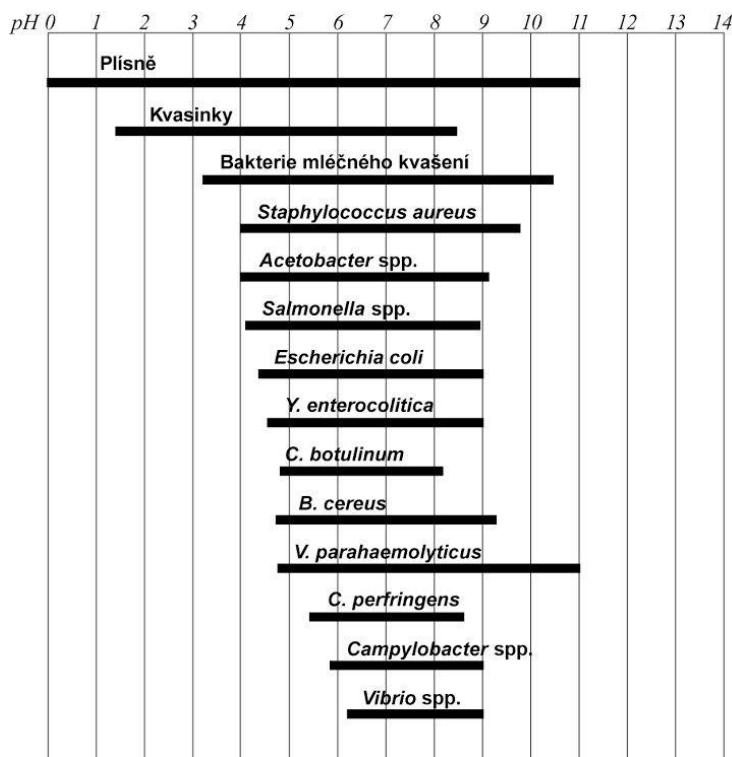
Například syrové kravské mléko má hodnotu pH mezi 6,5 – 6,7, což se blíží neutrální hodnotě pH. Vlivem bakterií mléčného kvašení, které jsou v syrovém mléce přirozeně přítomné, se při teplotě 28 – 30 °C, v důsledku rychlé fermentace disacharidu laktózy, sníží jeho hodnota pH na 4,0 a nižší již za 16 až 20 hodin.

Při hodnocení inhibičního vlivu kyselého prostředí je třeba rozlišit vliv nízké hodnoty pH a **vliv kyseliny**, kterou byla tato hodnota snížena. Metabolismus a růst bakterií je inhibován nejen nízkými hodnotami pH (volnými H⁺ ionty), ale také molekulami v kyselém prostředí nedisociovaných slabých organických kyselin. Ty, protože jsou bez náboje, lehce přechází přes lipidovou část cytoplasmatické membrány do bakteriální buňky. Nižší mastné kyseliny – kyselina mléčná a octová, způsobují okyselení obsahu bakteriální buňky a/nebo inhibici metabolismu a transportu živin. Při stejné hodnotě pH mají slabé organické kyseliny na růst a metabolismus bakterií silnější inhibiční účinek než silné disociované kyseliny (např. HCl).

Příkladem je situace, kdy růst S. aureus byl inhibován v mléce okyseleném na pH 4,1 pomocí kyseliny mléčné nebo octové, zatímco v mléce okyseleném na stejnou hodnotu pH kyselinou chlorovodíkovou inhibován nebyl.

10.1.3. Aktivita vody – a_w

Mikroorganismy potřebují pro svůj metabolismus vodu. Proto k jedné z nejstarších metod konzervace potravin patří sušení. Snížování obsahu vody v buňce způsobuje zpomalení jejího růstu a v případě nepřítomnosti vody se látková přeměna zastaví. Citlivé mikroorganismy při takových podmínkách odumírají. Některé složky potravin jako např. sůl, cukr, bílkoviny mohou vodu vázat natolik, že ji mikroorganismy nemohou pro svůj metabolismus využít. Koncentrace vody, kterou mohou mikroorganismy v potravine využít, je přímo úměrná parciálnímu tlaku vodní páry nad příslušnou potravinou. **Pojem aktivita vody (a_w) byl zvolen pro vyjádření míry využitelnosti vody mikroorganismy.**



Obrázek 35: Rozmezí přibližných hodnot pH umožňujících růst vybraných potravinářsky významných mikroorganismů. (Jay, 1996 – upraveno)

Aktivita vody je tedy definována jako poměr parciálního tlaku vodní páry nad potravinou (p) k parciálnímu tlaku vodní páry nad čistou vodou (p_0) při dané teplotě:

$$a_w = \frac{p}{p_0}$$

Čistá voda má $a_w = 1,0$. Pokud se množství vody dostupné pro mikroorganismy v potravine sníží, je hodnota $a_w < 1,0$. Optimální hodnota je pro většinu mikroorganismů $a_w > 0,98$. Mezi aktivitou vody a relativní vlhkostí (RV) existuje závislost vyjádřená vztahem: **RV = 100 · a_w** .

*Přístroje pro stanovení hodnot aktivity vody se nazývají **aw-metry**. Existuje mnoho typů aw-metrů pracujících na různých principech. Výsledky měření bývají k dispozici za několik minut až hodin podle typu přístroje. Jeden z nejčastěji používaných aw-metrů stanovuje hodnotu a_w na základě rozdílu parciálního tlaku vodní páry mezi vzorkem a vzduchem, k čemuž dochází v uzavřené komůrce aw-metru zvlhčováním popř. vysušováním vzorku potraviny malým objemem vzduchu, dokud není dosaženo rovnovážné vlhkosti.*

Aktivita vody má vliv na neenzymatické hnědnutí potravin, oxidaci lipidů a degradaci ve vodě rozpustných vitamínů, dále pak na enzymatické reakce v potravine a denuraci proteinů. Hodnota a_w také ovlivňuje texturní vlastnosti potraviny. Aktivitu vody lze v potravinách snížit nejen již zmíněným přidáním látek jako je **cukr, sůl, bílkoviny** nebo zvýšením obsahu **tuku**, ale především se využívají **technologické procesy** zajišťující odstranění využitelné vody z potravin (sušení, uzení, odpaření, mražení).

*Zvýšení rozpuštěných látek v roztoku (sůl, cukr, bílkoviny) vede ke zvýšení jeho **osmotického tlaku**. Také v mikrobiální buňce je osmotický tlak, neboť v buněčné šťávě je rozpuštěna řada solí a meziproductů metabolismu. Vnitrobuněčný osmotický tlak (napětí = turgor) mikroorganismů je podstatně vyšší než osmotický tlak běžných živných prostředí – **hypotonické prostředí**. Vyrovnání rozdílu osmotického tlaku mezi buňkou a prostředím a difúzi vody z prostředí do buňky a bobtnání buňky brání silná a pevná buněčná stěna. Pokud jsou mikrobiální buňky v **hypertonickém prostředí**, vyrovnává se rozdíl mezi osmotickým tlakem uvnitř buněk a v prostředí tím, že molekuly vody difundují cytoplasmatickou membránou a buněčnou stěnou z buňky do prostředí. Dosáhne-li vnitrobuněčná vodní aktivita hodnoty nižší, než je minimální hodnota pro metabolismus buňky, životní projevy buňky se zastaví. Při dalším uvolňování vody z buňky dochází k plasmolýze a zániku buňky.*

Mikroorganismy ke svému životu potřebují určité **minimální množství volné vody** v potravinách, tj. minimální a_w . Při nižších hodnotách nerostou, nemohou se pomnožovat a působit kažení potraviny, příp. tvořit toxiny. Odolnost k nízké hodnotě a_w je největší u plísní, menší u kvasinek, ještě menší u grampozitivních bakterií a nejmenší u bakterií gramnegativních. Většina bakterií způsobujících kažení potravin neroste pod hranicí $a_w = 0,91$, na rozdíl od plísní, které se mohou množit často i pod hranicí $a_w = 0,80$. Převážná část mikroorganismů není schopna růstu při a_w pod 0,60. Minimální hodnota a_w růstu ovšem není totožná s minimální hodnotou pro tvorbu toxinů.

Tabulka 6: Minimální hodnoty a_w pro růst vybraných mikroorganismů. (Görner a Valík, 2004 – upraveno)

Mikroorganismus	Minimální a_w	Mikroorganismus	Minimální a_w
<i>Pseudomonas</i> spp.	0,97	Kvasinky	0,94 – 0,87
<i>Clostridium botulinum</i> typ E	0,96	<i>Micrococcus</i> spp.	0,90
<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Shigella</i> spp. <i>Lactococcus</i> spp.,	0,95	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86
<i>Salmonella</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.	0,94	Plísně	0,93 – 0,80

Většina bakterií je schopna se rozmnožovat v živných prostředích o a_w v rozmezí 0,99 – 0,93. Výjimku tvoří některé **halotolerantní koky** (např. rody *Micrococcus*, *Staphylococcus*), které jsou schopny se rozmnožovat i při 10% koncentraci NaCl. Dále existují některé bakterie, které se rozmnožují pouze při nízkých aktivitách vody v prostředí s vysokou koncentrací

NaCl (15 % a více). Jedná se o **halofilní bakterie**. Jejich rozmnožování se naopak zastavuje při nižších koncentracích NaCl (6 – 10 %).

Minimální hodnota a_w **kvasinek** (0,94 – 0,88) je nižší než u většiny bakterií. **Osmotolerantní kvasinky** jsou schopny rozmnožování při vodní aktivitě 0,73, která je např. v medu nebo 60% roztoku sacharosu. Tyto kvasinky mohou způsobovat nežádoucí kvašení medu. **Osmofilní druhy kvasinek** rostou při hodnotách a_w 0,65 – 0,61.

Plísně se většinou rozmnožují za nižší vodní aktivity než většina bakterií a kvasinek, výjimkou jsou tzv. vodní plísně. Na druhé straně jsou známé také **xerofilní plísně** (vyžadují suché prostředí) s dolní hranicí a_w 0,60.

Tabulka 7: Hodnoty a_w u vybraných potravin. (SVÚ Olomouc, 2007)

Potravina	a_w
Párek, šunka	0,98
Lovecký salám (trvanlivý fermentovaný masný výrobek)	0,84
Vysočina (trvanlivý tepelně opracovaný masný výrobek)	0,90 – 0,93
Sádlo škvařené	0,78
Čerstvé maso	0,99
Sušené mléko nebo syrovátka	0,22 – 0,27
Slazené kondenzované mléko	0,82
Eidam	0,97
Máslo	0,98
Med	0,69

Dle hodnot a_w lze potraviny dělit na **velmi vlhké** (1,00 – 0,90), **středně vlhké** (0,90 – 0,60) a potraviny **suché** (pod 0,60).

Podle kazitelnosti a hodnot a_w je možné potraviny dělit na **lehce kazitelné** (více než 0,95), **středně kazitelné** (0,95 – 0,92) a **málo kazitelné** (pod 0,91). Nižší a_w (< 0,90) mají potraviny jako např. ovocné koncentráty, slazené kondenzované mléko, mouka, rýže, některé fermentované masné výrobky, džemy, marmelády, sušené ovoce nebo med (tabulka 7). Důležitá je ovšem vždy kombinace a_w s ostatními faktory ovlivňujícími přežívání a růst mikroorganismů v potravinách, zejména hodnotou pH.

Příkladem jsou limitní hodnoty pro Listeria monocytogenes u potravin určených k přímé spotřebě dané nařízením ES č. 2073/2005. Výrobky, které nepodporují růst L. monocytogenes, jsou z hlediska hodnot pH a a_w ty, které mají hodnoty $pH \leq 4,4$ nebo $a_w \leq 0,92$, případně výrobky s $pH \leq 5,0$ a $a_w \leq 0,94$. Dále do této kategorie patří výrobky s dobou údržnosti pod 5 dní, což je příklad problematiky související s vnějšími faktory.

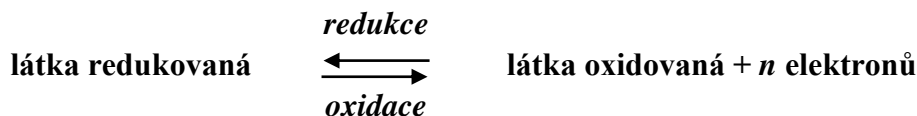
Dalším příkladem je minimální hodnota a_w pro růst Clostridium botulinum typ B. V prostředí s neutrálním pH je to $a_w = 0,95$, v prostředí s $pH = 5,5$ stoupne a_w na 0,98 a při $pH = 5,0$ je a_w až 0,997.

Podobný vliv na minimální hodnotu a_w má teplota a parciální tlak kyslíku (atmosféra). Staphylococcus aureus tvoří enterotoxin A za aerobních podmínek při 37 °C až po minimální hodnotu $a_w = 0,86$. Za anaerobních podmínek se vytváří pouze po hodnotu a_w 0,90. Při snížené inkubační teplotě 20 °C je pro tvorbu toxinu za aerobních podmínek minimální hodnota $a_w = 0,88$ a při anaerobních podmínkách je to hodnota $a_w = 0,92$.

10.1.4. Oxidačně redukční potenciál prostředí – E_h

Dalším vnitřním faktorem v potravinách, který má vliv na růst a metabolismus mikroorganismů, je redox potenciál neboli hodnota E_h . Každé prostředí vykazuje určitý oxidačně redukční potenciál, který je dán přítomností **oxidačních** (např. kyslík, dusičnany, železité ionty, peroxidy) nebo **redukčních** (např. železnaté ionty, vodík, sloučeniny s reaktivními dvojnými vazbami) činidel.

Oxidačně redukční potenciál prostředí je rozdíl potenciálu mezi platinovou (kovovou) elektrodou umístěnou do daného prostředí a standardní vodíkovou elektrodou. Oxidační proces je definován odevzdáváním elektronů, redukční proces jejich přijímáním.

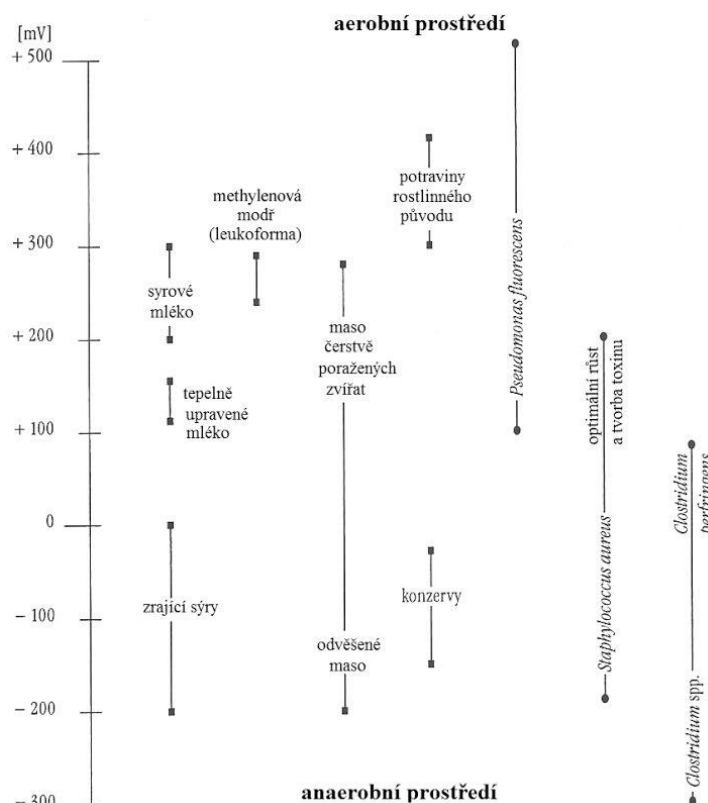


Hodnota E_h je závislá na poměru oxidovaných a redukovaných látek. Tento poměr je v potravine ve významné míře určený jejím chemickým složením a parciálním tlakem kyslíku v ní. Ke **snížení redox potenciálu** dochází např. přidáním redukujících látek (kyselina askorbová), růstem aerobních mikroorganismů, kteří spotřebovávají kyslík; vznikem vodíku a redukujících zplodin metabolismu při růstu anaerobních mikroorganismů, dále vakuovým balením, atd.

Mikroorganismy se liší svým vztahem ke kyslíku, a proto také vyžadují různý redox potenciál. **Aerobní mikroorganismy** vyžadují přítomnost rozpuštěného kyslíku a vysoké hodnoty E_h (pozitivní potenciál). To mikroorganismy **fakultativně anaerobní** tolerují pozitivní i negativní hodnoty redox potenciálu (např. *S. aureus* se množí při E_h od -200 mV do +200 mV a více, ale optimem pro růst a produkci enterotoxinů je hodnota E_h +200 mV).

Na **anaerobní mikroorganismy** působí kyslík a pozitivní oxidačně redukční potenciál škodlivě, v některých případech má i letální účinek. Při přípravě kultivačních médií pro anaeroby se proto kyslík odstraní varem nebo přidavkem redukujících látek (např. kyselina askorbová, thioglykolát sodný). Proto většina anaerobních bakterií vyžaduje pro svůj růst nízké hodnoty E_h , asi -300 mV, ale např. *Clostridium perfringens* a *C. botulinum* jsou vůči vyšším hodnotám E_h tolerantnější a mohou růst až při E_h +30 mV. Za nepřítomnosti kyslíku, který je pro klostridie toxický, rostou i při vyšších hodnotách.

E_h **syrového mléka** je obvykle v rozmezí +200 až +300 mV, tato hodnota je ovlivněna zejména množstvím rozpuštěného kyslíku. Tepelným opracováním se redoxní potenciál mléka sníží až na +120 mV, a to v důsledku denaturace bílkovin, kdy dochází k odhalení redukujících sulfhydrylových a disulfidických skupin sirných aminokyselin a vzniku dalších redukujících látek (vařivá chuť). Ke snižování E_h mléka dochází také činností bakterií – spotřebovává se kyslík a vznikají redukční zplodiny metabolismu. Hodnoty E_h u **masa** klesají po porážce z asi +250 mV během zrání masa na hodnoty -200 mV. **Potraviny rostlinného původu** (např. ovocné a zeleninové šťávy) mají vysoké hodnoty E_h (+300 až +400 mV), na jejich kažení se proto podílí především aerobní bakterie, kvasinky a plísně. **Vzdušný kyslík** udržuje difúzí aerobní podmínky a vysoký redox potenciál jen v povrchových vrstvách potravin (cca několik mm), což platí i pro tekuté výrobky. Čím hlubší je vrstva, tím nižší je redox potenciál.



Obrázek 36: Redoxní potenciál (E_h) některých potravin a optima růstu vybraných bakterií. (Görner a Valík, 2004 – upraveno)

10.1.5. Textura potravin

Povrch mnoha potravin vytváří přirozené krytí, které potravinu chrání před kontaminací mikroorganismy. Příkladem je skořápka vajec nebo ořechů, kůže na povrchu ryb a masa, vazivová pouzdra orgánů a povázky masa, kůrka na povrchu pečiva, slupky na ovoci apod.

10.1.6. Obsah přirozených antimikrobiálních látek

Některé potraviny obsahují přirozené antimikrobiální látky (biocidy), které napomáhají jejich stabilitě tím, že zabraňují růstu a množení mikroorganismů, které potravinu kontaminovaly. Známé jsou potraviny s obsahem **esenciálních olejů**. Antibakteriálně působí eugenol v hřebíčku, allicin v česneku, aldehydy a eugenol ve skořici, alylisothiokyanát v hořčici, isothymol a thymol v oreganu a další. Přirozené antimikrobiální látky se dále nachází v ovoci, zelenině (zelí, růžičková kapusta, brokolice aj.), v čajích, kde často vykazují i protiplísňovou aktivitu. **Kravné mléko** obsahuje také antimikrobiální složky zahrnující laktoferin (glykoprotein tvořící komplexy s ionty železa), laktoperoxidasový systém, lysozym a kasein. Lysozym je obsažen také ve **vejci**, spolu s ovotransferinem a avidinem.

Laktoperoxidasový systém je tvořený třemi složkami: laktoperoxidasou, thiokyanátem a peroxidem vodíku. Jeho účinnost je vyšší při 30 °C než při 4 °C. Jako ochrana čerstvě nadojeného mléka je využíván především v zemích, kde chlazení není běžné. Pasterací je systém inaktivován.

Pro bakteriální buňku je významné železo, jehož přítomnost je nezbytná pro aktivitu mnoha enzymů, ve kterých železo hraje esenciální úlohu - hemové enzymy (cytochromy, katalasa, oxidasa), oxigenasy, metaloflavoproteiny (xantindehydrogenasa). Ovotransferin vaječného bílku má schopnost vázat železo a tím působit baktericidně. Stejně působící látka – laktoferin se nachází v syrovém mléce. I když jsou si obě látky podobné v aktivitě vázání železa, imunologicky jsou to rozdílné proteiny.

*Lysozym (N-acetylhexosaminidasa) lyzuje buněčnou stěnu, konkrétně peptidoglykan, některých druhů bakterií. Má antibakteriální účinky také v inaktivované formě. Lysozomy z různých zdrojů se liší v antibakteriálním spektru a specifitě k různým druhům peptidoglykanů. Obecně jsou aktivní především vůči grampozitivním bakteriím. Rezistence gramnegativních bakterií k lysozymu je dána přítomností iontů Ca^{2+} , které udržují stabilitu vrstvy lipopolysacharidů ve vnější membráně. Teprve po jejich odstranění je murein přístupný působení lysozymu. Gramnegativní bakterie jsou k lysozymu citlivější ve spojení s EDTA. Plísňe a kvasinky jsou obecně málo citlivé. Vysoké množství lysozymu se nachází ve vaječném bílku (3000 – 5000 ppm), je přítomný i v dalších sekretech (sliny, slzy), atd. Praktické využití lysozymu v potravinářském průmyslu se omezuje na inhibici růstu mikroorganismu *Clostridium tyrobutyricum*, který způsobuje duření tvrdých sýrů.*

10.2. Vnější faktory

10.2.1. Teplota prostředí

Je to jeden z hlavních faktorů vnějšího prostředí, který ovlivňuje rychlost rozmnožování a přežívání bakterií. Každý mikroorganismus má **minimální, optimální a maximální teplotu** pro růst. Při minimální a maximální hodnotě se růst zastavuje. Minimální teplota růstu je určena tím enzymem, jehož aktivita je nejcitlivější k nízkým teplotám. Optimální teplota je obvykle asi o 30 °C vyšší než teplota minimální, maximální teplota zpravidla převyšuje optimální teplotu pouze o 5 – 10 °C. Optimální teplota pro rozmnožování se nemusí vždy shodovat s optimální teplotou pro ostatní životní procesy buňky.

Krátkodobé zvýšení teploty nad maximální teplotu vyvolává u mikroorganismů teplotní šok, který vede k různým výkyvům metabolismu. Přitom se syntetizují tzv. proteiny teplotního šoku (angl. Heat Shock Proteins – HSP), které mimo jiné chrání ostatní bílkoviny před účinkem tepla (denaturací a ztrátou prostorového uspořádání).

Rozdělení mikroorganismů podle nároků na teplotu je uvedeno v kapitole 3.3.1. (tabulka 2). Pro **psychrofilní bakterie** se optimální teplota růstu nachází v rozmezí 10 – 15 °C, u **mezofilních bakterií** je to 30 – 40 °C a u **termofilních bakterií** 55 – 65 °C. Významnou skupinou jsou v mikrobiologii potravin **psychrotrofní mikroorganismy**, které se dokáží

množit při teplotách 0 – 7 °C, přestože jejich optimální teploty růstu odpovídají obvykle mezofilním mikroorganismům.

Psychrotrofní růst vykazují nejčastěji gramnegativní tyčinky z rodu Pseudomonas, Acinetobacter, Moraxella, Aeromonas, Vibrio, Serratia, apod. Dále některé kmeny rodu Bacillus a Lactobacillus, některé enterokoky a mikrokoky. Svými psychrotrofními vlastnostmi jsou známé mnohé druhy kvasinek a plísní. Z patogenů patří mezi psychrotrofy Clostridium botulinum typ E, Yersinia enterocolitica a Listeria monocytogenes. Naštěstí je většina bakterií způsobujících onemocnění z potravin ze skupiny mezofilních mikroorganismů a důsledné dodržení chladicího řetězce zabraňuje jejich množení.

10.2.1.1. Vliv vysokých teplot

Vysoká teplota, která má smrtící účinek na mikroorganismy, je označována jako **teplota letální**. Jedná se tedy o nejnižší teplotu, při které dochází za určitý čas k usmrcení mikroorganismů. Obecně je za takovou považována teplota 70 °C působící po dobu 10 minut, což je zohledněno např. v legislativních požadavcích týkajících se tepelného opracování masných výrobků.

Vegetativní buňky mikroorganismů jsou obecně ničeny při teplotách o 10 až 15 °C vyšších než je jejich optimální teplota růstu. Všechny vegetativní buňky jsou spolehlivě zničeny při 100 °C během 10 minut. Spory bakterií jsou mnohonásobně více tepelně rezistentní než korespondující vegetativní buňky, což souvisí se stavbou spory a dehydratací centrálního protoplastu.

Bylo prokázáno, že jednou z hlavních příčin usmrcování mikroorganismů teplem je *porušení nebo dokonce zrušení aktivní semipermeability cytoplasmatické membrány* a zvýšení propustnosti pro rozpustné, koloidní i vysokomolekulární látky (dochází k jejich úniku z cytoplasmy). Současně se snižuje i halotolerance buněk. Dalším důležitým projevem je *degradace RNA* (hlavně rRNA), která sebou nese zástavu proteosyntézy, včetně syntézy enzymů a tím i zastavení metabolismu. RNA je k inaktivaci teplem mnohem vnímavější než DNA, proteiny a enzymy. *Inaktivace enzymů a denaturace proteinů* má také svůj velký význam, přestože nebývá primární příčinou usmrcování mikroorganismů. DNA je vůči tepelnému poškození rezistentní a k její denaturaci dochází až při teplotách vysoko přesahujících letální teploty.

Letální teplota je závislá nejen na druhu mikroorganismu a jeho fyziologickém stavu, ale i na koncentraci buněk v prostředí a charakteru prostředí. Čím větší je počet mikroorganismů v potravine, tím vyšší teplota nebo doba záhřevu je nutná k jejich devitalizaci. Příčinou je možnost vytváření shluků bakterií, kdy teplota uvnitř shluků je nižší a některé bakterie tak mohou přežít. Dalším důvodem je skutečnost, že mezi mnoha bakteriemi se vyskytuje více rezistentních kmenů.

Termorezistence mikroorganismů je v různých růstových fázích různá. Nejvnímavější jsou mikroorganismy ve fázi exponenciálního růstu a nejodolnější ve stacionární a lag-fázi (zejména její první polovině). Příčinou je skutečnost, že během intenzivního růstu jsou tvořící se cytoplasmatická membrána a ribosomy snadněji poškozovány. Odolnost mikroorganismů vůči vyšším teplotám souvisí s jejich *optimální teplotou růstu* (psychrofilní jsou méně odolné než mezofilní).

Termorezistence se dále zvyšuje v prostředí se sníženou a_w a *vlhkostí* (např. spory jsou ve vlhkém prostředí inaktivovány při 120 °C za 30 minut, v suchém prostředí při 180 °C za 30 minut). Nebezpečí představují tzv. suché komůrky (mikroskopické nečistoty na obalech, nápeky či usazeniny), které chrání mikroorganismy před smáčením a účinky vlhkého tepla.

Také zvýšený obsah *tuku* zvyšuje rezistenci bakterií. Důvodem je skutečnost, že tuková vrstva brání pronikání tepla a chrání tak bakterie před účinky vysokých teplot. Tuky přítomné v potravine snižují a_w . Také přítomnost vyšších mastných kyselin v prostředí zvyšuje jejich

množství v cytoplasmatické membráně, snižuje její semipermeabilitu a tím ji činí odolnější vůči teplu (např. ve vepřovém mase jsou mikroorganismy více odolné než v hovězím).

Podobně jako tuk působí i *cukry* – snižují a_w . Termorezistenci mikroorganismů zvyšují i *bílkoviny*. *Soli* působí na termorezistenci mikroorganismů rozdílně, účinek závisí na druhu a koncentraci. Dvojmocné kationty (Mg, Ca, Mn) zvyšují termorezistenci vyskytují-li se v optimálním nebo mírně zvýšeném množství, protože zvyšují podíl vázané vody, tím způsobují dehydrataci plasmatických proteinů a činí je méně vnímavé na teplo. Jednomocné kationty (Na, K) působí opačně. Mikroorganismy jsou nejvíce rezistentní k zahřátí při *neutrálním pH*. Čím více se pH od této hodnoty vzdaluje, tím více stoupá jejich citlivost k teplotě. Proto se pro devitalizaci mikroorganismů kyselé potraviny mohou zahřívát na nižší teploty než potraviny málo kyselé nebo nekyselé.

Potraviny nejsou okamžitě teplé nebo chladné, teplo jimi postupně proniká. **Přenos tepla** závisí na termálních vlastnostech potravin, tvaru obalu a na výrobních podmínkách a může se stát, že některá část produktu se nezahřeje na požadovanou teplotu. Dosažená teplota závisí na rychlosti penetrace tepla a dalších faktorech. Tekuté potraviny jsou zahřívány kratší dobu než potraviny polotuhé a tuhé. V tekutých potravinách se teplo šíří *konvekci* (prouděním), v tuhých *kondukcí* (vedením).

Tepelné opracování potravin při použití *teplot do 100 °C* je nazýváno jako **pasterace** (či běžně používaný termín **pasterizace**). Správně provedená pasterace zaručí devitalizaci patogenních mikroorganismů (v případě mléka např. *Mycobacterium tuberculosis*) a devitalizaci podstatné části saprofytické mikroflóry (vegetativních buněk), a to vše při zachování původních fyzikálních, chemických, výživových a senzorických vlastností. Pro pasterované potraviny platí, že po pasteraci obsahují nejen bakteriální spory, ale i vegetativní buňky.

Jednorázové použití *teploty nad 100 °C* označujeme jako **sterilizaci**. Sterilizaci potravin přežívají některé spory (rody *Bacillus* a *Clostridium*). V případě sterilizovaných potravin hovoříme o tzv. *obchodní sterilitě*, která není totožná s absolutní sterilitou, protože sterilizované potraviny mohou obsahovat zbytkové množství spor.

10.2.1.2. Vliv nízkých teplot

Použití nízkých teplot k ochraně potravin je založeno na faktu, že snižování teploty prostředí vede ke snižování enzymatické aktivity mikroorganismů a snížení až zastavení jejich růstu (nejdříve je zastaveno rozmnožování a teprve potom metabolismus). U řady mikroorganismů je růst zastaven při teplotě nad bodem mrazu, některé plísně mohou růst i při -5 °C a se sníženou intenzitou až do -10 °C . Jejich lag fáze je však značně dlouhá, podle teploty, vlastností substrátu a druhu mikroorganismu se pohybuje mezi několika dny, týdny až měsíci.

Chlazení potravin je technologický proces, při kterém teplota *neklesá pod 0 °C*. Délka skladování chlazených potravin závisí nejen na hodnotě teploty samotné, ale i na druhu potraviny, proudění vzduchu a jeho vlhkosti. Odolnost mikroorganismů k chladírenským teplotám ovlivňuje dostatek živin, a_w , pH. Přenesou-li se mikroorganismy v exponenciální fázi růstu z optimálních teplot do teploty kolem 0 °C , dochází k *chladovému šoku*, část mikroorganismů odumírá a část je reverzibilně poškozena. Při chlazení je k zachování dobré kvality potraviny nebo suroviny potřeba dodržet 3 základní pravidla: a) výchozí kontaminace mikroorganismy musí být co nejmenší, b) výrobek nebo surovina se musí vychladit co nejrychleji po zpracování a c) chladicí řetězec od zpracování suroviny do konzumace potraviny nesmí být přerušen.

Mrazení představuje použití teplot *pod 0 °C*. Při pomalém zmrazování buněk na teploty pod 0 °C se z vnitro- i mimobuněčné vody tvoří velké krystaly ledu, které bakteriální buňku nevratně poškozují. Naopak při rychlém zmrazování buněk na teploty -30 °C až -180 °C se

tvoří mikrokrystalky ledu, které buňky poškozují jen minimálně. Krystaly vody působí jednak mechanicky a současně snižují aktivitu vody.

Při snižování teploty je stále více vody přeměněno na led a tím dochází v buňce ke zvýšení koncentrace solí rozpuštěných ve zbývající tekutině. Vlivem zvýšeného osmotického tlaku mezi intracelulární a extracelulární tekutinou dochází k unikání vody z buňky. Čím pomalejší je mrazení a čím větší je permeabilita membrány, tím větší je ztráta vody z buňky. Pohyb vody ven z buňky způsobuje zvyšování koncentrace solí v buňce, snížení a_w a dehydrataci buňky. Zmenšuje se objem buňky a soli precipitují. Mrazení způsobuje změny v pH buněčného obsahu, výsledkem je porušení fyzikálně chemických vlastností cytoplasmy a inhibice metabolických funkcí. Dochází k poškození cytoplasmatické membrány – perforaci a denaturaci bílkovinných komponent (u eukaryot jsou podobně poškozeny i vnitřní membrány intracelulárních organel) a následně k difúzi látek z buňky. Metabolická aktivita je zpomalena a dochází k ireverzibilnímu poškození některých enzymatických systémů.

Obecně jsou k procesům mrazení **odolnější** grampozitivní bakterie než gramnegativní. Nejcitlivější k mrazení jsou buňky v exponenciální fázi růstu. Obecně platí, že při snižování teploty jsou bakterie nahrazovány plísněmi a kvasinkami. Odolnost mikroorganismů k mrazení ovlivňuje pH a ochranné látky. V případě bílkovin a peptidů se pravděpodobně tvoří vodíkové můstky s mikrobiálními proteiny a tím je chráněni před denaturací. NaCl má ve fyziologických koncentracích ochranný účinek, při vyšších koncentracích naopak zvyšuje citlivost buněk k mrazení. Skutečnost, že po rozmrazení se potraviny rychleji kazí, souvisí s poškozením živočišných i rostlinných pletiv krystaly vody. Pro zachování původních vlastností potravin je vhodné pomalé rozmrazování, při kterém dochází k resorpci rozmrazené vody do tkáně. Oproti tomu pro přežití bakteriálních buněk je nejpříznivější, pokud je rychlost rozmrazení úměrná rychlosti zmrazení (rychlé zmrazení a rychlé rozmrazení).

10.2.2. Složení atmosféry

Skladování potravin v řízené atmosféře plynů má u potravin ochranný účinek. **Vakuově balené** potraviny v obalech nepropustných pro kyslík inhibují růst aerobních mikroorganismů (např. rod *Pseudomonas*, některé druhy rodu *Bacillus*, plísně). Bez přístupu kyslíku dobře rostou anaerobní a mikroaerofilní mikroorganismy.

Balení čerstvého chlazeného masa do nepropustných fólií způsobuje v obalech snížení obsahu kyslíku. Dochází ke spotřebě kyslíku aerobními bakteriemi a procesy probíhající v masě, současně je produkován CO_2 a jeho koncentrace v obalu stoupá až na 20 – 30 %. Oba tyto mechanismy mají pozitivní vliv na trvanlivost masa (dochází k inhibici gramnegativních bakterií, které nejčastěji působí kažení baleného masa). U vakuově balených masových výrobků může při delší době trvanlivosti dojít k růstu toxigenních klostridií.

Přítomnost plynů v prostředí obklopujícím potraviny určuje dominantní typ mikroorganismů. Využívá se toho při skladování potravin v **řízené atmosféře**. Používá se CO_2 , který brání růstu aerobních mikroorganismů – plísní, kvasinek a některých bakterií. Využívá se toho zejména při skladování ovoce a zeleniny. Tento způsob není vhodný u potravin s vysokým obsahem tuku, protože má silné oxidační účinky a způsobuje žluknutí tuků.

10.2.3. Relativní vlhkost prostředí

Vysoká relativní vlhkost ovlivňuje aktivitu vody potraviny. Platí zásada, že čím vyšší je teplota, tím nižší musí být relativní vlhkost prostředí a naopak, aby se údržnost potraviny zvýšila. Potraviny s a_w pod 0,60 je nezbytné skladovat v prostředí s takovou relativní vlhkostí, která nedovolí zvýšení vlhkosti výrobku a tím i a_w do takové výše, aby došlo k pomnožení mikroorganismů.

10.2.4. Čas

Pro čas jako významný vnější faktor platí zásada, že čím delší je doba působení daných faktorů na mikroorganismy, tím výraznější je jejich účinek. Typickým příkladem je účinek vyšší teploty na inaktivaci mikroorganismů v potravinách. Čím delší je doba působení vyšší teploty, tím výraznější je výsledek v podobě vyššího počtu inaktivovaných bakterií.

10.3. Další faktory

10.3.1. Záření

O účincích záření na mikroorganismy rozhodují vlnové délky. Nejdelších vlnových délek dosahuje **infračervené záření**, které není smrtící, působí pouze svými tepelnými účinky. **Viditelné světlo** (380 – 760 nm) slouží jako zdroj energie fototrofních mikroorganismů a ovlivňuje (pozitivně i negativně) aktivitu mikroorganismů. Řada bakterií se rozmnožuje lépe za tmy, naopak pro dobrou sporulaci plísní či jejich vybarvení je potřeba světlo, také tvorba karotenoidních barviv kvasinek a bakterií je indukována světlem. **Ultrafialové záření** (UV) je málo pronikavé a má na mikroorganismy silné mutagenní a letální účinky. Vlnové délky germicidních lamp se zpravidla pohybují v oblasti 210 až 310 nm. UV světlo má přímý účinek na nukleové kyseliny a vyvolává tvorbu toxických peroxidů a ozónu.

Ionizační záření je známé svým silným letálním a mutagenním účinkem a vysokou pronikavostí. Působí indukci změn DNA. Nejcitlivější jsou gramnegativní bakterie, kvasinky a plísně jsou odolnější. Spory a vegetativní formy buněk bývají zpravidla stejně odolné. Nejúčinnější je γ -záření, jako zdroj se využívá ^{60}Co nebo ^{137}Cs . V potravinářské praxi se využívá poměrně často pro zajištění bezpečnosti a trvanlivosti koření, dále pak u sušených bylin, zeleniny, luštěnin, rýže, drůbežního masa, ryb a dalších. Jeho použití je ošetřeno legislativou (vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 133/2004 Sb. o podmínkách ozařování potravin a surovin, o nejvyšší přípustné dávce záření a o způsobu označení ozařené na obalu).

Často používaný je **mikrovlnný ohřev**. Mikrovlny působí rotaci molekul vody a „molekulárním třením“ vytváří teplo. Další teplo vzniká migrací kladných a záporných iontů solí rozpuštěných v potravine. Vzniklé teplo prostupuje výrobkem prouděním. Hloubka průniku mikrovln se mění s chemickým složením a teplotou výrobku. Část energie se odráží od povrchu výrobku, rovněž nehomogenost výrobku způsobuje rozdílný prostup tepla, takže vznikají teplá a chladná místa s velkým teplotním rozdílem. Přestup tepla je účinný hlavně u vlhkých výrobků. Mikrovlnná energie inaktivuje mikroorganismy podobně jako běžný tepelný proces, ale jeho účinnost je nižší. Důvodem je kratší doba působení tepla a vznik teplých a chladných míst ve výrobku. Proto jsou ve srovnání s konvenčním vařením nálezy mikroorganismů při mikrovlnném ohřevu vyšší.

10.3.2. Hydrostatický tlak

Mikroorganismy se většinou rozmnožují za normálního atmosférického tlaku. Zvýšením tlaku na 10 až 20 MPa se rozmnožování zpomaluje, při tlaku 30 až 40 MPa se rozmnožování zcela zastaví. Pro usmrcení je zapotřebí tlaku 600 – 700 MPa působícího po dobu minut až hodin, ale ani tyto podmínky nezajistí spolehlivě inaktivaci všech druhů mikroorganismů. Vysoký tlak narušuje syntézu buněčné stěny a způsobuje anomálie při dělení buněk, také prodlužuje lag fázi růstu. V hlubinách moří existují bakterie, které se dobře rozmnožují i při tlaku 60 MPa. Jedná se o **barofilní** či **barotolerantní** druhy mikroorganismů.

10.3.3. Elektrický proud

Střídavý elektrický proud o malé intenzitě (30 až 100 mA) nemá nepříznivý vliv na mikroorganismy. Střídavý proud o vyšší intenzitě působí nepříznivě svými tepelnými účinky. **Stejnoseměrný elektrický proud** může mikroorganismy nepříznivě ovlivňovat svými elektrolytickými účinky, kdy mohou v prostředí vznikat mikrobicidní sloučeniny.

10.3.4. Ultrazvuk

Zvukové vlny o frekvenci vyšší než 20 kHz (ultrazvuk) působí na mikroorganismy letálně tehdy, mají-li poměrně velkou intenzitu a nízký kmitočet. Jedná se o tzv. **kavitační ultrazvuk**.

Letální účinek ultrazvuku není 100%, slouží hlavně v laboratorních podmínkách k rozbití mikrobiálních buněk za účelem získání enzymů nebo jiných složek buněčné hmoty. K ultrazvuku jsou citlivé především tyčinky, koky jsou odolnější. **Nekavitační ultrazvuk**, tj. ultrazvuk o velmi vysoké frekvenci a nízkém kmitočtu nemá nepříznivý vliv na biologický materiál a používá se k lékařským diagnostickým účelům.

10.3.5. Mechanické vlivy

Díky malým rozměrům a pevné buněčné stěně jsou mikroorganismy velmi odolné mechanickým vlivům. K jejich destrukci lze použít intenzivní třepání s abrazivním materiálem (jemný písek, drcené sklo), pomalé zmrazování a rozmrazování nebo zmrazení husté suspenze buněk a její následné protlačení úzkou štěrbinou za vysokého tlaku.

11. TEORIE PŘEKÁŽEK, PREDIKTIVNÍ MIKROBIOLOGIE

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, to, jaké změny v potravinách nastanou v důsledku množení mikroorganismů, ovlivňují především fyzikálně chemické vlastnosti potravin neboli vnitřní faktory – složení potravin, aktivita vody (a_w), pH, redox potenciál (E_h) a textura. Tyto faktory jsou ve velké míře určeny technologickými procesy při zpracování potravin. Další významný vliv mají vnější faktory, neboli podmínky uchovávání a skladování potravin: vnější teplota, relativní vlhkost vzduchu, složení atmosféry v obale a čas.

11.1. Teorie překážek

Teorie překážek byla popsána jako významný koncept v produkci bezpečných, trvanlivých, nutričně bohatých, chutných a současně ekonomicky vyráběných potravin. Tato teorie je založena na inteligentním používání jednotlivých vnitřních a vnějších faktorů za účelem spolehlivé konzervace potravin.

Základní myšlenkou teorie překážek je, že ačkoliv ***samostatné působení jednotlivých faktorů není dostačující k zabránění růstu a množení mikroorganismů, které zhoršují kvalitu a bezpečnost potravin, kombinace většího počtu i méně intenzivních faktorů může potravinu dostatečně konzervovat.*** Tuto kombinaci faktorů graficky znázornil autor teorie překážek – tzv. překážkového efektu (*angl. Hurdle Effect*), německý profesor Lothar Leistner (obrázek 37). Trvanlivost a bezpečnost potravin by šla zajistit působením pouze jediného faktoru. Nevýhodou ovšem je skutečnost, že takovým postupem mohou být významně zhoršeny sensorické, biologické a nutriční vlastnosti potraviny. Využívání chemických konzervantů může navíc negativně ovlivnit zdraví konzumentů.

Přidání konzervačních látek je nezbytné tam, kde na zajištění bezpečnosti a kvality potravin nestačí použité překážky. Takto byl např. úspěšně použit bakteriocin nisin u konzervovaných broskví, kde sterilizace a nízká hodnota pH nezabraňovaly množení přeživších acidotolerantních sporotvorných klostridií.

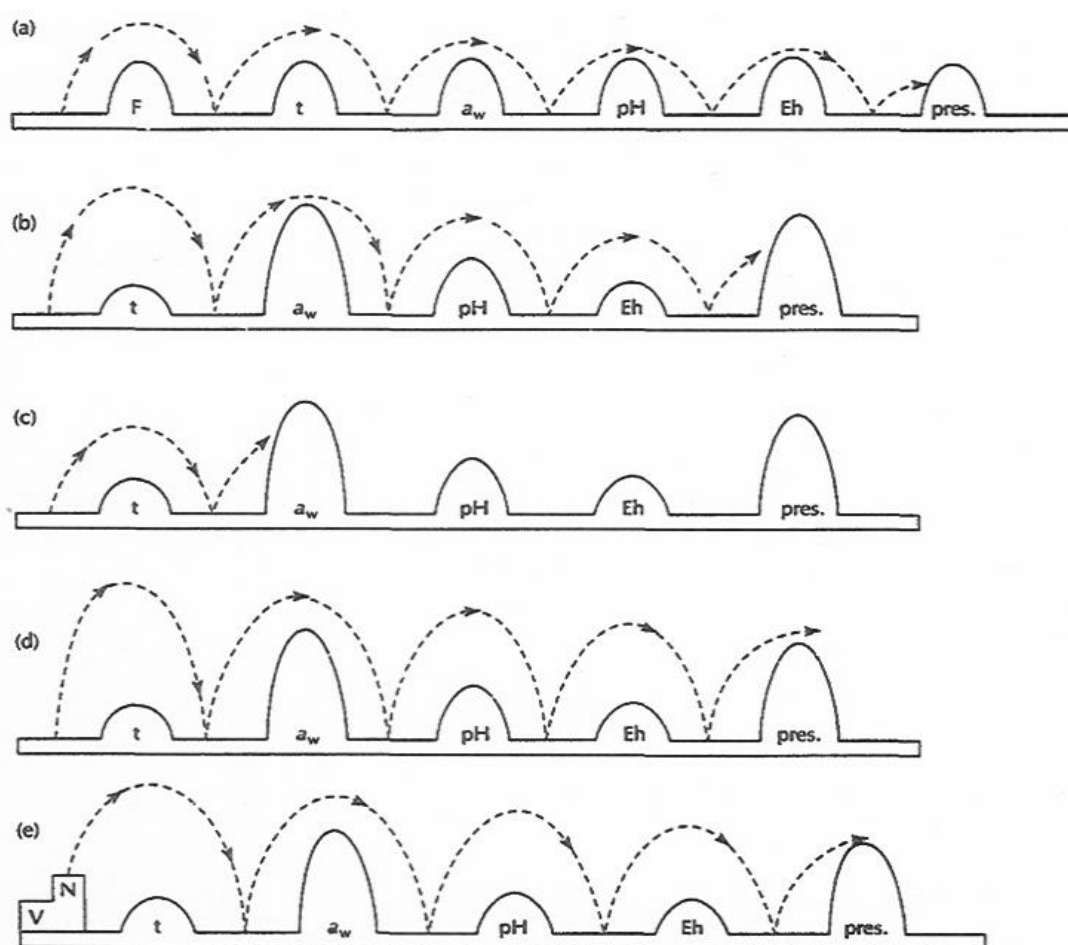
Potenciálních překážek v potravinách bylo identifikováno více než šedesát. Nejběžnějšími jsou: tepelné opracování, nízká teplota skladování, nízká aktivita vody (a_w), nízké pH, nízký redox potenciál (E_h), kompetitivní mikroflóra (např. bakterie mléčného kvašení) a konzervační látky včetně NaCl a koření. Celá řada překážek je postupně objevována a nově u mnoha potravin zkoušena, např. využití vysokého tlaku, balení v modifikované atmosféře, využití bakteriocinů a aktivní obaly.

Více inhibičních faktorů současně působí v mnoha potravinách. Použití teorie překážek lze názorně vysvětlit na příkladu výroby ***fermentovaného masného výrobku***. Významnými překážkami v počátečních fázích zráního procesu jsou ***sůl a nitráty***, které inhibují celou řadu

bakterií přítomných v jídle. Přesto se mnohé mikroorganismy mohou dále množit, spotřebovat kyslík a snižovat tak **redox potenciál** ve výrobku. Tím dochází k potlačení aerobní mikroflóry a vytvoření podmínek, které vyhovují bakteriím mléčného kvašení. Jejich množením dochází v produktu ke snížení **pH**. U déle zrajících výrobků je pak zásadní překážkou snižující se **aktivita vody**. Všechny uvedené faktory mají nižší hodnotu, než by bylo potřebné, kdyby působily pouze jednotlivě. Jejich kombinací je však spolehlivě zajištěna dostatečná trvanlivost fermentovaných masných výrobků.

Jiným příkladem je aplikace teorie překážek při výrobě italského těstovinového pokrmu – **torteliny**. Zde jsou během výroby hlavními překážkami snížení a_w a šetrné **zahřátí**, následuje využití **modifikované atmosféry** nebo využití **ethanolu** v procesu balení a **chlazení** produktu v průběhu skladování.

Obrázek 37 ilustruje situace, kdy soubor překážek nemůže být překonán („přeskočen“) patogenními bakteriemi nebo bakteriemi způsobujícími kažení potravin (vysvětlení je uvedeno pod obrázkem).



Obrázek 37: Překážkový efekt – příklady kumulativního inhibičního účinku většího počtu mikrobiálních překážek v potravině při zajištění údržnosti potravin (*F* – tepelné opracování; *t* – chlazení; a_w – snížení aktivity vody; *pH* – snížení hodnoty pH; E_h – snížení oxidoredukčního potenciálu; *pres* – konzervační látky; *V* – vitamíny; *N* – nutrienty). Výška překážky odpovídá její intenzitě (např. čím nižší pH, tím vyšší překážka). (Leistner, 1995)

Na obrázku **37a** je znázorněn příklad potraviny obsahující šest překážek: vyšší tepelné opracování, nižší teplotu skladování, nižší aktivitu vody, pH a redox potenciál a dále obsah konzervačních látek. Některé mikroorganismy mohou určité překážky překonat, ale žádné z nich nepřekonají všechny překážky použité společně. Taková potravina je stabilní

a bezpečná. Tento příklad je pouze teorií, protože u všech překážek je znázorněna stejná intenzita, což by v praxi bylo raritou. Překážky zpravidla působí různou intenzitou, jak je znázorněno na obrázku 37b. Zde jsou v potravině hlavními překážkami a_w a konzervanty. Ostatní překážky – teplota skladování, pH a redox potenciál jsou minoritní. Pokud se v potravině nachází nižší počty mikroorganismů (obrázek 37c), může pak méně překážek nebo jejich nižší intenzita zajistit bezpečnost a stabilitu potraviny. V opačném případě, při výchozích vyšších počtech mikroorganismů (např. v důsledku zhoršených hygienických podmínek při zpracování potraviny), nemusí obvyklý soubor překážek bezpečnost a jakost potraviny zajistit (obrázek 37d). Příklad uvedený na obrázku 37e ukazuje situaci v potravině bohaté na nutrienty a vitamíny. Ty mají tzv. *posilovací efekt* a umožní rychlý nárůst počtu mikroorganismů v potravině. V posledních dvou případech je tedy nezbytné přidat v potravině další překážku, případně intenzitu stávajících překážek.

11.2. Prediktivní mikrobiologie

Bakteriální vyšetření potravin je časově poměrně zdlouhavé. Tuto nevýhodu mohou nahradit systémy, které potřebu mikrobiologického zkoušení omezují díky tomu, že jsou schopné předvídat pravděpodobnost růstu mikroorganismů v dané potravině na základě hodnot určitých parametrů. To umožňuje obor tzv. prediktivní mikrobiologie, jenž využívá matematicky modelované programy, vycházející ze znalostí problematiky vnitřních a vnějších faktorů. Programy využívané v prediktivní mikrobiologii umožňují díky využití regresních rovnic předvídat pravděpodobnost růstu mikroorganismů nebo produkce toxinu v závislosti na výrobních a skladovacích podmínkách.

Vznik oboru prediktivní mikrobiologie je datován do 20. let 20. století, kdy první lineární modely popisovaly zánik bakteriálních buněk v závislosti na tepelném opracování. Tyto modely měly již tehdy široké uplatnění v potravinářském průmyslu, speciálně v konzervárenství. Dodnes jsou již tehdy používané výsledky aplikovatelné např. při výrobě konzerv s nižším pH z důvodu zajištění inaktivace Clostridium botulinum.

Každý mikroorganismus má své přesně definované nároky a pomnožuje se jen při určitých hodnotách vnitřních a vnějších faktorů. Interpretací těchto dat lze úspěšně předpovídat, zda dojde k rozvoji určitého mikroorganismu nebo k jeho inhibici, případně k produkci bakteriálních toxinů. Nejčastěji jsou programy prediktivní mikrobiologie zaměřeny na predikci růstu patogenních mikroorganismů (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *C. botulinum*, apod.). Výsledkem použití programů je vytvoření růstové křivky pro zvolenou bakterii, která je znázorněna na základě vložených konkrétních hodnot vybraných vnitřních a vnějších faktorů dané potraviny. Křivky bývají často doprovázené také údaji o délce lag-fáze či generační době. V případě modelace odumírání bakterií při tepelném opracování potravin programy poskytují termoinaktivační přímky.

Jak již bylo zmíněno, počet bakterií v potravině je ovlivňován různými faktory. Především se jedná o hodnotu počáteční kontaminace, teplotu skladování, pH, a_w , koncentraci soli, množství živin, aditivních látek, přítomnost konkurenční mikroflóry, atd. Prediktivní modely jsou zpravidla vytvořeny pro situace znázorňující možnosti různých kombinací výše uvedených faktorů. Bakterie za konkrétně definovaných podmínek mohou v potravině zvyšovat svůj počet (růst), snižovat svůj počet (odumírat) nebo jejich počet zůstává zachován (přežívání).

Volně přístupný program prediktivní mikrobiologie Pathogen Modeling Program (PMP) (<http://pmp.errc.ars.usda.gov/>) byl vyvinutý americkou organizací U.S. Department of Agriculture – Agricultural Research Service (USDA-ARC). Nabízí možnost modelovat růstovou křivku na základě zadaných vybraných vnitřních a vnějších faktorů pro různé patogenní mikroorganismy. Modely znázorňující růst (odumírání, přežívání) mikroorganismů jsou zpravidla z hlediska matrice vytvořeny pro bujon, ale někdy bývají aplikovány i na konkrétní potravinu.

Tak je tomu i v případě PMP programu. Např. růst *L. monocytogenes* je možné modelovat jak v bujonu, tak v konkrétních potravinách jako šunka, krevetový a krabí salát, uzený losos, fermentované masné výrobky, apod. Dalším z možných volně přístupných programů prediktivní mikrobiologie je program ComBase Predictor (http://modelling.combase.cc/ComBase_Predictor.aspx), vyvinutý organizací Institute of Food Research v Norwich (UK).

Programy prediktivní mikrobiologie umožňují výrobcům potravin předpovídat následky případných změn prostředí na bezpečnost a trvanlivost potravin, včetně návrhů vhodných úprav podmínek prostředí u nově vyvíjených výrobků. Dále programy umožňují objektivně stanovit podmínky technologických operací při výrobě potravin s ohledem na mikrobiologické požadavky systému Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP). Pomocí zmíněných programů je také možné odhadnout následky odchylek parametrů v procesu zpracování a uskladnění mikrobiologicky rizikových produktů.

12. VZTAHY MEZI MIKROORGANISMY

Mikroorganismy se v přírodě i v jiném prostředí vyskytují v čistých kulturách jen vzácně, obvykle tvoří společenstva různých rodů a druhů. Složení těchto společenstev je závislé na složení živin a ostatních látek a podmínkách prostředí. Jednotlivé mikroorganismy jsou v těchto společenstvích v určitém vzájemném vztahu. Tyto vztahy mohou být pro mikroorganismy *prospěšné či nikoli*.

12.1. Neutrální a pozitivní vztahy

Neutrální vztahy mezi mikroorganismy jsou relativní. Trvání, intenzita a forma vztahů závisí často na vnějších podmínkách. Proto se může např. komenzalismus změnit na parazitismus a obráceně.

V 1 gramu střevního obsahu člověka žije asi 7 miliard bakterií. Při léčbě antibiotiky se populace bakterií zredukuje. Tím přestane působit konkurenční vztah bakterií vůči plísním a kvasinkám, který je ve střevní biocenóze přirozeným regulátorem jejich rozmnožování a růstu. Plísně a kvasinky se pak mohou nadměrně rozmnožit a ohrozit zdraví člověka nemocí (mykózou). Původní komenzalismus se změnil v parazitismus. Dalším příkladem je vliv cukru obsaženého v krvi a moči pacientů nemocných cukrovkou, kdy se často mění vztahy kvasinkových a plísněných komenzálů, protože využívají cukr ve svém metabolismu a to jim umožňuje kolonizovat různé orgány a vyvolat onemocnění. Mikroorganismy s takovou schopností nazýváme oportunní neboli podmíněně patogenní.

Asi nejjednodušším typem vztahu je již zmíněný *komenzalismus* – volné sdružení mikroorganismů, které si vzájemně neškodí ani neprospívají. Dalším příkladem komenzalismu je kožní mikroflóra či mikroflóra dutiny ústní.

Velmi rozšířeným vztahem je *metabióza*, při které jsou produkty metabolismu jedné skupiny mikroorganismů postupně využívány mikroorganismy dalšími. Jinak řečeno, pokud potenciální živina může být využita pouze směsnou kulturou, hovoříme o metabióze. Typickým příkladem je *zoctovatění alkoholických nápojů* – kvasinky zkvašují cukerné substráty za vzniku ethanolu, který je za přístupu vzduchu octovými bakteriemi (*Acetobacter* spp.) rozkládán na kyselinu octovou. Ta může být následně využita plísněmi. V mléce a mléčných výrobcích může být kyselina mléčná, produkovaná bakteriemi mléčného kvašení, při dlouhém stání metabolizována plísněmi. Rozklad laktátu má za následek snížení kyselosti, čímž se vytvoří vhodné podmínky pro štěpení bílkovin mléka hnilobnými bakteriemi. Nebo může být vzniklá kyselina mléčná metabolizována propionovými bakteriemi na kyselinu propionovou. Při růstu *E. coli* a *Proteus vulgaris* v médiu obsahujícím laktosu a močovinu, *E. coli* štěpí laktosu a *P. vulgaris* močovinu. Vzniklé štěpené produkty oba mikroorganismy využívají jako zdroj uhlíku a dusíku. Metabióza umožňuje rychlou

mineralizaci organických látek v přírodě – *koloběh prvků*, využívá se jí při biologickém čištění odpadních vod či při zužitkování odpadů z kvasného průmyslu.

Mezi pozitivní vztahy patří dále *synergismus (syntrofismus)*. V tomto případě může jedna skupina mikroorganismů žít v určitém prostředí pouze za přítomnosti skupiny druhé, jejíž zástupci pro ně vytváří vhodné podmínky (např. svými extracelulárními enzymy štěpí makromolekuly či vylučují do prostředí růstové látky). Příkladem synergismu může být růst anaerobů v prostředí, z něhož aerobní mikroorganismy neustále odčerpávají kyslík nebo vzájemné vztahy v keřové kultuře. *Keřová kultura* se skládá z kvasinek a bakterií mléčného kvašení. Bakterie produkují kyseliny mléčné okyselují prostředí, kyselé pH podporuje rozvoj kvasinek, které následně produkují určité růstové látky podporující růst bakterií. Keřová kultura tvoří do jisté míry přechod od synergismu k symbióze.

Termín *symbióza* se původně používal pro všechny způsoby vzájemného soužití organismů, dnes je chápán obvykle jako oboustranně prospěšné soužití (někdy bývá používán i termín *mutualismus*). Symbiotická společenství mikroorganismů a vyšších organismů mohou mít charakter *ektosymbiózy* (mikroorganismy zůstávají vně buněk a tkání hostitele) nebo *endosymbiózy* (mikroorganismy rostou uvnitř buněk a tkání). Typickou a velmi úzkou symbiózou je soužití řas a hub vytvářejících *lišejníky*. Přísná symbióza mezi mikroorganismy je poměrně vzácná, častá je symbióza mikroorganismů s vyššími organismy (hmyzem nebo vyššími rostlinami). Dalšími příklady jsou *bachorová mikroflóra* přežvýkavců (rozklad celulózy bakteriemi na sacharidy, které jsou využitelné makroorganismem), produkce vitamínu K střevní mikroflórou člověka a živočichů, soužití hlízkových bakterií s kořeny rostlin či jogurtová kultura. *Jogurtová kultura* je tvořena laktobacily a mléčnými streptokoky. Laktobacily mají větší proteolytickou aktivitu a proto při hydrolýze bílkovin uvolňují aminokyseliny (např. valin, glycin, histidin) nezbytné pro růst streptokoků. Na druhou stranu streptokoky produkují kyselinu mravenčí, která stimuluje růst a metabolismus laktobacilů.

12.2. Negativní vztahy

Mezi mikroorganismy, které osidlují stejné prostředí a potřebují stejné živiny, můžeme pozorovat *kompetici* (soutěžení, konkurence), při které lépe adaptovaná populace může převládnout a ostatní mikroorganismy postupně vytlačit. Mezi mikroorganismy se kompetice vyskytuje velmi často. Kompetice může probíhat jednak v rámci organismů stejného druhu (tzv. *vnitrodruhová kompetice*). Velmi intenzivní vnitrodruhovou kompetici můžeme pozorovat například u biofilmů tvořených pouze jedním druhem mikroorganismu. V případě dvou (či více) druhů se stejnými požadavky na prostředí v něm nemohou žít trvale bez vzájemného omezování. Jeden z nich má zpravidla nějakou selektivně výhodnější vlastnost, takže se v konkurenci úspěšněji prosazuje a postupně vytěsňuje jiný druh. Nastává eliminace populace či jedinců s méně výhodnou vlastností. Podle tzv. *principu exkluze* je totiž nepravděpodobné, že by dva druhy využívaly prostředí přesně stejně dobře. Příkladem může být kvašení zelí, kterého se z počátku účastní různé bakterie, ale na konci bývá obvykle izolován pouze *Lactobacillus plantarum*.

Antagonismus (amenzalismus) je opakem synergismu. Je to mezi mikroorganismy velmi rozšířený vztah charakteristický tím, že jedna skupina či druh mikroorganismů působí nepříznivě na ostatní. Je způsoben rychlým využitím některých živin, změnou fyzikálně chemických vlastností prostředí (pH, E_h), nahromaděním produktů metabolismu, atd. Typický antagonismus je mezi bakteriemi mléčného kvašení a hnilobnými bakteriemi v mléčných výrobcích. Rychlá produkce kyseliny mléčné natolik sníží pH prostředí, že je pro množení hnilobných bakterií nevhodné. Podobně inhibiční účinek má kyselina mléčná na růst řady patogenních mikroorganismů. Účinný antagonismus můžeme pozorovat také mezi producenty antibiotik a citlivými mikroorganismy (tzv. *antibiosa*).

Zcela unikátním vztahem je **parazitismus**, kdy jeden mikroorganismus využívá vnitrobuněčných meziproduktů metabolismu jiného druhu a tím jej oslabuje a ničí. Mikroorganismy často vystupují jako parazité vyšších organismů – rostlin a živočichů, parazitismus mikroorganismu na jiném mikroorganismu je poměrně vzácný. Příkladem striktních parazitů mohou být bakteriofágy parazitující v bakteriálních buňkách či mykoviry napadající buňky plísní.

Pro úplnost je třeba zmínit také **predaci**, jejímž výsledkem je usmrcení a požití jednoho organismu organismem jiným. Hranice mezi parazitismem a predací není vždy zcela jasně dána. Příkladem predace může být konzumace bakterií některými druhy myxobakterií, myxomycet a některými prvky.

13. VLIV SANITACE NA MIKROORGANISMY V POTRAVINÁCH

Řada chemických látek negativně působí na životní funkce mikroorganismů. Jejich účinek může být v podstatě dvojitý – **mikrobistatický** či **mikrobicidní**. V prvním případě dochází k reverzibilní (vratné) blokaci funkce makromolekul, zejména bílkovin a nukleových kyselin. Ve druhém případě se jedná o ireverzibilní, tj. nevratnou a neopravitelnou destrukci některých buněčných komponent.

Používání chemických látek k likvidaci bakterií a dalších mikroorganismů má dlouhou tradici. Obecně rozlišujeme dva základní postupy: desinfekci a sterilizaci. **Desinfekce** je zaměřena zejména na likvidaci bezprostředně nebezpečných patogenních mikroorganismů, nemusí při ní však dojít k absolutní devitalizaci všech přítomných vegetativních buněk či spor. Oproti tomu **sterilizace** zajišťuje úplnou devitalizaci všech živých mikroorganismů včetně spor.

Sanitace je soubor činností, který má v potravinářství zcela nezastupitelnou roli. V užším smyslu zahrnuje sanitace dva na sebe navazující postupy – důkladnou *mechanickou očistu* (odstranění nečistot a zbytků organického materiálu) a následnou *desinfekci* očištěného povrchu (odstranění mikroorganismů).

Neexistuje žádný univerzální postup odstraňování mikroorganismů vhodný pro všechny situace. Jeho volba závisí nejen na očekávaném účinku, ale také na typu potravinářského provozu, kde jej budeme používat (použité materiály, přístupnost čištěných ploch, druh organického znečištění, předpokládaná úroveň kontaminace povrchů mikroorganismy, pravděpodobnost tvorby biofilmů, atd.). Významnou roli hraje také dodržování koncentrace sanitačních prostředků, jejich teplota a doba působení. Kontakt účinné látky s čištěným povrchem zajišťuje vhodná forma aplikace sanitačních prostředků – pěna, gel nebo tenký film na povrchu.

Chemické sanitační prostředky používané v potravinářství nesmí nepříznivě ovlivňovat sensorické vlastnosti potravin (zejména chuť), výrobní prostory (např. zápachem) a zdraví pracovníků či konzumentů a dále poškozovat výrobní zařízení. Vhodné jsou prostředky s co nejširším spektrem účinku. Používají se jak anorganické, tak organické látky. Každý výrobce potravin musí provádět kontrolní testy účinnosti sanitačních prostředků např. vyšetřováním stěrů, otisků nebo spadů z prostředí. V praxi se pro rychlé testování účinnosti čištění a desinfekce využívá metoda ATP bioluminiscence. Vzhledem ke schopnosti mikroorganismů přizpůsobit se danému prostředí je vhodné v určitém časovém intervalu sanitační prostředky obměňovat.

13.1. Mechanismy účinku desinfekčních látek

Desinfekční látky působí především na enzymatický systém buněk, a to jak v buněčné stěně, tak i v cytoplasmatické membráně a v cytoplasmě buněk. **Buněčná stěna** je prvním terčem působení desinfekčních látek. Poškození buněčné stěny vede k nekontrolované činnosti lytických enzymů, následnému vyloučení rozpustných látek z buňky a k její smrti. Takovým způsobem působí např. povrchově aktivní látky.

V **cytoplasmatické membráně** způsobují desinfekční prostředky indukci difuze nízkomolekulárních látek z buňky (aminokyseliny, puriny, pyrimidiny, kationty), dále inhibici membránových enzymů (např. adenosintrifosfatasy) a oslabení membránové elektrochemické potenciálové struktury vypuzením H iontů během metabolismu.

V **cytoplasmě** jsou důležité struktury jako ribosomy, DNA, RNA a enzymy, které mohou být vysokými koncentracemi desinfekčních látek nevratně poškozeny. Poškození oxidačních a hydrolytických enzymů vede k porušení oxidativních procesů v buňce a k jejímu uhynutí.

Vlastní **mechanismus desinfekčního účinku** může být různý, nejčastěji se jedná o oxidace (oxidační činidla, halogeny – chlorové preparáty), hydrolyzu (silné kyseliny a alkalie), tvorba solí s bílkovinami (těžké kovy, halogeny – jodové preparáty), koagulaci bílkovin (těžké kovy, fenoly, aldehydy, alkoholy), změnu permeability membrán (kvarterní amoniové soli) či poškození (inaktivaci) enzymatického systému (těžké kovy, aldehydy, fenoly).

13.2. Základní skupiny desinfekčních látek

Jednotlivé desinfekční látky se používají buď samostatně, nebo ve formě kombinovaných desinfekčních přípravků, u nichž se využívá synergického působení různých chemických látek.

Například dezinfekční prostředky na bázi aktivního kyslíku (peroxidu vodíku) se mohou využít nejen pro svou biocidní účinnost, ale i pro svou silnou oxidační schopnost, kdy se kontrolovaným smícháním s alkalickým produktem dosáhne zesíleného čistícího účinku. Výsledkem je možnost použití chladnější vody při čištění oproti běžným alkalickým prostředkům. Nedochozí k zahřívání čištěných potravinářských prostor a není nutné vydávat velké množství energie na jejich opětovné zchlazení.

13.2.1. Kyseliny a zásady

Silné zásady velmi dobře pronikají organickým materiálem (zmýdelňují tuky, z bílkovin tvoří rozpustné albumináty) a mají široké spektrum účinnosti (devitalizují všechny mikroorganismy včetně virů a spor). Nejdůležitějším faktorem mikrobicidního účinku alkálií je aktivita hydroxylových iontů, které destrukují buněčné struktury mikrobiálních buněk. Nevýhodou je velká žíravost a korozivní účinek. Využití nachází alkalické prostředky zejména v provozech s velkým výskytem organických nečistot (tuky, bílkoviny). Mezi nejpoužívanější silné zásady patří NaOH a KOH (zemědělská prvovýroba, sanitace technologického zařízení v mlékárnách či masozpracujících závodech, dezinfekce skleněných obalů, atd.). K desinfekci stěn, kvasných kádí a dalších povrchů se často používá hašené vápno ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Další zásadité látky (např. uhličitan sodný Na_2CO_3 , fosforečnan sodný Na_3PO_4 či polyfosfáty) se často přidávají do horkých mycích roztoků, kde napomáhají uvolňování zbytků tuků a bílkovin. V souvislosti s eutrofizací povrchových vod jsou v současné době fosfáty a polyfosfáty nahrazovány metasilikáty.

V minulosti se v masozpracujících provozech používal především hydroxid sodný, který se rozpouštěl ve vodě nebo se jím posypávaly povrchy, které se následně drhly kartáči. Vnitřní povrchy udíren se myly speciálním práškovým přípravkem na bázi hydroxidu sodného a metakřemičitanu (přípravek Radikon), který se přidával i do mycí lázně v myčkách beden a loden. Nevýhodou uvedených preparátů byla časová a fyzická náročnost a agresivní působení základních chemikálií na povrchy nádob a chemikálií. V současnosti patří v masném

průmyslu k nejčastěji používaným čistícím a desinfekčním prostředkům alkalické přípravky s dezinfekcí na bázi chloru.

Velmi silný mikrobicidní účinek mají **silné kyseliny** (H_2SO_4 , H_3PO_4 , HNO_3), které poškozují buněčnou stěnu a cytoplasmatickou membránu mikrobiálních buněk. Na rozdíl od louhů však v prostředí zatíženém organickými látkami nemusí působit dostatečně spolehlivě (způsobují koagulaci bílkovin a vznik pevných koagulátů). Nevýhodou je jejich leptavost, silný korozivní účinek a dráždivost. Silné kyseliny účinkují na mikroorganismy jednak svým pH a jednak činností nedisociovaných molekul, přičemž mikrobicidní vlastnosti vysoce disociovaných kyselin jsou v přímé korelaci s pH. V dostatečné koncentraci jsou schopné rychle zničit veškeré formy života. V potravinářském průmyslu se produkty na bázi kyselin využívají zejména v provozech s častým používáním vody (např. masozpracující průmysl, mlékárny) při odstraňování minerálních usazenin a povlaků.

Při čištění pastéru se v mlékárenských provozech běžně používá 1 – 1,5% NaOH při teplotě 70 – 75 °C po dobu 30-40 minut. Po oplachu vodou následuje kyselé čištění roztokem 0,5 – 0,75% HNO_3 při teplotě 60 – 65 °C po dobu 20 – 30 minut. Před každým začátkem provozu pastéru se k dezinfekci dále použije chlornan sodný.

Organické kyseliny se používají v potravinářství jednak jako **konzervační prostředky**. Vhodná je např. kyselina benzoová a její deriváty, které mají baktericidní účinek. Jejich účinnost se zvyšuje v kyselém prostředí, protože díky potlačené disociaci lépe difundují cytoplasmatickou membránou. Protiplísňovou aktivitu má kyselina sorbová či mravenčí (ta účinkuje také proti kvasinkám). V masném průmyslu se často používá k postřiku povrchu jatečně opracovaných těl kyselina mléčná.

Velmi silné baktericidní a fungicidní účinky mají **perkyseliny** (peroxokyseliny) – kyselina permravenčí, peroctová (přípravek Persteril) či perpropionová, které se často využívají ve zdravotnictví či v mikrobiologických laboratořích. Plošnému použití v potravinářství brání zejména jejich silné korozivní účinky.

V příslušných koncentracích je možné kyselinu octovou a peroxidy nebo i chlorové preparáty použít na desinfekci povrchů ovoce a zeleniny. Podle některých odborníků je ovšem vhodnější upřednostnit dvojité mytí a vyhnout se tak použití desinfekce.

13.2.2. Oxidy

Jako slabá kyselina působí v kyselém prostředí **oxid siřičitý**, který jako konzervační látka brání kažení potravin a zamezuje růstu plísní a bakterií. U sušeného ovoce navíc příznivě ovlivňuje jeho zbarvení a konzistenci. Používá se zejména ve vinařství a konzervárenství k síření ovocných a vinných polotovarů (např. sušené ovoce), sudů na víno, sklepů, atd.

Oxid uhličitý potlačuje ve vysokých koncentracích rozmnožování mikroorganismů, proto se používá např. k uchovávání ovocných šťáv v tancích za sklepních teplot (15 °C). Působí také na dozrávání ovoce.

13.2.3. Halogeny

Mezi nejrozšířenější desinfekční prostředky patří halogeny, zejména ty obsahující chlor. Mechanismus účinku halogenů je založen zejména na oxidačních procesech, bývají proto někdy řazeny také mezi oxidační činidla. Halogenové preparáty se vyznačují rychlým účinkem, jejich účinnost však snižuje přítomnost organických látek. Mimo sloučenin chloru a jodu, se využívají také deriváty bromu a fluoru, které mají silný antimykotický účinek.

13.2.3.1. Chlorové preparáty

Aktivní složkou chlorových preparátů je *kyselina chlorná* (HClO), jejímž rozkladem vzniká volný atomární kyslík. **Plynný chlor** se plošně používá k desinfekci pitné vody, ve vyšších

dávkách i k desinfekci vod odpadních (po smíchání s vodou vzniká kyselina chlorovodíková a již zmíněná kyselina chlorná).

Druhou skupinu představují **chlornany**, jedná se o velmi levné desinfekční látky používané zejména k hrubé desinfekci. K desinfekci podlah ve stájích, potravinářských provozech či skladovacích ploch se používá chlorové vápno (směs chlornanu vápenatého, chloridu vápenatého a hydroxidu vápenatého). Další možností je chlornan sodný (přípravek SAVO) běžně používaný i v domácnostech.

Často používané jsou také **chloraminy** (např. Chloramin B – benzenchloramin), které mají v porovnání s chlorovým vápnem a chlornany sice pomalejší účinek, jsou však méně agresivní a stálejší. Chloraminy jsou univerzální desinfekční prostředky používané samostatně nebo ve směsných čisticích prostředcích. Mimo zdravotnictví, nachází široké uplatnění také v potravinářském průmyslu (např. mlékárny, masozpracující závody).

V minulosti byl práškový chloramin používán jako hlavní desinfekční prostředek v masném průmyslu. Rozpouštěl se ve vodě a pak se jím pomocí zahradních konví kropily povrchy. V dnešní době jsou nejpoužívanějšími čisticími a desinfekčními prostředky v masozpracujících provozech preparáty na bázi chloru kombinované s alkalickými produkty.

K desinfekci podlah, provozních zařízení, k praní surovin či desinfekci pitných a provozních vod lze využít také **oxid chloričitý** (ClO_2 ; žlutozelený, ostře páchnoucí plyn rozpustný ve vodě), který způsobuje oxidační poškození cytoplasmatické membrány buněk mikroorganismů. Na rozdíl od chloru a chlornanů je nestálý, ale nemá sníženou antimikrobiální aktivitu za vysokého pH a vyšší přítomnosti organických látek.

13.2.3.2. Jodové preparáty

Jod má dobré mikrobicidní účinky, působí přímo na buněčné bílkoviny. Nevýhodou je jeho špatná rozpustnost ve vodě. **Anorganické jodové přípravky** (jodová tinktura – alkoholový roztok jodu a jodidu draselného) se běžně využívají k povrchové desinfekci kůže. Z organických sloučenin se využívají zejména **jodofory**, ve kterých je jod vázán na vysokomolekulární povrchově aktivní látky. Jako antiseptikum se používá v humánní praxi např. Jodonal B (nástroje a pomůcky) či Betadine, ve veterinární praxi potom Jodonal M, který je určen k ošetření struků a vemene po dojení jako prevence mastitid.

Jód v přípravku Jodonal M reaguje s poslední kapičkou mléka ve strukovém kanálku a ihned vytváří mazovou zátku, neprůchodnou pro nežádoucí mikroorganismy. Po ukončení dojení se struky ihned ošetří ponořením do nádoby s 20% roztokem Jodonalu M po dobu 1 – 2 sekund a pak se opláchnou vlažnou pitnou vodou.

13.2.4. Oxidační činidla

Účinek oxidačních činidel spočívá v jejich schopnosti odštěpovat **atomární kyslík** (tzv. kyslík ve stavu zrodu), který velmi rychle oxiduje organické látky (porušuje molekulární vazby a tím pravděpodobně nevratně inaktivuje enzymy). Obvykle se jedná o velmi účinné prostředky se širokým spektrem účinku (včetně spor a neobalených virů). Na druhou stranu jejich účinek výrazně snižuje přítomnost bílkovin. Z toho důvodu je nezbytné používat je čerstvé a v dostatečném objemu.

Mezi významná oxidační činidla patří již zmíněné peroxokyseliny (viz kapitola 13.2.1.) a halogeny (viz kapitola 13.2.3.). Ve vodárenských provozech lze k desinfekci pitné vody využít **ozon**, který má silné baktericidní účinky, je však dráždivý a ve vodě způsobuje korozi. Ozon se využívá také k dezodorizaci vzduchu v chladírnách masa a prodejnách masa a ryb. Poměrně velké využití má v potravinářství **peroxid vodíku**, který se používá např. k desinfekci korunkových uzávěrů či různých plastových obalů (H_2O_2 o koncentraci 30 %), či v sýrařství (H_2O_2 o koncentraci 5 až 10 %), kde účinkuje proti klostridiím.

13.2.5. Alkylační činidla a cyklické sloučeniny

Z alkylačních činidel má největší význam *ethylenoxid*, který se používá v plynné formě ke sterilaci obalů, plastových Petriho misek, léků a koření. Jedná se o jedovatý, mutagenní a výbušný plyn, proto pro manipulaci s ním platí přísná bezpečnostní opatření a jeho zbytky musí být z ošetřeného materiálu zcela odstraněny. Použití *formaldehydu* je z hygienických důvodů v potravinářské praxi zakázáno, místo něj se využívá např. *glutaraldehyd*, který má podobný účinek, ale netvoří dráždivé páry.

Mezi klasické desinfekční prostředky patří *fenol a kresoly*, které jsou však pro svůj pronikavý zápach pro použití v potravinářství zcela nevhodné. Své uplatnění nachází ve zdravotnictví. V potravinářském průmyslu se z cyklických sloučenin využívá jako součást mycích vod např. *pentachlorfenolát*, který má vyšší baktericidní účinek než fenol, je dobře rozpustný ve vodě a nezapáchá.

13.2.6. Alkoholy

Alkoholy koagulují ve vyšší koncentraci bílkoviny a současně odvodňují buňku. Jejich desinfekční účinek je malý, k jeho zajištění je potřeba přítomnost vody. Z tohoto důvodu jsou alkoholy neúčinnější v 70% roztoku, koncentrovaný ethanol mikroorganismy spíše konzervuje. Na spory alkoholy prakticky nepůsobí. *Ethanol* je často součástí kombinovaných desinfekčních prostředků, kde zesiluje účinek jiných látek, běžně se používá k desinfekci rukou. Podobně je tomu i v případě *propanolu*. *Glykoly* se používají v aerosolech k desinfekci vzduchu.

13.2.7. Sloučeniny těžkých kovů

Pro těžké kovy je charakteristický tzv. *oligodynamický účinek*, kdy jejich ionty přecházejí v nepatrném množství do roztoku a působí bakteriostaticky až baktericidně. Obvykle účinkují lépe na gramnegativní než na grampozitivní bakterie, na spory a viry nepůsobí, účinek proti plísním je různý. V nižších koncentracích inaktivují enzymy vazbou na sulfhydrylové skupiny, ve vyšších koagulují bílkoviny. Přítomnost organických látek a nižší teplota jejich účinek snižuje. Nevýhodou je jejich toxicita a korozivní účinek.

Soli *olova a rtuti* mají sice silné antimikrobiální účinky, v potravinářství se však pro svoji jedovatost nesmí používat. *Stříbro* a jeho sloučeniny (komplexní chlorid sodnostříbrný – přípravek Sagen) se používají k desinfekci vody ve studních, mycích vod, atd. Působí hlavně na vegetativní formy bakterií.

Sagen je znám jako desinfekční přípravek k jednorázovému zabezpečení individuálních zdrojů pitné vody při náhodném mikrobiálním znečištění. Tento přípravek není určen k průběžné desinfekci, četnost jeho aplikace by měla být maximálně 2x do roka. Výrobek obsahuje 98,7 % kuchyňské soli (NaCl) jako plnidla a 1,3 % dusičnanu stříbrného (AgNO₃) jako účinné baktericidní přísady.

Používané jsou také preparáty na bázi *mědi*. Silné baktericidní i fungicidní účinky má *síran měďnatý* (modrá skalice), který současně inhibičně působí také na řasy, ale prakticky neúčinkuje na bakteriální spory. Využívá se např. k potlačení růstu řas v bazénech, dále v sadařství či vinohradnictví, použití v potravinářství je omezené, protože měď nesmí být v potravinách přítomna. Pro svůj protiplísňový účinek se často využívají *organoměďnaté sloučeniny*, zejména k ošetření výrobků (např. tkanin) určených do tropů (tzv. tropikalizace výrobků).

Silný antifungální účinek mají i *organocínité sloučeniny* (přípravky řady Lastanox), často kombinované s kationaktivními tenzidy, které se používají do nátěrů, omítek, atd. Pro svoji jedovatost se v potravinářství mohou používat pouze tam, kde je vyloučena případná kontaminace výrobků.

13.2.8. Povrchově aktivní látky

Povrchově aktivní látky (tenzidy) mají schopnost snižovat povrchové napětí rozpouštědla. Detergenty – tj. mýdla a saponáty, se běžně používají jako prací a čisticí prostředky. Desinfekční účinek mají pouze kationaktivní tenzidy, zejména kvartérní amoniové soli.

Tenzidy se podle iontového charakteru hydrofilní (tj. polární) skupiny dělí na ionogenní a neionogenní. Ionogenní tenzidy mohou být anionaktivní (ve vodném prostředí mají záporný náboj), kationaktivní (ve vodném prostředí mají kladný náboj) či amfolytické (podle pH vodného prostředí mají kladný či záporný náboj).

Kvartérní amoniové soli (preparáty Ajatin, Septonex) způsobují narušení buněčné stěny a cytoplasmatické membrány buněk a tím ztrátu osmotické rovnováhy mezi buňkou a prostředím, což vede k poklesu koncentrace složek buňky, jež jsou důležité pro metabolismus. Jejich výhodou je nízká toxicita a dobrá pronikavost do štěrbin. Současně mají i mycí (detergentní) účinek a nezapáchají. Omezením je velmi úzké spektrum účinku, dobře působí pouze na grampozitivní bakterie a většinu plísní.

14. INDIKÁTOROVÉ MIKROORGANISMY

Pravidelné mikrobiologické vyšetřování potravin je nezbytné pro kontrolu správnosti provádění technologických postupů, ověření trvanlivosti potravin a zajištění jejich bezpečnosti. Mikroflóra potravin se mění v průběhu výroby, zpracování, distribuce, skladování a prodeje jak po kvalitativní, tak po kvantitativní stránce. V běžné praxi však nelze vyšetřovat potraviny z hlediska výskytu všech nežádoucích mikroorganismů. Proto byly vytipovány vybrané druhy, rody a skupiny bakterií a jejich počty v potravinách informují o mikrobiologické „situaci“ v potravině nebo ve výrobních zařízeních. Tyto mikroorganismy a jejich množství v potravině jsou nazývány jako **indikátorové mikroorganismy** a **indikátorové limity**.

Stanovení indikátorových mikroorganismů v potravinách, surovinách, obalech nebo výrobních zařízeních či prostorách poskytuje důležité informace o mikrobiální kvalitě testovaných vzorků a s tím související údržnosti a bezpečnosti potravin. Výsledky takových vyšetření jsou odrazem úrovně hygieny a sanitace potravinářských provozů a ukazují na možnou fekální kontaminaci potravin. Přítomnost indikátorových mikroorganismů v potravinách (zvláště jejich vyšších počtů) může ukazovat na sekundární kontaminaci nebo nedostatky v technologii výroby potravin (nedostatečné tepelné opracování, přerušení chladírenského řetězce, apod.), případně informovat o probíhajícímu kažení potravin.

Na možnou přítomnost choroboplodných zárodků v potravině nebo vodě upozorňují tzv. **indexové mikroorganismy**. Například výskyt *E. coli* v pitné vodě upozorňuje na potenciální přítomnost *Salmonella Typhi* nebo jiných závažných střevních patogenů. *E. coli* je v tomto případě nazývána jako indexový mikroorganismus. Dalším příkladem indexových mikroorganismů jsou koliformní termotolerantní mikroorganismy stanovované jak v potravinách, tak v pitné vodě.

Indikátorové mikroorganismy, které informují o **primární nebo sekundární kontaminaci** surovin, potravin, obalů a ploch přicházejících do styku s potravinami a o dodržování zásad správné výrobní a hygienické praxe při výrobě a zpracování potravin jsou:

- celkový počet mikroorganismů (CPM),
- počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*,
- počet enterokoků,
- počet psychrotrofních bakterií,
- počet termorezistentních a počet termofilních bakterií.

Indikátorové mikroorganismy, které informují především o **kažení potravin**, jsou:

- počet kvasinek a plísní,
- počet aerobních sporotvorných bakterií,
- počet anaerobních sporotvorných bakterií,
- počet proteolytických bakterií,
- bakterie rodu *Proteus*, ale také CPM, počty bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, psychrotrofních a koliformních bakterií.

Velkou výhodou analýz prováděných za účelem stanovení indikátorových (indexových) mikroorganismů je jejich rychlost, jednoduchost a finanční nenáročnost. Většinou se používají běžně dostupné plotnové metody. V praxi bývají v potravinách nejčastěji stanovovány ty indikátorové mikroorganismy, které ukazují na bezpečnost potravin a účinné provádění sanitace. Požadavky na jejich vlastnosti jsou následující: rychlá a jednoduchá detekce, snadná rozpoznatelnost od jiných mikroorganismů, musí mít prokazatelný vztah k patogenním mikroorganismům, jejichž výskyt mají indikovat, musí být v potravině přítomné vždy, když je v nich daný patogen prokázán, jejich počet by měl korelovat s počty přítomných patogenů, požadavky na růst a množení je shodný s nároky daného patogenu, ale v potravině by měly mít schopnost přežívat déle než patogen, v případě nepřítomnosti daného patogenního mikroorganismu by se v potravině také neměly vyskytovat, případně pouze v minimálním množství.

V minulosti se při volbě indikátorů bezpečnosti potravin vycházelo z předpokladu, že patogenní mikroorganismy v potravině a vodě jsou střevního původu. Průkaz kontaminace potravin **fekální mikroflórou** tedy znamenal možnost výskytu patogenních mikroorganismů. Prvním indikátorem fekální kontaminace byla *Escherichia coli*. V současnosti se nejčastěji jako indikátorových mikroorganismů prokazujících fekální kontaminaci potravin dále využívá stanovení koliformních bakterií, bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* nebo enterokoků. Kromě výše uvedených požadavků na indikátorové mikroorganismy musí mít tyto skupiny mikroorganismů specifický výskyt ve střevním prostředí, jejich počty ve feces musí dosahovat vysokých hodnot, měly by vykazovat rezistenci v případě výskytu mimo střevní prostředí a jejich detekce by měla být jednoduchá a spolehlivá i v případě přítomnosti jejich nižších počtů ve vyšetřovaných vzorcích.

Detailní postupy stanovení vybraných skupin indikátorových mikroorganismů a jejich charakteristiku uvádí skripta Mikrobiologie potravin – praktická cvičení II. Metody stanovení mikroorganismů v potravinách.

Následující přehled a charakteristika jednotlivých indikátorových mikroorganismů je zaměřen na ty, jejichž stanovení je v praxi využíváno nejčastěji a jejichž výskyt v potravinách je limitován legislativou případně doporučen normativními předpisy.

14.1. Celkový počet mikroorganismů

Pod pojmem celkový počet mikroorganismů (CPM) se rozumí počty mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů, které rostou v neselektivních nutričně bohatých médiích za aerobních podmínek během inkubace při 30 °C po dobu 72 hodin. Nastavené podmínky inkubace samozřejmě neumožní nárůst absolutně všech mikroorganismů přítomných v potravině, ale pouze většiny z nich, a to poskytuje cenné informace o stupni znečištění vzorků. Stanovení CPM má tedy význam nejen z pohledu hodnocení kontaminace surovin, výrobků a prostředí výroby, ale i dodržování technologických postupů v procesu zpracování potravin. Toto stanovení nemá význam u potravin, při jejichž výrobě byly použity technologické mikrobiální kultury.

Nejčastěji se pro stanovení CPM používají **plotnové metody**, kdy výsledkem je stanovení počtu KTJ v 1 ml nebo 1 g potravin, přičemž 1 kolonie představuje potomstvo jedné

mikrobiální buňky. Jako arbitrážní půda je určen **agar s glukosou, tryptonem a kvasničním extraktem** (GTK agar). Při hodnocení výsledků se počítají narostlé kolonie všech tvarů, barev a velikostí. Ke stanovení počtu mikroorganismů (nikoli kolonií) v 1 g (ml) lze využít **mikroskopické metody** (např. přímé počítání buněk mikroorganismů, průtoková cytometrie) nebo **metodu MPN (Most Probable Number)**.

Nařízení Komise (ES) č. 2073/2000 stanovuje maximální limity pro počty kolonií aerobních mikroorganismů (CPM) u jatečně upravených těl po úpravě, ale před chlazením (prasata: $10^4 - 10^5$ KTJ.cm⁻², skot: $3,2 \cdot 10^3 - 10^5$ KTJ.cm⁻²), mleté maso a strojně oddělené maso ($5 \cdot 10^5 - 5 \cdot 10^6$ KTJ.g⁻¹). Doporučené maximální limity CPM pro celou řadu potravin mohou provozovatelé potravinářských podniků čerpat z ČSN 56 9609 Pravidla správné hygienické praxe – Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace, a tyto limity použít jako jeden z ověřovacích postupů v systémech HACCP. U pitné vody jsou limity počtu mikroorganismů při 36 °C a 22 °C legislativně stanoveny podle zdroje pitné vody (vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 252/2004 Sb., ve znění pozdějších předpisů).

14.2. Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*

Do čeledi *Enterobacteriaceae* řadíme aerobní a fakultativně anaerobní gramnegativní rovné tyčinky fermentující glukosu s tvorbou kyseliny a plynu a vykazující negativní oxidasovou reakci. Jako arbitrážní půda je určen **agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi a glukosou** (VČŽG agar), kde vytváří po inkubaci při 37 °C za 24 hodin fialově červené kolonie, které mohou být obklopené růžovou zónou precipitované žluče. Na základě schopnosti fermentovat laktosu rozeznáváme laktosapozitivní (koliformní bakterie) a laktosanegativní druhy (např. salmonely, shigely).

Primárním místem výskytu je trávicí trakt člověka a teplokrevných živočichů. Jednotlivé skupiny a druhy mikroorganismů č. *Enterobacteriaceae* mají rozdílný **indikátorový a indexový význam**. Některé jsou indikátory bezpečnosti potravin a pitné vody, jiné zase indikují kažení potravin. Do této čeledi náleží jak nepatogenní, tak podmíněně patogenní i primárně patogenní rody a druhy. Mezi **patogeny** patří např. rody *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* a dále patogenní sérotypy *E. coli* nebo *Cronobacter sakazakii*. Tyto bakterie jsou součástí střevní mikroflóry pouze příležitostně, a to u osob s onemocněním způsobeným jmenovanými původci nebo u bacilonosičů.

Vzhledem ke schopnosti bakterií č. *Enterobacteriaceae* přizpůsobit se vnějším podmínkám mimo zažívací trakt a zde přežívat, nemůže být jejich výskyt v potravinách, výrobním zařízení nebo v pitné vodě vždy jednoznačně chápán jako důsledek přímého znečištění fekáliemi. V rámci této čeledi se vyskytuje celá řada v potravinách nežádoucích **technologicky škodlivých** mikroorganismů – např. psychrotrofní bakterie s proteolytickou a lipolytickou aktivitou (rody *Proteus*, *Serratia* aj.).

*Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 doporučuje sledování bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* ve výrobním prostředí i v konečném produktu. *Enterobacteriaceae* mají být použity jako indikátory rizika a v případě jejich přítomnosti lze zahájit vyšetření na specifické patogenní mikroorganismy. Konkrétní maximální limity pak nařízení stanovuje pro jatečně upravená těla po úpravě, ale před chlazením (prasata: $10^2 - 10^3$ KTJ.cm⁻², skot: $3,2 \cdot 10^1 - 3,2 \cdot 10^2$ KTJ.cm⁻²), pasterizované mléko a pasterizované tekuté mléčné výrobky, sušené mléko a sušenou syrovátku (10^1 KTJ.ml⁻¹), zmrzlinu s mléčnou složkou a vaječné výrobky ($10^1 - 10^2$ KTJ.g⁻¹), a také sušenou počáteční a pokračovací kojeneckou výživu (nepřítomnost v 10 g).*

14.3. Koliformní bakterie

Koliformní bakterie jsou aerobní a fakultativně anaerobní gramnegativní nesporulující tyčinky z čeledi *Enterobacteriaceae* zkvašující laktosu s tvorbou kyseliny a plynu při teplotě 30 °C do 48 hodin. Jako arbitrážní půda je určen **agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi a laktosou** (VČŽL agar), kde vytváří fialově červené kolonie, někdy

obklopené červenou zónou precipitované žluče. Některé kmeny mohou být patogenní (např. některé sérotypy *E. coli*).

Koliformní bakterie jsou reprezentovány čtyřmi rody s podobnými vlastnostmi: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* a *Klebsiella*. Jsou součástí střevní mikroflóry člověka a teplokrevných zvířat, odkud se dostávají do vnějšího prostředí (vzduch, prach, ruce pracovníků, výrobní zařízení), kde se dokáží přizpůsobit změněným podmínkám a pak kratší nebo delší dobu přežít. Proto jsou v potravinářské mikrobiologii považovány za **indikátory fekálního znečištění** a s tím související možné přítomnosti patogenních mikroorganismů pocházejících ze zažívacího traktu. Pro stanovení kmenů výhradně střevního původu se používá teplota 44,5 °C, při které ostatní kmeny koliformních bakterií nerostou – jedná se o tzv. termotolerantní koliformní bakterie. Vzhledem ke své termolabilnosti jsou koliformní bakterie využívány jako **indikátory účinnosti pasterace a termizace** a z důvodu jejich citlivosti k chemickým látkám také jako **indikátory účinnosti čištění a sanitace** technologických provozů.

ČSN 57 0529 Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování požaduje počty koliformních mikroorganismů do 10^3 KTJ na 1 ml syrového mléka. Hlavním zdrojem koliformních bakterií v syrovém mléce jsou výkaly dojnic a jimi znečištěné prostředí a především kontaminované dojící zařízení. Pomnožení koliformních bakterií umožňuje nedostatečné chlazení nadojeného mléka.

Vysoké počty koliformních bakterií jsou v potravinách nežádoucí, je ovšem prakticky nemožné jejich výskyt eliminovat, zvláště u potravin, které neprošly procesem tepelného opracování (čerstvé či mražené potraviny). **Závazné limity** pro počty koliformních bakterií nejsou u potravin současnou platnou legislativou stanoveny. Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 využívá jako indikátorové mikroorganismy u vybraných druhů potravin především *E. coli* a č. *Enterobacteriaceae*. U pitné vody je situace jiná, zde je požadavek na nepřítomnost koliformních bakterií ve 100 ml vyjádřen formou mezních hodnot a je legislativně stanoven (vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 252/2004 Sb., ve znění pozdějších předpisů). **Doporučené limitní počty** koliformních bakterií jsou v celé řadě potravin stanoveny normativním předpisem (ČSN 56 9609), a to především za účelem jejich začlenění do ověřovacích postupů HACCP v potravinářských provozech.

Příklady limitních hodnot počtů koliformních bakterií doporučené ČSN 56 9609 pro vybrané druhy potravin [$\text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ (ml^{-1})]: jogurt a jogurtové nápoje ($10^2 - 10^3$), měkké sýry zrající, plísňové sýry ($10^4 - 10^5$), zmrazená zelenina a ovoce nepředvářená ($10^3 - 2 \cdot 10^4$), mouka, krupice ($10^3 - 10^4$), cukrářské výrobky s máslovými krémy ($10^2 - 5 \cdot 10^2$), marinované tepelně neopracované ryby ($5 \cdot 10^2 - 5 \cdot 10^3$) a další.

14.4. *Escherichia coli*

E. coli je nejznámější zástupce čeledi *Enterobacteriaceae* a hlavní představitel koliformních bakterií. Je to fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinka a až na výjimky zkvašuje laktosu s tvorbou kyseliny a plynu. Jako arbitrážní půda pro stanovení *E. coli* se používá **agar s tryptonem, žlučovými solemi a X-glukuronidem** (TBX agar). Na tomto chromogenním agaru, který je založen na průkazu aktivity enzymu β -D-glukuronidasy přítomném u většiny kmenů *E. coli*, vytváří bakterie po inkubaci při 44 °C modré až modrozelené kolonie.

Některé kmeny *E. coli* jsou patogenní a jsou obávanými původci onemocnění z potravin. Jedním z nejznámějších je Shiga-like toxigenní kmen *E. coli* O 157, který neroste při teplotě 44 °C a je β -D-glukuronidasa negativní. Při průkazu patogenních sérotypů se používají speciální metodické postupy, nikoliv TBX agar.

Výskyt *E. coli* v potravinách a surovinách živočišného původu a v prostředí výrobních podniků je považován za **indikátor fekální kontaminace**, a tedy **nízké úrovně hygieny a sanitačního režimu**. Výskyt *E. coli* v pasterovaných výrobcích svědčí o jejich **sekundární kontaminaci**. U některých potravin (např. mléčných výrobků) může působit vážné technologické vady a senzorické znehodnocení výrobků.

Nariadení Komise (ES) č. 2073/200 stanovuje maximální limity pro počty *E. coli* (KTJ.g⁻¹) u následujících potravin: mleté maso, strojně oddělené maso ($5 \cdot 10^1 - 5 \cdot 10^2$), masné polotovary ($5 \cdot 10^2 - 5 \cdot 10^3$), sýry vyrobené z tepelně ošetřeného mléka ($1 \cdot 10^2 - 1 \cdot 10^3$), máslo a smetana vyrobené ze syrového mléka ($1 \cdot 10^1 - 1 \cdot 10^2$), vaření koryši a měkkýši bez lastur a krunýřů ($1 \cdot 10^0 - 1 \cdot 10^1$). Metodu MPN vyžaduje nařízení pro stanovení počtu *E. coli* u živých mlžů a plžů ($2,3 \cdot 10^3$ bakterií/100 g svaloviny a tekutiny mezi lasturami).

V pitné vodě mají bakterie *E. coli* funkci **indexových mikroorganismů** – indikují možnou přítomnost střevních patogenů (např. salmonel). Principem indexového významu *E. coli* je skutečnost, že kmeny *E. coli* pocházející bezprostředně z lidských fekálií, mají optimální růst při 44,5 – 45,8 °C, zatímco ty, které delší čas přežily ve vnějším prostředí ne. V mikrobiologii pitné vody je požadavek na nepřítomnost kolonií *E. coli* ve 100 ml pitné vody (vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 252/2004 Sb., ve znění pozdějších předpisů). Nesplnění tohoto legislativního požadavku je většinou důkazem netěsnosti žumpy nebo kanalizace v blízkosti zdroje pitné vody, či jiného způsobu kontaminace pitné vody.

14.5. *Enterococcus* spp.

Bakterie rodu *Enterococcus* jsou grampozitivní koky a tvoří součást běžné střevní mikroflóry lidí a zvířat. Ze skupiny streptokoků se vyčlenily díky svým vlastnostem – schopností růstu v širokém rozmezí teplot (10 i 45 °C) a hodnot pH (9,6), značnou odolností vůči nepříznivým vnějším podmínkám (6,5 % NaCl, 40 % žluči) a termorezistencí (přežijí záhřev na 60 °C po dobu 30 minut). Mezi nejčastější druhy patří *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*.

V praxi nachází stanovení enterokoků uplatnění jako **indikátor fekálního znečištění** zejména v případech, kdy byly vlivem technologického zpracování zničeny koliformní bakterie nebo bakterie č. *Enterobacteriaceae*, např. u sušeného mléka. Jejich výskyt v pasterovaném mléce je ukazatelem **nedostatečnosti pasteračního režimu** a dalších technologických postupů. Jako indikátorové mikroorganismy mohou enterokoky signalizovat možnou **přítomnost grampozitivních patogenních mikroorganismů** např. stafylokoků nebo listerií. Jejich výskyt v potravinách je v některých případech žádoucí, zvláště u zrajících potravin, kde se enterokoky účastní fermentačních procesů.

Počty enterokoků u jednotlivých druhů potravin nejsou legislativně stanoveny, ani formou doporučení prostřednictvím normativních předpisů, což ovšem neznamená, že provozovatelé potravinářských podniků nemohou stanovení enterokoků využít pro zajištění kvality a bezpečnosti svých potravin. Limit si do ověřovacích postupů systémů HACCP mohou stanovit na základě vlastních zkušeností. V případě analýz pitné vody je legislativně stanoven limit na nepřítomnost intestinálních enterokoků ve 100 ml vzorku (vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 252/2004 Sb., ve znění pozdějších předpisů).

14.6. Další indikátorové mikroorganismy

Negativní význam **kvasinek a plísní** spočívá především ve schopnosti způsobovat kažení potravin svou proteolytickou a lipolytickou činností, u plísní je riziko tvorby mykotoxinů. Kvasinky a plísně je vhodné využít jako indikátory mikrobiologické jakosti potravin u kysaných mléčných výrobků, potravin rostlinného původu, potravin s nízkou aktivitou vody (sušené potraviny), skladovaných mražených výrobků, másla a margarínů a u výrobků studené kuchyně (majonézové saláty, majonéza apod.). Významným indikátorem kažení potravin jsou dále **proteolytické bakterie**, především grampozitivní anaerobní sporuláty (rod *Clostridium*), enterokoky a z gramnegativních psychrotrofních bakterií to jsou především rody *Pseudomonas* a *Proteus*. Indikátorový význam **psychrotrofních bakterií** spočívá v informaci o mikrobiální kontaminaci potravin z pohledu možnosti jejich skladování při chladírenských teplotách. Jedná se především o gramnegativní tyčinky rodů *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alteromonas*, *Vibrio*, *Serratia* a také grampozitivní bakterie rodu *Bacillus* a *Listeria*.

15. KVASINKY A JEJICH VÝZNAM V POTRAVINÁŘSTVÍ

Kvasinky (*angl. yeast*) jsou jednobuněčné eukaryotní mikroorganismy náležející do říše houby (*Fungi*). Jejich český název je odvozen od schopnosti štěpit sacharidy (monosacharidy, příp. i di- a trisacharidy za vzniku ethanolu a CO₂). Kvasinky jsou chemoorganotrofní organismy, řada z nich má pro potravinářství velký význam. Některé druhy jsou patogenní.

Podle způsobu rozmnožování se kvasinky dělí do tří hlavních skupin: 1) *Ascomycotina* – rody tvořící endospory (askospory); 2) *Basidiomycotina* – rody tvořící exospory (sporidie, basidiospory); a 3) *Deuteromycotina* – rody, u kterých není známá tvorba pohlavních spor.

Deuteromycotina byly dříve označovány jako „nepravé kvasinky“ či „kvasinkové mikroorganismy“. Předpokládá se, že některé druhy ztratily v důsledku mutace schopnost spájení. U jiných existuje v současné době pouze jeden párovací typ a jsou tedy **imperfektními stadii** sporotvorných (perfektních) druhů kvasinek, se kterými mají společné morfologické, biochemické a fyziologické vlastnosti. Často mají sporotvorné a nesporotvorné kmeny odlišné rodové a příp. i druhové jméno (např. *Candida kefyra* je imperfektním stádiem druhu *Kluyveromyces marxianus*).

15.1. Základní charakteristika

15.1.1. Růstové nároky

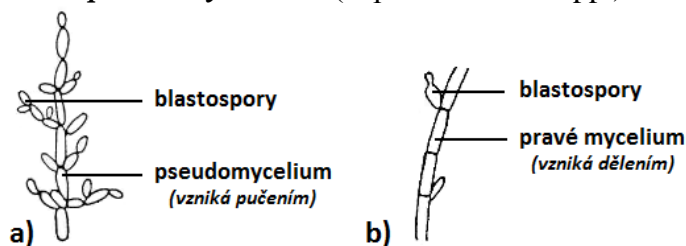
Kvasinky obvykle rostou za přístupu kyslíku (aerobní podmínky). Jsou však schopny růst i za podmínek anaerobních, kdy získávají energii anaerobní fermentací (ethanolové kvašení). Rostou v poměrně širokém rozmezí pH (pH 3 – 11, optimum 4,2 – 4,5) i teplot (-2 °C až 48 °C), minimální aktivita vody je 0,91 – 0,88. Teplotní optima pro různé životní projevy (metabolismus, růst biomasy, rozmnožování) se mohou lišit. Krátkodobé zvýšení teploty nad teplotní maximum vyvolává teplotní šok, který se projevuje výkyvy metabolismu a produkcí ochranných látek (proteinů teplotního šoku, HSPs – *Heat Shock Proteins*).

Osmofilní kvasinky rostou pouze na substrátech s vysokým obsahem cukru, pro osmotolerantní kvasinky je optimální koncentrace sacharidů do 5 %, ale tolerují i obsah vyšší, doprovázený odpovídajícím snížením aktivity vody.

15.1.2. Morfologie kvasinek

Tvar buněk, jejich velikost a barva je značně variabilní, závisí na rodové příslušnosti, podmínkách vnějšího prostředí, stádiu životního cyklu a způsobu vegetativního rozmnožování. Délka buňky kvasinek je různá, pohybuje se od 2 – 3 μm až do 20 – 50 μm, šířka bývá v rozmezí 1 – 10 μm. Velikost buňky se zvětšuje s jejím stářím. **Tvar buňky** je nejčastěji elipsoidní, vejčitý či kulovitý, objevují se i buňky protáhlé, trojúhelníkovité, válcovité či tvaru citronu. Např. kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* mají elipsoidní tvar a průměrnou délku 5 – 10 μm a šířku 1 – 7 μm.

Některé rody vytváří dlouhé protáhlé buňky *pučící* pouze na pólech, které po pučení zůstávají spojeny v dlouhá zaškrčená vlákna – tzv. *pseudomycelium* (např. *Candida* spp.). Na některých místech pseudomycelia se objevují svazky kratších elipsoidních buněk – *blastospor* (obrázek 38a). Kvasinky tvoří i *pravé mycelium* (např. *Geotrichum candidum*), což je vlákno vznikající *příčným dělením* protáhlých buněk. I na pravém myceliu můžeme pozorovat svazky blastospor (obrázek 38b).



Obrázek 38: Růst kvasinek – a) v pseudomyceliu, b) v pravém myceliu. (Šilhánková, 2002 – upraveno)

Rod *Schizosaccharomyces* se rozmnožuje **dělením bez tvorby mycelia**, oddělené buňky mají obdélníkový tvar se zaoblenými rohy. Přechod mezi pučením a dělením tvoří tzv. **pučení na široké základně**, při kterém je pupen spojen s mateřskou buňkou širokým krčkem (např. rod *Saccharomyces*). Po ukončení pučení je krček uzavřen přepážkou. Pučení bývá v tomto případě často bipolární (probíhá současně na obou pólech buňky).

15.1.3. Stavba buňky kvasinek

Kvasinky patří mezi eukaryota a tomu odpovídá i stavba jejich vegetativní buňky. Hlavními rozdíly, oproti bakteriím, jsou právě jádro obdané dvojitou jadernou membránou a přítomnost buněčných organel v cytoplasmě. Stejně jako v případě bakterií, je na povrchu buňky kvasinek silná a pevná buněčná stěna. Následuje cytoplasmatická membrána obdávající vnitřní prostor buňky naplněný cytoplasmou a v ní uloženými strukturami (jádro, organely, vakuoly). Orgány pohybu – bičíky, zcela chybí, kvasinky jsou nepohyblivé.

Oproti bakteriím obsahuje buněčná hmota kvasinek poněkud méně vody (65 – 83 %). Obsah vody a složení sušiny kolísají v závislosti na druhu, stáří buňky a kultivačních podmínkách. Asi 50 % sušiny tvoří bílkoviny, vysoký je i obsah glykogenu (až 30 %) příp. lipidů (u kvasinek využívajících jako zásobní látku tuky ne glykogen). 10 % sušiny tvoří nukleové kyseliny, asi 5 % strukturní polysacharidy a 8 % popel. Z organických látek mají význam vitaminy skupiny B (B₁, B₂ a B₆), provitamin D (ergosterol) či β-karoten (provitamin A).

Tabulka 8: Zastoupení makromolekul v buňce kvasinek. (Walker, 1998 – upraveno)

Proteiny	strukturální proteiny – aktin a tubulin cytoskeletu, histony, membránové proteiny; ribosomální proteiny, feromony (hormonální proteiny), funkční proteiny – enzymy
Glykoproteiny	strukturální glykoproteiny v buněčné stěně, funkční glykoproteiny – enzymy (např. invertasa)
Polysacharidy	strukturální polysacharidy buněčné stěny (glukan, mannan, chitin) a kapsulární heteropolysacharidy, zásobní polysacharidy (glykogen, disacharid trehalosa)
Polyfosfáty	zásobní polyfosfáty ve vakuolách
Lipidy	strukturální fosfolipidy – volné steroly v cytoplasmatické membráně, zásobní lipidy – estery sterolů a triglyceridy, funkční lipidy – deriváty fosfoglyceridů (signální transdukcce), volné mastné kyseliny (růst a metabolické procesy)
Nukleové kyseliny	DNA: 80 % jaderná DNA, 10 – 20 % mitochondriální DNA, 1 – 5 % extrachromosomální DNA; RNA: 80 % rRNA, 5 % mRNA, tRNA

15.1.3.1. Buněčná stěna

Buněčná stěna kvasinek má, stejně jako u bakterií, silnou a pevnou strukturu, dává buňce tvar a chrání ji před mechanickým poškozením a osmotickým šokem. **Póry** v buněčné stěně mohou volně prostupovat různé látky s výjimkou vysokomolekulárních bílkovin a polysacharidů. Buněčná stěna bývá tvořena několika vrstvami s odlišným chemickým složením. 80 % sušiny buněčné stěny tvoří **polysacharidy** (glukany, mannany, příp. glukosamin a chitin) vytvářející hustou síť vláken. Prostory mezi vlákny jsou vyplněny **bílkovinami** (6 – 10 %). Buněčná stěna kvasinek obsahuje také určité množství **lipidů a fosfolipidů** a také **fosforečnanů** vázaných esterovými vazbami na polysacharidy.

Buněčnou stěnu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* tvoří tři vrstvy – vnitřní (glukan a proteiny), střední (glukomannan s proteiny) a vnější (mannany s proteiny a malým množstvím lipidů). Složení vnější vrstvy buněčné stěny má vliv na sedimentační schopnost kvasinek – tzv. **flokulaci**. Flokulace kvasinek je jev, při kterém dochází ke vzájemné reverzibilní adhezenci buněk, jejímž výsledkem je tvorba sedimentujících makroskopických vloček. Význam má zejména v pivovarnictví, kde hovoříme o tzv. „spodních pivovarských kvasinkách“ (usazují se díky sníženému obsahu mannanů a zvýšenému obsahu proteinů) a „svrchních pivovarských kvasinkách“ (ty jsou vynášeny do pěny).

Elektronovým mikroskopem pozorujeme na povrchu buněčné stěny vyvýšené prstence – tzv. **jizvy po pučení** (jejich počet určuje stáří buňky), na jednom pólu buňky potom zvláštní prsteneček – **jizvu zrodu** (v tomto místě byla buňka spojena s buňkou mateřskou).

Na povrchu stěny některých druhů kvasinek se vyskytují *fimbrie*, které se např. u *S. cerevisiae* uplatňují při flokulaci, jiný typ fimbrií má funkci při pohlavním rozmnožování. Některé kvasinky (např. rody *Cryptococcus* či *Rhodotorula*) tvoří na povrchu buněčné stěny *polysacharidové pouzdro*.

15.1.3.2. Cytoplasmatická membrána

Podobně jako u bakterií, tvoří cytoplasmatickou membránu kvasinek (*plasmalemu*) dvojrůžstva fosfolipidů s vmezeřenými proteiny. Cytoplasmatická membrána je poměrně tenká (asi 8 nm), směrem do cytoplasmy tvoří četné výchlípky. Je semipermeabilní, volně propouští pouze malé molekuly bez náboje, díky tomu tvoří osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím. Mezi její hlavní funkce patří obousměrný transport látek, syntéza složek buněčné stěny (glukan, chitin), transmembránová signální transdukce (přeměna externího signálu na buněčnou odpověď – intracelulární biochemické reakce) a ukotvení cytoskeletu. Na rozdíl od bakterií zde nejsou lokalizovány enzymy respiračního řetězce a systém oxidační fosforylace.

15.1.3.3. Cytoplasma a struktury v ní uložené

Cytoplasma kvasinek je homogenní, koloidní roztok obsahující různé látky (jednoduché molekuly i makromolekuly), supramolekulární útvary, buněčné orgány a cytoskelet (síť proteinových vláken – mikrotubulů a mikrofilament, umožňující vnitrobuněčný pohyb organel z místa na místo, význam má i při jaderném dělení). V cytoplasmě jsou dále přítomna zrníčka zásobních látek – volutinu a glykogenu, příp. i lipidy.

Endoplasmatické retikulum je systém dvojitých membrán, na jejichž vnějším povrchu jsou lokalizovány tzv. *polysomy* (shluky *ribosomů*) kde probíhá proteosyntéza. Ribosomy kvasinek jsou větší než ribosomy bakterií, funkční jednotka 80S je tvořena z podjednotek 40S a 60S.

V cytoplasmě se nachází **mitochondrie** různého tvaru a velikosti. Jsou také tvořeny dvěma membránami, vnější má bradavčitý povrch, vnitřní tvoří hluboké výchlípky směrem dovnitř mitochondrie – tzv. *kristy*. Mitochondrie jsou složeny s proteinů, lipidů a fosfolipidů, obsahují RNA a malé množství mitochondriální DNA (mtDNA). V mitochondriích je lokalizován respirační řetězec a systém oxidační fosforylace, probíhá zde i syntéza některých bílkovin.

Výrazným útvarem jsou **vakuoly**, které mají obvykle kulovitý tvar a jsou obdány jednoduchou membránou. V mladých buňkách je více malých vakuol, ve starších buňkách může být pouze jedna vakuola vyplňující téměř celý prostor. Uvnitř vakuoly jsou uloženy hydrolytické enzymy (proteiny, ribonukleasy a estery), má tedy podobnou funkci jako lysosomy u vyšších organismů. Současně vakuoly slouží jako rezervoár látek (např. aminokyselin, purinů, K⁺, polyfosfátů).

Membránovým útvarem je také **Golgiho aparát** – systém několika plochých měchýřků, vzájemně propojených a uložených rovnoběžně vedle sebe. Jeho hlavní funkcí je transport prekurzorů buněčné stěny z cytoplasmy přes cytoplasmatickou membránu.

15.1.3.4. Jádro

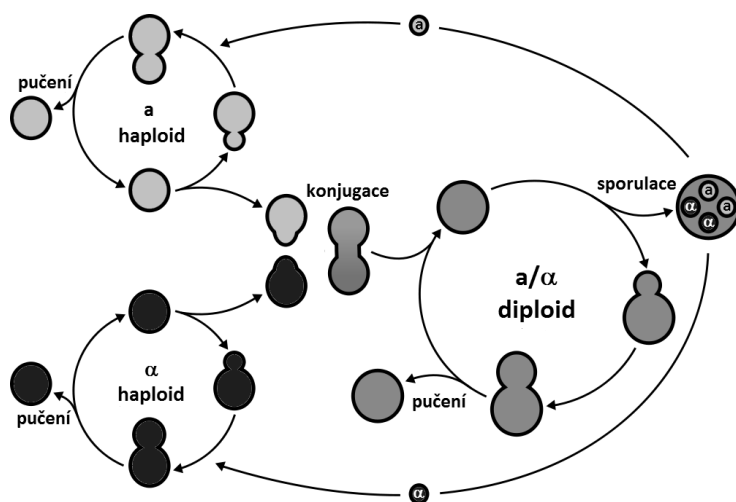
Jádro kvasinek je uloženo přibližně uprostřed buňky a od cytoplasmy je odděleno dvojitou jadernou membránou s velkými póry. Haploidní jádro *S. cerevisiae* obsahuje 16 *chromosomů*, diploidní má dvojnásobný počet. Uvnitř jádra, v nukleoplasmě, některých druhů kvasinek (např. *S. cerevisiae*) se vyskytují i krátké kruhové molekuly DNA podobné plasmidům bakterií. Těsně pod jadernou membránou je uloženo srpkovité *jadérko* (*nukleolus*). Další

součástí jádra je diskovité *polární tělísko vřeténka* a z něj vycházející *mikrotubuly* tvořené bílkovinou tubulinem. Vřeténko hraje důležitou roli při dělení jádra.

Vnitřní část chromosomů se nazývá *centromera* a uplatňuje se při dělení a segregaci chromosomů. V koncových úsecích – *telomerách*, se vyskytují příčné vazby mezi oběma řetězci DNA. Jako ostatní eukaryotní chromosomy, obsahují i chromosomy kvasinek *chromatin*. Ten je složený z *histonů* (část těchto bílkovin má podobné složení jako histony vyšších organismů) tvořících kulovité nukleosomální podjednotky, kolem kterých se obtáčí DNA.

15.2. Rozmnožování kvasinek

Na rozdíl od bakterií se kvasinky mohou rozmnožovat *vegetativně* (nepohlavně) i *sexuálně* (pohlavně). Některé tzv. asporogenní kvasinky se množí pouze vegetativně. Buňky kvasinek mohou být buď v haploidní (obsahují jednu sadu chromosomů) nebo diploidní (obsahují dvě sady chromosomů) fázi, které se pravidelně střídají. Stejně tak se v rámci jejich životního cyklu střídají stádia vegetativního rozmnožování (*anamorfa*) a stádia rozmnožování pohlavního (*teleomorfa*).



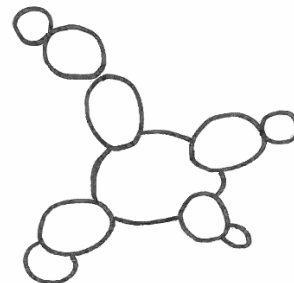
Obrázek 39: Životní cyklus *Saccharomyces* spp. (URL 1 – upraveno)

Důležitým okamžikem v klidové buňce je tzv. *start*, kdy se rozhoduje o tom, zda buňka nastoupí buněčné dělení. Je-li v tomto okamžiku buňka ve vhodných podmínkách (teplota, živiny), proběhne buněčné dělení až do konce. Naopak při nedostatku živin (zdrojů uhlíku a dusíku) začíná u diploidních buněk v tomto okamžiku meiosa a sporulace. Tento okamžik je také výchozím bodem pro konjugaci dvou haploidních buněk opačného párovacího typu.

15.2.1. Vegetativní rozmnožování

Většina kvasinek se vegetativně rozmnožuje pučením, rody tvořící pravé mycelium potom příčným dělením.

Při *pučení* vytváří vznikající dceřiná buňka malý *pupen*, který je kanálkem spojený s buňkou mateřskou. Před vlastním pučením dochází k dělení endoplasmatického retikula, vakuol a ke změně tvaru mitochondrií (ty se protahují). Současně probíhá *mitosa* – jaderné dělení. Kanálkem přechází nové jádro a složky cytoplasmu do dceřiné buňky. Kanálek je nejdříve uzavřen cytoplasmatickou membránou, posléze dochází k tvorbě buněčné stěny. V pupenu se intenzivně syntetizuje a rozšiřuje endoplasmatické retikulum, malé vakuoly se spojují v jednu velkou. Po ukončení pučení se dceřiná buňka oddělí nebo zůstává spojena s buňkou mateřskou po několik dělení a vytvoří tzv. *buněčný svazek* (obrázek 40). Celý cyklus buněčného dělení trvá za optimálních podmínek asi dvě hodiny a je regulován velkým počtem genů (asi sto tzv. CDC genů, *angl. Cell Division Cycle*).



Obrázek 40: Buněčný svazek kvasinek. (Šilhánková, 2002 – upraveno)

Cyklus buněčného dělení kvasinek má čtyři fáze – *G1*, *S*, *G2* a *M*. *G1 fáze* představuje růst buňky a přípravu na replikaci chromosomů, dochází ke zdvojení polárního tělíska v jádře. V *S fázi* probíhá syntéza DNA,

chromosomy se zdvojují ve dvě chromatidy spojené centromerou. Současně vzniká malý pupen. Následuje **G2 fáze** (tzv. příprava na mitosu) – polární tělíska se separují a vytvoří protilehlé póly jádra, dojde k tvorbě mikrotubulů a vzniká vřeténko. V konečné fázi (**M fáze**) dojde k migraci jádra do pupenu a proběhne jeho mitotické dělení. Vřeténko se protáhne, zdvojené chromosomy se rozdělí podél centromery a mikrotubuly vřeténka táhnou sesterské chromatidy k opačným pólům vřeténka. Po přetržení vřeténka vznikají dvě samostatná jádra, z nichž každé má vlastní pólové tělísko s mikrotubuly a jednu sadu chromosomů. Současně dochází k růstu pupenu téměř až na velikost mateřské buňky, následuje jeho oddělení a dokončení celého cyklu.

15.2.2. Pohlavní rozmnožování

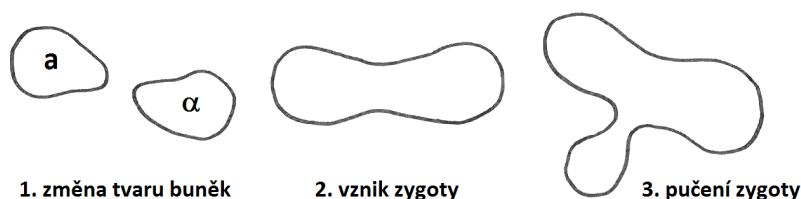
Většina kvasinek je schopna také pohlavního rozmnožování, jehož výsledkem je tvorba pohlavních spor. Vřeckovýtrusné kvasinky (*Ascomycotina*) tvoří **endospory**, tzv. **askospory**, které jsou umístěné ve **vřecku** neboli **asku**. Askospory mohou mít různý tvar, nejčastěji jsou kulovité či elipsoidní. Stopkovýtrusné kvasinky (*Basidiomycotina*) tvoří **exospory** (sporidie, basidiospory) umístěné vně sporotvorných buněk.

Při pohlavním rozmnožování dochází ke spájení – **konjugaci** dvou haploidních buněk a spájení jejich jader neboli **karyogamii** za vzniku diploidního jádra. Diploidní jádro se následně dělí **meiosou** (redukčním dělením) na čtyři haploidní jádra, z nichž buď rovnou nebo po dalším, tentokrát mitotickém dělení, vzniknou pohlavní spory. V životním cyklu kvasinek se tedy haploidní a diploidní fáze buněk střídají.

Při meiose dochází nejprve k rozdělení polárního tělíska na dvě a k vytvoření vřeténka. Současně vzniká **kulovité tělísko**, z něhož se tvoří orgány zodpovědné za párování diploidních chromosomů v ekvatoriální rovině jádra (tzv. **synapse**). Mikrotubuly vřeténka táhnou každou sadu chromosomů k opačnému pólu jádra – hovoříme o **segregaci chromosomů**. Všechny chromosomy jsou v tomto okamžiku již rozdělené na dvě chromatidy spojené centromerou, syntéza DNA byla ukončena. Někdy je tato část meiosis označována jako první dělení. Následně dochází k opětovnému rozdělení polárních tělísek a tvorbě nových vřetének, které segregují jednotlivé chromatidy k opačným pólům. Po rozpadu nových vřetének vznikají **čtyři jádra**, každé z nich obsahuje polární tělísko s mikrotubuly a haploidní sadu chromosomů. Tato fáze bývá označována jako druhé dělení.

15.2.2.1. Tvorba endospor

U askosporogenních kvasinek dochází současně ke spájení haploidních buněk a spájení jejich jader (karyogamii) za vzniku diploidní buňky – **zygoty**. Na základě velikosti spájených buněk můžeme hovořit o izogamním nebo o heterogamním spájení. Při **izogamním spájení**, typickém pro **heterothalické kmény** kvasinek (např. rod *Saccharomyces*), jsou obě buňky přibližně stejně velké a jsou pohlavně rozlišené, tj. patří do různých párovacích (kopulačních) typů. Například u *S. cerevisiae* se spájí buňka typu **a** s buňkou typu **α** (obrázek 41). Po vytvoření zygoty se může diploidní buňka vegetativně množit. Za vhodných podmínek



Obrázek 41: Izogamní spájení. (Šilhánková, 2002 – upraveno)

(aerobní metabolismus, alkalické pH, atd.) dochází ke sporulaci diploidní buňky, kdy se při meiose celá buňka přemění v askus (vřecko) obsahující až 4 askospory (některé z jader může zaniknout).

Při **heterogamním spájení** se velká mateřská buňka spájí se svým vegetativním potomstvem (malou dceřinou buňkou – pupenem). Tento typ spájení je charakteristický **homothalické kmény** kvasinek, např. pro rod *Debaryomyces*. Vzniklá zygota podléhá meiose při níž se mateřská buňka přemění v askus s 1 až 4 askosporami. U některých kvasinek zygota před sporulací nejprve pučí a teprve nový pupen se přemění v askus.

15.2.2.2. Tvorba exospor

Kvasinky tvořící *sporidie* (např. rod *Leucosporidium*) jsou heterotalické. Jejich haploidní buňky se vegetativně rozmnožují pučením. Při smíchání obou párovacích typů dochází ke spájení buněk, ale nikoli jejich jader – vzniká **dvoujaderná micelární fáze**. Na myceliu se tvoří tzv. **přezky**, umožňující přechod jednoho jádra do sousední buňky (po mitose obou jader má tedy každá buňka dvě různá jádra). Po určité době se na konci vzniklého mycelia vytvoří kulovitý útvar – **teliospora**. Teprve v teliospore dochází ke karyogamii. Po určité klidové fázi teliospora vyklíčí v tzv. **promycelium**, v němž nastává meiosa. Promycelium může být jednobuněčné nebo rozdělené přepážkami na čtyři buňky. Z buněk promycelia se následně pučením oddělují jednobuněčné haploidní *sporidie* prvního nebo druhého párovacího typu. Pučením sporidií vznikají vegetativní haploidní buňky a celý cyklus se uzavírá.

Při tvorbě **basidiospor** dochází nejprve ke spájení dvou pohlavně odlišených haploidních buněk, vytvoří se **dikaryotické mycelium s přezkami** pro přechod jader do sousedních buněk. Na konci mycelia vzniká štíhlá **basidie**, v níž probíhá karyogamie i meiosa, následovaná jednou či více mitosami. Na konci basidie se tvoří **basidiospory** (přisedlé nebo v řetízích).

15.3. Výskyt kvasinek a jejich význam v potravinářství

Kvasinky jsou v přírodě velmi rozšířené. Vyskytují se v květních nektarech a výronech stromů, ale také v půdě, ve vzduchu či ve střevním traktu lidí, živočichů a hmyzu (např. včel). Často se vyskytují na ovoci, především bobulovitém a peckovitém (hrozny, švestky, atd.), a dalších cukernatých potravinách. Šíření kvasinek je umožněno zejména hmyzem a větrem. Ve vzduchu bývá nejvíce kvasinek při kvetení stromů a zrání ovoce.

V květních nektarech se obvykle vyskytují oxidační typy kvasinek (např. rody *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, méně často *Candida*), oproti tomu na povrchu měkkého ovoce převládají kvasné typy jako *Saccharomyces* spp. či *Saccharomyces* spp.

Kvasinky se obvykle jen velmi málo množí na mase a dalších bílkovinných potravinách. Je to dáno jejich **fyzilogickými vlastnostmi** – potřebou sacharidů, odolností ke kyselému prostředí, osmotolerancí některých druhů a velmi omezenou schopností štěpit bílkoviny. Jejich výskyt v potravinách je také významně ovlivněn **nízkou teplotní odolností**, kdy většina kvasinek je usmrcena již při teplotě 56 °C za 2 – 5 minut. Spory kvasinek mají jen nepatrně vyšší odolnost než vegetativní buňky.

Protože se kvasinky rozmnožují výrazně pomaleji než bakterie, uplatňují se především při **kažení potravin**, ve kterých jsou pro bakterie nepříznivé růstové podmínky. Jedná se zejména o potraviny kyselé (nízké pH), s vysokým obsahem cukru či NaCl nebo potraviny konzervované organickými kyselinami. Nejčastěji se s nežádoucím růstem kvasinek setkáváme u kompotů, ovocných šťáv a dalších ovocných výrobků a salátů, slazených limonád a minerálních vod či alkoholických nápojů (pivo, víno). Osmotolerantní kvasinky se podílejí na kažení např. sladového výtažku, medu či plněných čokoládových bonbonů. Kvasinky se podílí také na kažení fermentovaných mléčných a masných výrobků, dále másla, margarínů a výrobků obsahujících majonézu. Kontaminace nežádoucími kvasinkami způsobuje problémy také při výrobě droždí, v pivovarnictví a vinařství. Některé druhy kvasinek produkují pigmenty a způsobují barevné změny na potravinách (např. rody *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* či *Cryptococcus*).

Patogenní druhy kvasinek (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) mohou vyvolat u oslabených jedinců vážná onemocnění.

Největší **využití** nachází kvasinky (zejména *Saccharomyces cerevisiae*) při výrobě alkoholických nápojů (pivo, víno, kvasná výroba ethanolu) a krmného a pekařského droždí.

Kvasinky hrají důležitou roli také v prvních fázích přirozené fermentace kávových zrn a kakaových bobů, osmotolerantní druhy potom při výrobě sojové omáčky. Kulturní kmeny kvasinek se dále využívají při výrobě některých druhů sýrů a fermentovaných mlék jako kefir a kumys (např. *Kluyveromyces marxianus*) a také fermentovaných masných výrobků (*Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, atd.).

Mimo pekárenství se droždí používá také jako přísada do výživových preparátů, jeho extrakty a autolyzáty potom jako přísada do potravin (polévky, omáčky, polévková koření) či mikrobiologických půd. Vyšší alkoholy získávané při rafinaci lihu, tzv. přiboudlina, se používají jako rozpouštědlo laků. Z buněk kvasinek se izoluje řada chemických látek jako enzymy, koenzymy, nukleotidy, atd. Stručný přehled potravinářsky nejvýznamnějších druhů kvasinek a jejich využití je uveden v tabulce 9.

Tabulka 9: Přehled vybraných potravinářsky významných kvasinek a jejich využití.

1. ASCOMYCOTINA	
<i>Saccharomyces</i> spp. <i>S. cerevisiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> - zkvašují glukosu, sacharosu, maltosu, galaktosu, rafinosu - výroba pekařského droždí - pivovarnictví (svrchní a spodní pivovarnické kvasinky) a vinařství - kvasná výroba lihu - modelový organismus pro biochemické a genetické studie
<i>Kluyveromyces</i> spp. <i>K. marxianus</i> var. <i>lactis</i>	<ul style="list-style-type: none"> - zkvašují laktosu - výroba kefiru, spolu s bakteriemi tvoří tzv. kefirová zrna (anamorfa – imperfektní stadium je <i>Candida kefyri</i>)
<i>Debaryomyces</i> spp. <i>D. hansenii</i>	<ul style="list-style-type: none"> - některé kmeny jsou součástí kultur pro výrobu fermentovaných tepelně neopracovaných masných výrobků - kontaminují mléčné výrobky, maso, majonézy - mohou se vyskytovat na kůži lidí a zvířat - v tekutých výrobcích vytváří mázdru (bílý kožovitý povlak)
<i>Zygosaccharomyces</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> - osmotolerantní (tolerují až 50 % glukosy) - kažení medu, marcipánu, plněných čokoládových bonbonů a figurek (zkvašování náplně) - tvorba křísu (povrchové blanky) v lahvovém víně
<i>Schizosaccharomyces</i> spp. <i>S. pombe</i>	<ul style="list-style-type: none"> - využití při odkyselení vín (utilizace kyseliny jablečné) - v Africe využívané na přípravu alkoholického nápoje „pomba“ z prosa
<i>Pichia</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> - tvorba křísu v lahvovém pivu a víně
<i>Saccharomycopsis</i> spp. <i>S. fibuligera</i> , <i>S. lipolytica</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>S. fibuligera</i> produkuje amylasy (tzv. „křídová plíseň chleba“) - <i>S. lipolytica</i> štěpí tuky, podílí se na kažení másla, margarínů, olejů, majonézy a chleba
2. BASIDIOMYCOTINA	
<i>Filobasidiella</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> - patogenní rod - způsobuje závažná onemocnění zvířat i lidí
3. DEUTEROMYCOTINA	
<i>Candida</i> spp. <i>C. utilis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. albicans</i>	<ul style="list-style-type: none"> - výroba krmného droždí z melasy a dalších materiálů - nežádoucí kontaminace pekařského droždí - patogenní <i>C. albicans</i> způsobuje onemocnění kůže a nehtů, u oslabených jedinců i kandidózu sliznic a vnitřních orgánů
<i>Geotrichum</i> spp. <i>G. candidum</i>	<ul style="list-style-type: none"> - vytváří bílé sametové až vatovité kolonie (tzv. mléčná plíseň) - tvoří přechod mezi kvasinkami a plísněmi - nemá kvasné schopnosti - obsahuje sacharolytické, proteolytické a lipolytické enzymy - častá kontaminace mléčných výrobků (tvaroh, jogurty), droždí, kysaného zelí a tukových tkání masa

(zpracováno podle – Görner a Valík, 2004; Šilhánková, 2002)

16. PLÍSNĚ A JEJICH VÝZNAM V POTRAVINÁŘSTVÍ

Plísně (*angl. mould*) jsou chemoorganotrofní mikroskopické vláknité eukaryotní mikroorganismy náležející do říše houby (*Fungi*). Plísně mají velký ekonomický význam, řada z nich parazituje na plodinách (jsou fytopatogenní) nebo vyvolává kažení uskladněného ovoce a zeleniny či potravin živočišného původu. Plísně jsou také významnými producenty antibiotik. Na druhou stranu produkce mykotoxinů může vyvolat vážné zdravotní obtíže, stejně jako patogenní druhy plísni.

Potravinářsky významné plísně náleží, podle typu pohlavního rozmnožování, do následujících taxonomických skupin:

- 1) **Zygomycotina** (třída *Zygomycetes*) – rody tvořící jednobuněčné, neboli nepřehrádkované mycelium, pohlavní rozmnožování je charakteristické tvorbou zygot, při nepohlavním rozmnožování vznikají endospory (např. rody *Mucor* a *Rhizopus*);
- 2) **Ascomycotina** – rody tvořící přehrádkované mycelium, při pohlavním rozmnožování vznikají askospory, při nepohlavním exospory (např. rody *Penicillium* a *Aspergillus*);
- 3) **Deuteromycotina** (tzv. *Fungi imperfecti*) – rody tvořící přehrádkované mycelium, které se množí pouze vegetativně a tvoří vegetativní exospory (např. rody *Alternaria* a *Fusarium*).

Z botanického hlediska je pojem plísně vyhrazen pouze pro houby s nepřehrádkovaným myceliem (třída Zygomycetes), zástupci podkmenů Ascomycotina a Deuteromycotina jsou označovány jako tzv. vláknité houby nebo vláknité mikromycety. V potravinářské praxi se však pojem plísně používá pro příslušníky všech tří skupin (růst na napadeném materiálu je podobný, stejně tak fyziologické vlastnosti a typ kažení).

16.1. Základní charakteristika

16.1.1. Růstové nároky

Plísně jsou aerobní mikroorganismy a ke svému růstu potřebují vzdušný kyslík, existují však také rody (např. *Mucor* spp.) schopné růstu i za anaerobních podmínek, kdy přechází na fermentační metabolismus. Potřeba kyslíku je dána skutečností, že esenciální složkou jejich cytoplasmatické membrány jsou steroidy (ergosterol), jejichž syntéza vyžaduje kyslík.

V porovnání s bakteriemi jsou plísně schopné snášet hodně extrémní podmínky. Tolerují velmi široké rozmezí pH 3 – 9, některé druhy rostou dokonce i při pH pod 2. Dobře rostou i při nízké aktivitě vody, xerofilní plísně mají hranici minimální aktivity vody 0,60. Většina plísni neroste při teplotách pod 2 – 5 °C, avšak některé druhy (např. *Cladosporium herbarum*) jsou schopny růst i při teplotách pod bodem mrazu až do -10 °C.

16.1.2. Morfologie plísni

Stélka plísni (thalus) se obecně skládá ze dvou částí – mycelia a spor. **Mycelium** tvoří spleť vláken (hyf), které mohou být buď jednobuněčné (bez přepážek, třída *Zygomycetes*) nebo vícebuněčné (septované). Septa (přepážky) mají uprostřed otvory dovolující přechod protoplasmu a organel z buňky do buňky. Nové hyfy vznikají klíčením spor, růst hyf probíhá na konci. Hyfy jsou v podstatě dlouhé trubice, široké 5 – 10 μm, které se dále větví.

Mycelium v substrátu – **substrátové (vegetativní) mycelium**, slouží k výživě plísni; **vzdušné (reprodukční) mycelium** roste na povrchu substrátu a má rozmnožovací funkci.

Velmi hustá spleť hyf, tvořící poměrně tvrdý polokulovitý útvar, se nazývá **sklerocium**. Sklerocium má obvykle tmavou barvu, průměr několik milimetrů a je velmi odolné vůči nepříznivým podmínkám. Vyskytuje se především u nesporetvorných druhů. U plísni, které parazitují na ovoci či dalších rostlinách, se vytváří kožovitá spleť hyf, tzv. **stroma**.

16.1.3. Stavba buňky plísní

Plísně patří mezi eukaryotní organismy, stavba jejich buňky je podobná kvasinkám. Na povrchu se vyskytuje buněčná stěna, pod ní je cytoplasmatická membrána (plasmalema). Vnitřní prostor buňky je vyplněn cytoplasmou, která obsahuje různé strukturní útvary a zásobní látky. V každé buňce je jedno nebo více jader, obvykle haploidních. Dalšími strukturními útvary jsou endoplasmatické retikulum, mitochondrie, Golgiho aparát a vakuoly. Hlavní rezervní látkou plísní jsou lipidy, tvořící v cytoplasmě různé velké kapičky. Dále se v cytoplasmě nachází zrníčka polyfosfátů. Cytoplasma je obdána cytoplasmatickou membránou (7,5 – 8 nm), jejíž složení i funkce jsou podobné jako u kvasinek.

16.1.3.1. Buněčná stěna

Složení buněčné stěny plísní není jednotné, významně se liší u jednotlivých buněčných útvarů (tj. hyf, fruktifikačních orgánů a spor). Největší zastoupení mají *polysacharidy* (chitin, chitosan, glukany, mannany, dále celulóza a látky podobné ligninu), přítomny jsou také *bílkoviny* a velké množství *lipidů*. Mimo neutrálních lipidů, obsahuje buněčná stěna plísní také *vosky* (estery mastných kyselin a vyšších alkoholů), které přispívají k nízké smáčitelnosti hyf a fruktifikačních orgánů – konidií a sporangioforů.

Stěny konidií obsahují různá *barviva*, proto mají kolonie plísní často nápadnou barvu. Častá je zelená až modrozelená barva (*Penicillium* spp., *Aspergillus* spp.), dále barva béžová, hnědá, černá (např. *Aspergillus niger*), růžová, atd. Stěny endospor a blána sporangia u zygomycet obsahují většinou hnědočerné barvivo melanoidní povahy, které slouží jako ochrana před účinky ultrafialového záření. Stěny vegetativních hyf jsou, až na výjimky, bezbarvé.

16.2. Rozmnožování plísní

Podobně jako kvasinky jsou plísně schopny se rozmnožovat *vegetativně* (nepohlavně) i *pohlavně* (sexuálně). V rámci jejich životního cyklu rozlišujeme životní stádium schopné pohlavního rozmnožování – *teleomorfa* (perfektní, sexuální stádium), a stádium, kdy se rozmnožují pouze vegetativně – *anamorfa* (imperfektní, nepohlavní stádium).

U plísní dochází ke vzniku *dvou typů spor* – vegetativních (nepohlavních) a pohlavních. Vegetativní spory vznikají při nepohlavním rozmnožování, pohlavní spory potom při rozmnožování sexuálním. Dále rozlišujeme vznik spor *thalický*, kdy je vznik spory spojen s rozpadem hyfy (např. artrospory), a *blastický*, kdy se spory tvoří de novo různým způsobem.

16.2.1. Vegetativní rozmnožování

Vegetativní rozmnožování plísní se děje *rozdáváním hyf* a tvorbou *nepohlavních spor*. Vegetativní růst může být buď *polarizovaný* (apikální) – ten je typický pro růst vrcholové části hyf, nebo *nepolarizovaný* – dochází k vývoji tzv. blastických (kvasinkovitých) forem.

Vegetativní spory se tvoří buď na *vegetativních hyfách* nebo na zvláštních *fruktifikačních orgánech*. Spory umístěné vně orgánů se nazývají *exospory (konidie)*, spory tvořící se uvnitř orgánů se označují jako *endospory (sporangiospory)*.

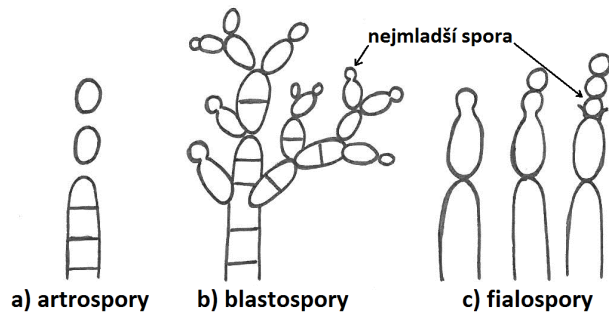
16.2.1.1. Vegetativní exospory

Exospory neboli konidie různých rodů jsou značně odlišné, mají různý tvar – kulovitý, elipsoidní, válcovitý, vřetenovitý, srpkovitý, spirálovitě stočený atd. Mohou být jednobuněčné (*mikrokonidie*) či vícebuněčné (*makrokonidie*). Makrokonidie mohou být umístěny jednotlivě, v řetězcích nebo kulovitých útvarech.

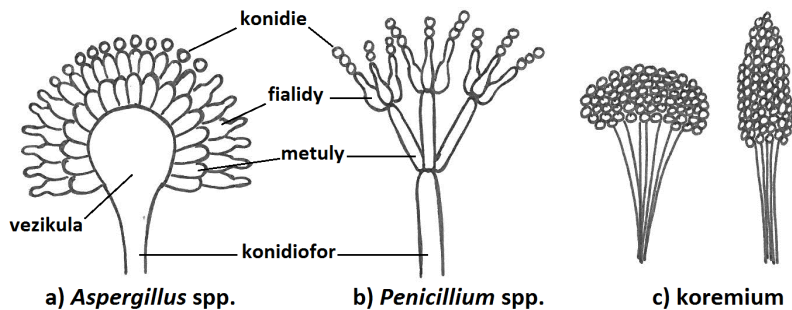
Rozpadem vláken v jednotlivé buňky vznikají tzv. *oidie* neboli *artrospory*, které jsou často silnostěnné, válcovité, soudečkovité či oválné (obrázek 42a).

Další možností vzniku spor je pučení, při kterém vznikají **blastospory**. Blastospory vyrůstají na myceliu jednotlivě, v chomáčcích, hroznech či řetízcích. Pučení s následující tvorbou přehrádek se uplatňuje při tvorbě vícebuněčných spor, které vznikají tzv. **bazifugálně**, kdy nejmladší spora vzniká ze starší na vrcholu řetízku (obrázek 42b). Tento způsob je typický např. pro rody *Cladosporium* či *Alternaria*.

Některé konidie mohou vznikat ze základní buňky **bazipetálním způsobem**, kdy nejmladší konidie je naopak nejbliže základně (obrázek 42c). Tímto způsobem se tvoří např. **fialospory**, které vznikají v řetízcích ze speciální lahvovité buňky, tzv. **fialidy**. Tvorba fialospor je charakteristická pro rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Stachybotrys*, atd.



Obrázek 42: Vznik exospor u plísňí. (Šilhánková, 2002 – upraveno)



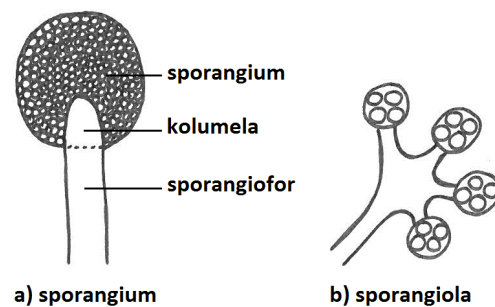
Obrázek 43: Různé druhy konidioforů. (Šilhánková, 2002 – upraveno)

U některých druhů rodů *Penicillium*, *Aspergillus* a dalších plísňí srůstají konidiofory ve svazek označovaný jako **koremium**, který je ukončen paličkou spor (obrázek 43c). U jiných jsou krátké konidiofory umístěny v kulovitém či hruškovitém útvaru nazývaném **pyknidium** či **pyknida**, ze kterého se jednotlivé konidie uvolňují otvorem zvaným **ostiola**.

Zvláštním typem exospor jsou **chlamydospory**, které jsou poměrně odolné vůči nepříznivým podmínkám vnějšího prostředí. Při tvorbě chlamydospor se kolem jednotlivých buněk mycelia vytvoří velmi silný obal a obsah buňky se zahustí. Chlamydospory jsou buď koncové nebo interkalární (vmezežené), vznikají v jednobuněčném myceliu i ve vícebuněčných konidiích (makrokonidiích).

16.2.1.2. Vegetativní endospory

Sporangium (výtrusnice) je vakovitý fruktifikační orgán, ve kterém vznikají endospory označované jako **sporangiospory** (obrázek 44a). Sporangium plísňí má kulovitý, hruškovitý nebo válcovitý tvar a bývá umístěno na zvláštní jednoduché či větvené hyfě – **sporangioforu**. Část sporangioforu, která zasahuje do sporangia, se nazývá **kolumela**, její tvar (polokulovitý, hruškovitý) je dobrým identifikačním



Obrázek 44: Sporangia a sporangiole. (Šilhánková, 2002 – upraveno)

znakem. Některé rody kolumelu postrádají. U některých plísni je sporangium doprovázeno nebo zcela nahrazeno přítomností drobných **sporangiol**, které obsahují pouze 1 až 10 spor (obrázek 44b). Z potravinářsky významných plísni se sporangiospory vyskytují pouze u třídy *Zygomycetes* (např. rody *Mucor* a *Rhizopus*).

16.2.2. Pohlavní rozmnožování

Pro pohlavní rozmnožování plísni je charakteristické **spájení** dvou buněk a produkce **pohlavních spor**. Podobně jako kvasinky, i plísně mohou být homothalické (pohlavně nerozlišené) a heterothalické (pohlavně rozlišené). *Homothalické* rody plísni jsou poměrně vzácné, v jejich případě dochází ke spájení buněk vyrůstajících z téže hyfy. V převážné většině případů se setkáváme s rody *heterothalickými*, které obsahují kmeny dvou pohlavních typů – pohlavního typu (+) a opačného typu (-). U některých plísni jsou samčí a samičí orgány morfologicky rozlišeny.

Rozlišujeme **4 typy pohlavních spor** – oospory, zygospory, askospory a basidiospory. Z potravinářského hlediska jsou však důležité pouze zygospory a askospory.

Při tvorbě **zygospor** dochází nejprve ke kontaktu výběžků hyf (*progametangií*), z konců progametangií se uvolní buňky (tzv. *gametangia*), které se spájí izogamním či heterogamním způsobem. Vzniká zygospora – diploidní buňka se silnou obalovou vrstvou, obvykle tmavé barvy a s nápadnými výrůstky. Při izogamním spájení jsou obě progametangia zhruba stejně velká, při heterogamním je jedno větší. Při klíčení zygospory dojde k meiose, při které však tři haploidní jádra zaniknou a čtvrté se dělí mitosou. Ze zygospory potom vyroste sporangiofor se sporangiem (**zygosporangiem**) obsahujícím haploidní endospory jednoho pohlavního typu. Zygospory se vyskytují pouze u třídy *Zygomycetes*.

Askospory plísni se obvykle tvoří *po osmi* ve **vřecku (asku)**. Asky vznikají většinou z dvoujaderných hyf, které jsou buď volné nebo uloženy ve fruktifikačních orgánech. **Kleistothecium** je uzavřený kulovitý fruktifikační orgán s neuspořádanými asky. **Perithecium** je kulovitý až lahvovitý útvar s paralelně uspořádanými asky, které jsou uvolňovány otvorem (ostiolou). Tvorbě askospor předchází v dvoujaderné buňce karyogamie (spájení jader), vzniká diploidní jádro, které se následně dělí meiosou. Vzniknou čtyři haploidní jádra, která se rozdělí mitosou. Tím vznikne základ pro osm askospor v jednom asku. Asky mohou být buď *uspořádané* (askospory jsou v jedné řadě), nebo *neuspořádané* (shluk kulovitých či elipsoidních askospor). Druhý způsob je typický např. pro rody *Penicillium* či *Aspergillus*.

16.3. Výskyt plísni a jejich význam v potravinářství

Hlavním rezervoárem plísni je půda. Z půdy se šíří typicky vzduchem a kontaminují organický materiál (rostliny), exkrementy zvířat a další předměty, zejména ty uložené ve vlhku. Barviva přítomná ve stěně konidií a endospor, příp. i hyf, je chrání před účinky ultrafialového záření a umožňují tak jejich dobré přežívání.

Podobně jako v případě kvasinek, i růst plísni je ovlivněn jejich **fyzilogickými vlastnostmi**. Plísně, jako aerobní organismy, se obvykle rozmnožují na povrchu napadeného materiálu. Jsou poměrně nenáročné na uhlíkaté živiny, protože je dokáží velmi efektivně využívat, a produkují celou škálu enzymů – sacharolytických, proteolytických i lipolytických. Díky tomu jsou schopny napadat různé druhy organického materiálu (potraviny, dřevo, kůže, tkaniny, některé plasty, atd.), zejména uloženého ve vlhkém prostředí. Plísně také umí využívat vzdušnou vlhkost a okludovanou vodu (vodu chemicky vázanou, která se uvolňuje až za vyšších teplot), což jim umožňuje růst např. i na vlhkém zdivu. K jejich šíření dále přispívá i schopnost růstu v kyselém prostředí či za nízkých teplot.

Podobně jako kvasinky, jsou i plísně poměrně **málo teplotně odolné**, většinou nepřežívají záhřev na teploty 70 – 75 °C po dobu několika minut. Spory některých plísní (rody *Phialophora*, *Paecilomyces* a *Byssochlamys*) zůstávají životaschopné i při působení teploty 85 °C po dobu až 10 minut, a proto jsou schopny přežít i v kyselých sterilovaných potravinách (např. sterilované okurky), které se tepelně ošetřují teplotami do 100 °C, a následně způsobovat jejich kažení.

Díky pomalému růstu, ale současně toleranci k poměrně extrémním podmínkám prostředí (nízká aktivita vody, kyselé pH, nízká teplota), se plísně podílí především na **kažení potravin**, ve kterých jsou nevhodné podmínky pro rozvoj bakterií. Nároky plísní na minimální obsah vody v potravinách jsou, v porovnání s bakteriemi a kvasinkami, téměř poloviční (asi 15 %), plísně se mohou rozmnožovat i při poměrně nízké aktivitě vody. Z těchto důvodů přednostně napadají povrch džemů, marmelád, chleba a dalšího pečiva či zvlhlých potravin (obilí, mouka, mák, atd.). U zvlhlého obilí a mouky vyvolávají neodstranitelný **zatumlý pach**. Plísně jsou schopny napadat i neporušená rostlinná pletiva (slupka ovoce, zeleniny, atd.) a vytváří tak vstupní bránu pro rozvoj bakterií. Plísně velmi často kontaminují a znehodnocují kyselé potraviny – kyselé ovoce, ovocné šťávy, marmelády a džemy. Rody rostoucí při nízkých teplotách (až -10 °C) kontaminují a znehodnocují chlazené a případně i mražené potraviny, jako je maso, máslo, vejce, atd. Zde se uplatňují jejich proteolytické a lipolytické enzymy.

Mimořádný význam má produkce mykotoxinů, kterým je věnována následující podkapitola. Patogenní druhy plísní mohou vyvolat u citlivých jedinců alergické reakce či mykózy, fytopatogenní druhy způsobují vážné škody na zemědělských plodinách.

Na druhou stranu **průmyslové využití** nachází plísně zejména při produkci enzymů (proteínasy, amylasy, celulosy a pektolytické enzymy), antibiotik a organických kyselin (např. kyselina citronová, fumarová, šťavelová). Dále se plísně uplatňují při aerobním čištění odpadních vod či výrobě mikrobiálních insekticidů. V potravinářském průmyslu se kulturní kmeny plísní používají při výrobě některých druhů sýrů (zrající plísňové sýry typu camembert a roquefort), kde umožňují jejich zrání a rozvoj charakteristických sensorických vlastností. Podobně je tomu i v případě některých druhů fermentovaných masných výrobků (např. uherské salámy a některé klobásy). Stručný přehled potravinářsky nejvýznamnějších druhů plísní a jejich využití je uveden v tabulce 10.

Tabulka 10a: Přehled vybraných potravinářsky významných plísní a jejich využití.

1. ZYGOMYCOTINA	
<i>Mucor spp.</i>	- rozsáhlý rod zahrnující více než 100 druhů
<i>M. plumbeus</i>	- tvoří bělavý porost s nahnědlými sporangii
<i>M. racemosus</i>	- vyskytuje se na řadě potravin (chléb, máslo, maso, ovoce, zelenina)
<i>M.ucedo</i>	- druhy kontaminující maso a mléčné výrobky jsou proteolytické
<i>M. pusillus</i>	- využití při průmyslové výrobě alkoholických nápojů ze sóji (anaerobní fermentace sacharidů), produkci proteolytických enzymů (výroba mikrobiálního syřidla) či při hydrolýze škrobu
	- některé druhy produkují mykotoxiny, některé jsou patogenní
<i>Rhizopus spp.</i>	- v přírodě velmi rozšířený, působí kažení ovoce a dalších potravin
<i>R. nigricans</i>	- některé druhy mají průmyslové využití (produkce alkoholických nápojů z obilí - arak, produkce kyseliny fumarové, enzymů, rosení lnu)
<i>R. oryzae</i>	- některé druhy produkují mykotoxiny, některé jsou patogenní (<i>R. oryzae</i>)
<i>Thamnidium spp.</i>	- psychrofilní růst a silné proteolytické schopnosti
	- kažení chlazeného masa a dalších chlazených potravin

Tabulka 10b: Přehled vybraných potravinářsky významných plísní a jejich využití – pokračování.

2. DEUTEROMYCOTINA A ASCOMYCOTINA*	
<p><i>Aspergillus</i> spp. <i>A. niger</i> <i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. fumigatus</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - velmi rozšířený, výskyt na různých materiálech - tvoří plst'ovité či vatovité kolonie, starší kolonie jsou intenzivně zbarvené (konidie jsou dle druhu bílé, žluté, zelené, hnědé nebo černé) - velká enzymová výbava (amylolytické, pektolytické a proteolytické enzymy) - způsobuje kažení různých druhů potravin, osmofilní druhy způsobují kažení džemů, chleba a dalších potravin s nízkým obsahem vody - některé druhy mají průmyslové využití (produkce enzymů s využitím v potravinářském průmyslu či při výrobě pracích prášků, kvasná výroba organických kyselin – např. kyselina citronová či itakonová) - některé druhy jsou patogenní, některé produkují vysoce toxické, karcinogenní a mutagenní mykotoxiny – aflatoxiny (<i>A. flavus</i>, <i>A. parasiticus</i>)
<p><i>Penicillium</i> spp. <i>P. chrysogenum</i> <i>P. camemberti</i> <i>P. roqueforti</i> <i>P. nalgiovense</i> <i>P. expansum</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - nejrozšířenější a nejrozsáhlejší rod, podle uspořádání štětečkovitých konidioforů se dělí na čtyři skupiny - vytváří zelené, sametové až moučné povlaky na různých potravinách (konidie jsou žlutozelené až modrozelené), okraje kolonií bez spor jsou bílé - způsobují kažení různých potravin - skladovaného ovoce (např. zelená plíseň citrusů), jedlých olejů, tuků, másla, olejnatých semen a mastného pečiva (lipolytické druhy), zahuštěných šťáv a marcipánu (osmofilní druhy) - některé druhy mají průmyslové využití (produkce kyseliny citronové, produkce antibiotik, výroba plísňových sýrů či olomouckých tvarůžků) - některé druhy jsou patogenní, jiné vyvolávají alergické reakce - řada druhů produkuje mykotoxiny (např. patulin – způsobuje znehodnocení jablečných moštů a dalších jablečných výrobků)
<p><i>Alternaria</i> spp. <i>A. alternata</i> <i>A. solani</i> <i>A. brassicae</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - tvoří kolonie vláknitého vzhledu zbarvené šedě, zeleně až černě - vyskytuje se na rostlinách, jako vzdušná kontaminace v mlékárnách a pivovarech - způsobuje skvrnitost košťálovin a černou hnilobu mrkve - některé kmeny produkují mykotoxiny
<p><i>Cladosporium</i> spp. <i>C. herbarum</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - starší mycelium je tmavě zbarveno - vyskytuje se na stěnách potravinářských provozoven, ve vinařských a pivovarnických sklepích, dále na chlazeném a zmrazeném mase a vejcích - často parazituje na rostlinách (melanóza jablek) - rozkládá celulosu, pektiny a tuky - některé druhy vyvolávají alergie dýchacích cest
<p><i>Fusarium</i> spp. <i>F. solani</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. moniliforme</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - způsobují kažení hlavně potravin rostlinného původu (jablka, rajčata, brambory, atd.), při vlhkém počasí napadají obilí a způsobují velké ztráty, znehodnocují i plody a potraviny bohaté na tuky (ořechy, máslo, tuky, atd.) - některé druhy jsou fytopatogenní, jiné produkují mykotoxiny (např. T-2 toxin, zearalenon) - jeho askosporový druh <i>Gibberella fujikuroi</i> produkuje růstové látky, tzv. <i>gibereliny</i>, které urychlují klíčení semen a růst rostlin (využití při urychlení klíčení ječmene ve sladovnách)

(zpracováno podle – Görner a Valík, 2004; Šilhánková, 2002)

Pozn.: * – u některých rozsáhlých rodů (např. *Penicillium*, *Aspergillus*) jsou známy jak druhy tvořící askospory, tak druhy, které se rozmnožují pouze vegetativně. Druhy tvořící askospory jsou někdy přefazeny do samostatného rodu, takže imperfektní rod má potom jeden, příp. i více, odpovídajících askomycetních rodů (např. askomycetní rod *Neurospora* odpovídá imperfektnímu rodu *Monilia*).

16.4. Mykotoxiny

Plísně mohou poškozovat lidský organismus mnoha způsoby, jedním z nich je také produkce mykotoxinů. **Mykotoxiny** (z řečtiny *mykes* – houba, *toxikum* – jed) jsou sekundární metabolity mikroskopických hub (mikromycet), nebílkovinné povahy, toxické pro člověka a hospodářská zvířata. Syntéza mykotoxinů bývá zahájena současně s tvorbou konidií. Problematika mykotoxinů zasahuje do mnoha oborů – lékařské, veterinární a potravinářské mikrobiologie, mikrobiologie životního prostředí, atd. Mykotoxiny jsou spojovány s tajemnými a nadpřirozenými jevy (čarodějnictví, vampyrismus). Výrazným stimulem pro hlubší zájem o studium mykotoxinů byl hromadný úhyn krůt v Anglii v 60. letech 20. století související s objevem aflatoxinů.

16.4.1. Producenti mykotoxinů

Asi 50 % druhů plísní významných v potravinářství produkuje mykotoxiny. Známo je přes 350 mykotoxinů. Mykotoxiny pomáhají plísním v obraně vůči konkurenčním organismům, pomáhají při invazi do hostitelských organismů, regulují primární metabolismus a ovlivňují teleomorfní stádia anamorfoou (sexuální hormony). Nejvýznamnější mykotoxiny produkují např. rody *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* a *Stachybotrys* (přehled vybraných mykotoxinů a jejich producentů je uveden v tabulce 11). Ovšem ne všechny kmeny toxigenních druhů plísní jsou schopny mykotoxiny produkovat.

Tabulka 11: Přehled vybraných mykotoxinů a jejich producentů.

Mykotoxin	Producent
Aflatoxiny	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. argentinicus</i> , aj.
Citrinin	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>Aspergillus candidus</i> , aj.
Deoxyvalenol	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. poae</i>
Fumonisin B1	<i>Fusarium proliferatum</i> , <i>F. moniliforme</i> , aj.
Ochratoxin A	<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , aj.
Kyselina penicilová	<i>Paecilomyces</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.
Patulin	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Byssochlamys</i> spp.
Sterigmatocystin	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. nomius</i> , aj.
Zearalenon	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , aj.

Při špatném skladování plísňových sýrů či salámů může v průběhu metabolismu dojít k produkci mykotoxinů i startovacími kulturami, např. *Penicillium camemberti* (kyselina cyklopiazonová), *Penicillium roqueforti* (roquefortiny, kyselina mykofenolová) a *Aspergillus oryzae* (soli kyseliny glutamové). Častým zdrojem mykotoxinů jsou obiloviny, kukuřice, ovoce, zelenina, arašidy, ořechy, káva, sója, koření, atd. Také potraviny živočišného původu mohou obsahovat rezidua mykotoxinů v důsledku příjmu kontaminovaného krmiva hospodářskými zvířaty.

Tvorba mykotoxinů je závislá nejen na druhu plísně, ale také na teplotě (4 až 40 °C), pH (optimum 2,5 až 8), vodní aktivitě (nad 0,80), přístupu ke kyslíku (aerobní podmínky), struktuře substrátu, čase, přísunu energie a nezbytných chemických látek. Produkci mykotoxinů inhibují RNA mykoviry, eugenol, thymol, kofein a fytoalexiny. Ve směsných kulturách produkují mikromycety méně mykotoxinů než jako čisté kultury. Proto samotná přítomnost toxigenních druhů plísní v potravinách ještě neznamená přítomnost mykotoxinů. Pokud je ovšem mykotoxin v potravine již vyprodukovaný, může v potravinové matici přetrvávat ještě dlouho poté, co jeho producent zde už dávno není přítomen. Vyšší koncentrace mykotoxinů v potravinách je v tropech a subtropích.

Pro produkci mykotoxinů platí, že určitý mykotoxin může být produkován zástupci několika rodů toxigenních mikromycet a také, že určitý druh plísně může produkovat dva a více mykotoxinů.

16.4.2. Účinky mykotoxinů

Onemocnění způsobené požitím mykotoxinů mohou mít celou řadu **klinických projevů**. Na člověka mohou mykotoxiny působit *hepatotoxicky* (aflatoxiny, sterigmatocystin), *hematotoxicky* (aflatoxiny, ochratoxin A, zearalenon, trichotheceny), *nefrotoxicky* (ochratoxin A, citrinin), *neurotoxicky a myotoxicky* (tremorgeny, citreoviridin), *dermatotoxicky* (psoraleny, trichotheceny), *genitotoxicky* (zearalenony), *genotoxicky* (aflatoxiny, ochratoxin A, citrinin, zearalenon, patulin, trichotheceny, fusarin C), *imunotoxicky* (aflatoxiny, ochratoxin A, patulin, trichotheceny) a jako *toxiny dýchací soustavy* (patulin) a *zažívacího traktu* (T-2 toxin a další trichotheceny).

Podle **účinku na buňku** se mykotoxiny rozdělují například na *inhibitory tvorby energie* (citreoviridin, maniliformin), *inhibitory proteosyntézy* (trichotheceny, ochratoxin A), *modifikátory cytoskeletu* (griseofulvin), *estrogenní mykotoxiny* (zearalenon), *tremorgeny* (penitremy), *teratogeny* (aflatoxin B, ochratoxin A, citrinin), *mutageny* (aflatoxin B, sterigmatocystin, fusarin C) a *karcinogenní mykotoxiny* (aflatoxin B).

Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC/WHO) hodnotí **aflatoxin B₁** jako prokázaný karcinogen pro člověka. Tento mykotoxin je schopný vyvolat hepatocelulární karcinom způsobený bodovou mutací tumorsupresorového genu pro protein p53 regulujícího buněčný cyklus.

Některé mykotoxiny mají insekticidní (např. aflatoxin B, kyselina fusariová, citrinin) nebo antimikrobiální (patulin, kyselina mykofenolová, citrinin) účinek. Zearalenon funguje s cAMP jako fungální sexuální hormon.

16.4.3. Mykotoxikózy

Toxickým působením na jednotlivé orgány způsobují mykotoxiny řadu onemocnění člověka a zvířat. Onemocnění způsobené požitím mykotoxinů se nazývají **mykotoxikózy**. Po požití vysokých dávek mykotoxinů vznikají akutní primární mykotoxikózy. Významné je riziko permanentní expozice mykotoxiny při konzumaci specifické jednostranné stravy (vegetariáni, samozásobitelé potravin), kdy je organismus opakovaně vystaven velmi malým dávkám mykotoxinu. Mezi nejstarší popsané mykotoxikózy patří ergotismus, alimentární toxická aleukie, akutní kardiální beri-beri a aflatoxikóza.

Ergotismus byl popsán již r. 430 př.n.l jako Athénský mor, ve středověku jako nemoc sv. Antonína. Tuto mykotoxikózu vyvolávají alkaloidy *Claviceps purpurea*. Vaskulární forma způsobuje odumření akrálních částí těla a oslepnutí, psychotropní halucinace. **Alimentární toxická aleukie (ATA)** je způsobeno T-2 toxinem a příbuznými trichotheceny produkovány především *Fusarium spp.* ATA se projevuje zvracením, průjmami, záněty sliznic, poklesem leukocytů a trombocytů, krvácením, postižením krčních mandlí a doprovodnou bakteriální infekcí. **Akutní kardiální beri-beri** se projevuje křečemi a vzestupnou paralýzou. Je způsobena mykotoxinem citreoviridinem produkováným plísní *Penicillium citreoviride* v rýži. Smrtelnou komplikací je zástava srdce v diastole.

Další onemocnění, na kterých se mimo jiné také mohou podílet mykotoxiny, jsou Reyův syndrom, kwashiorkor, primární hepatom, karcinom jícnu a ledvin, hyperestrogenismus, ergotismus, toxická hepatitida, chronická gastritida, balkánská endemická nefropatie, pelagra, mentální retardace dětí, cirhóza dětí v Indii, atd.

POUŽITÁ LITERATURA

- ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. (eds.) *Základy buněčné biologie (Úvod do molekulární biologie)*. 1. vyd. Ústí nad Labem, ČR: Espero Publishing, s.r.o. 2005. 630 p.
- ANONYMUS. *Hodnoty pH a a_w v potravinách živočišného původu*. SVÚ Jihlava. 2008.
- BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie*. Dotisk 1. vyd. Praha, ČR: Nakladatelství Marvil. 1996. 558 s.
- GÖRNER, F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiologie požívatin*. 1. vyd. Bratislava, SR: MALÉ CENTRUM. 2004. 528 s.
- JANŠTOVÁ, B., VORLOVÁ, L., NAVRÁTILOVÁ, P., KRÁLOVÁ, M., NECIDOVÁ, L., MAŘICOVÁ, E. *Technologie mléka a mléčných výrobků*. 1. vyd. Brno: VFU Brno. 2012. 141 s.
- JAY, J.M. *Modern Food Microbiology*. 4th ed. New York, USA: Chapman & Hall, 1992. 661 p.
- KANGO, N. *Textbook of Microbiology*. 1st ed. New Delhi, India: I. K. International Pvt Ltd. 2010. 436 p.
- KAPRÁLEK, F. *Základy bakteriologie*. 1. vyd. Praha, ČR: Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum. 2000. 241 s.
- KNOWLES, T. *Food Safety in the Hospitality Industry*. 1st ed. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann. 2002. 339 p.
- KUMAR, S. *Textbook of Microbiology*. 1st ed. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publisher (P) Ltd. 2012. 784 p.
- LÁZNIČKA, R., MELKA, J., PEŘINA, M. Hygiena a sanitace v oboru zpracování masa. *Maso*, 2014, roč. 25, č. 3, s. 7-12.
- LEISTNER, L., GORRIS, L.G.M. Food Preservation by Hurdle Technology. *Trends in Food Science & Technology*, 1995, vol. 6, no. 2, p. 41-46.
- LEISTNER, L. Basic Aspects of Food Preservation by Hurdle Technology. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, vol. 55, no. 1-3, p. 181-186.
- MARTHUR, J.V. *Microbial Ecology: An Evolutionary Approach*. 1st ed. Burlington, USA: Academic Press. 2006. 432 p.
- MEHROTRA, R.S., SUMBALI, G. *Principles of Microbiology*. 1st ed. New Delhi, India: Tata McGraw-Hill Education. 2009. 924 p.
- NEČAS, O. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. Jinočany, ČR: H & H Vyšehradská. 2000. 554 s.
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, F., VALERO, A. *Predictive Microbiology in Food*. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition. Volume 5. 1st ed. New York, USA: Springer Science & Business Media. 2013. 128 p.
- QUEROL, A., FLEET, G.H. (eds.) *Yeasts in Food and Beverages. (The Yeast Handbook)*. 1st ed. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. 2006. 453 p.
- RAY, B., BHUNIA, A. *Fundamental Food Microbiology*. 5th ed. Boca Raton, USA: CRC Press. 2013. 663 p.
- ROSYPAL, S. *Úvod do molekulární biologie* (1. díl). 3. inov. vyd. Brno, ČR: Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, Dr.Sc. 2003. 289 s.
- ROSYPAL, S. *Úvod do molekulární biologie* (3. díl). 3. inov. vyd. Brno, ČR: Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, Dr.Sc. 2002. 297 s.
- ROSYPAL, S., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., KAILEROVÁ, J., RELICHOVÁ, J., RŮŽIČKOVÁ, V., ŠMARDA, J. ml., ŠMARDA, J., STĚPÁN, J. *Terminologie molekulární biologie*. 1. vyd. Brno, ČR: Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, Dr.Sc. 2001. 289 s.
- ROSYPAL, S., HOĐÁK, K., MARTINEC, T., KOCUR, M. *Obecná bakteriologie*. 1. vyd. Praha, ČR: Státní pedagogické nakladatelství v Praze. 1981. 749 s.

SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno, ČR: Masarykova univerzita. 2007. 270 s.

SCHINDLER, J. Mikrobiální biofilm. *Vesmír*, 2001, roč. 80, č. 4, s. 203-206.

ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. revid. vyd. Praha, ČR: Academia. 2002. 363 s.

VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 1. vyd. Brno, ČR: Neptun. 2001. 247 s.

VOTAVA, M., ČERNOHORSKÁ, L., HEROLDOVÁ, M., HOLÁ, V., MEJZLÍKOVÁ L., ONDROVČÍK, P., RŮŽIČKA, F., DVOŘÁČKOVÁ, M., WOZNICOVÁ, V., ZAHRADNÍČEK, O. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Brno, ČR: Neptun. 2003. 495 s.

WALKER, G.M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. 1st ed. Chichester, England: JohnWiley & Sons Ltd. 1998. 362 p.

URL 1: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d2/Yeast_lifecycle.svg/1000px-Yeast_lifecycle.svg.png

URL 2: <http://www.biotox.cz/toxikon/mikromycety/trideni.php>

Autoři:	MVDr. Šárka Bursová, Ph.D. MVDr. Lenka Necidová, Ph.D. Mgr. Marta Dušková, Ph.D.
Název:	Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody. Obecná mikrobiologie
Ústav:	Ústav hygieny a technologie mléka
Počet stran:	114
Vydání:	1.
Povoleno:	Rektorátem VFU Brno
Podpořeno:	Projektem OP VK reg. č. CZ.1.07/2.2.00/28.0287
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

ISBN 978-80-7305-742-8