

## **Růst a množení bakterií (buněčný cyklus, růstová křivka), vliv vnitřních a vnějších faktorů na růst mikroorganismů**

### **Rozmnožování bakterií**

- většina bakterií se rozmnožuje dělením
- několik rodů se rozmnožuje pučením (způsob je typický pro množení kvasinek)
- u gramnegativních bakterií (*Escherichia coli*, salmonel, pseudomonád) bylo popsáno spájení buněk – tzv. konjugace

### **Růst bakterií**

#### Planktonní růst

- růst v podobě izolovaných buněk

#### Růst v podobě biofilmu

- strukturované mikrobiální společenství, uložené v mezibuněčné hmotě a adherující k inertním i živým povrchům
- i několik druhů bakterií
- biofilmy jsou tvořeny buňkami produkujícími extracelulární polymerní látky (mikrobiální exopolysacharidy) - slizovitá mezibuněčná hmota
- tvoří systém kanálků, jimiž proudí voda s živinami

### **Růstový cyklus bakterií**

- začíná oddělením dceřinné buňky od rodičovské a končí jejím rozdělením na dvě buňky dceřinné

#### Životní cyklus bakteriální buňky zahrnuje

- Růst buňky
- Replikace DNA
- „Jaderné“ dělení – prostorové oddělení obou molekul DNA
- Buněčné dělení – tvorba septa, rozdělení mateřské buňky na dvě buňky dceřinné

#### Růst buňky

- růst buňky → intenzivní syntéza makromolekul (především bílkovin), tvorba buněčných struktur
- dosáhne-li bakteriální buňka kritické velikosti (poměr bílkovin k DNA) dochází k zahájení replikace DNA (konec iniciační periody)
- nastává pravidelně v intervalech rovných generační době

#### Replikace DNA

##### Probíhá ve třech fázích:

- Iniclace (zahájení replikace)
- Elongace (vlastní replikace)
- Terminace (ukončení replikace)

Výsledkem je vznik dvou kruhových molekul DNA, přičemž každá obsahuje jeden původní a jeden nově syntetizovaný řetězec.

- DNA polymeráza - nejdůležitější enzym replikačního aparátu
- má dvě funkce – polymerační ve směru od konce 5' → 3' a nukleázovou ve směru 3' → 5'

#### Při replikaci vzniká

- vlákno vedoucí (DNA polymeráza syntetizuje vlákno pouze jedním směrem 5' -3') - kontinuální
- vlákno zaostávající (krátké fragmenty spojované ligázou) – Okazakiho fragmenty
- replikace končí syntézou terminačních proteinů

## Dělení buňky

- bakteriální chromozom je připoután svým počátkem k cytoplazmatické membráně a buněčné stěně
- k prostorovému oddělení mateřského a dceřiného chromozomu dochází růstem membrány a stěny mezi místy přichycení rodičovských vláken obou chromozomů - tvorbou příčného septa
- dceřinné buňky se mohou zcela oddělit, nebo zůstávají spojeny do různých útvarů (např. dvojice, řetízky)

## Generační doba

- je délka růstového cyklu
- doba od vzniku konkrétní (individuální) buňky do jejího rozdělení na 2 dceřiné buňky

## Doba zdvojení (T):

- průměrná doba, za kterou se počet bakterií v populaci zdvojnásobí

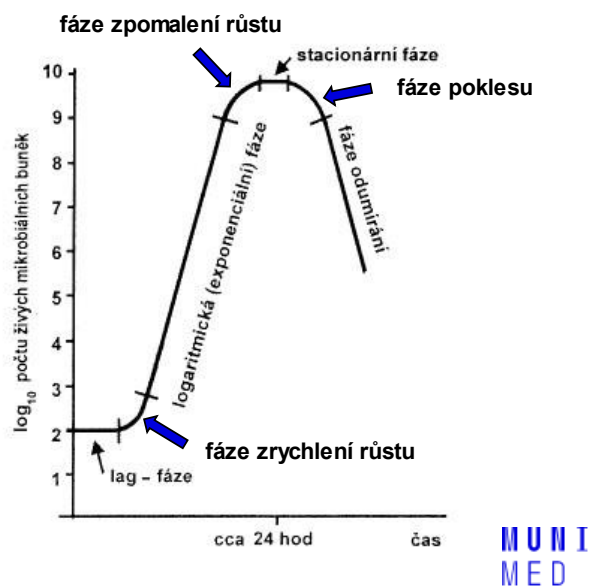
U *Escherichia coli* je **udávána generační doba 20 minut** při dostatku živin, optimálním pH a teplotě 37 °C (při 30 °C se prodlouží na 1 h).

Generační doba *Mycobacterium tuberculosis* je udávána na 18-24 hodin, opět za optimálních růstových podmínek.

## Růstová křivka

- grafické znázornění koncentrace biomasy (počtu bakteriálních buněk) v závislosti na čase

### Statická kultivace bakterií



10

## Dvojitá růstová křivka – diauxie

- zdrojem uhlíku je směs dvou rozdílných organických látek
- bakterie využívá výlučně jednu z nich, až po jejím vyčerpání následuje využívání látky druhé
- růst *E. coli* v prostředí s glukózou a sorbitolem

## Kontinuální kultivace

- stálý přívod živin a odvod zplodin metabolismu umožňuje udržení bakteriální populace v logaritmické fázi po neomezeně dlouhou dobu
- fermentory
  - využívány v potravinářském, farmaceutickém a biotechnologickém průmyslu pro produkci potravin (např. pivo), specifických chemických látek nebo produkci biomasy

### Faktory ovlivňující růst a množení bakterií

Růst je cyklický proces, jehož rychlost závisí na různých faktorech, např.:

- dostupnost vody
- dostupnost živin
- teplota
- osmotický tlak
- hydrostatický tlak
- koncentrace vodíkových iontů (pH)
- oxido-redukční potenciál
- záření

### Růst mikroorganismů v potravinách

- v potravinách ovlivňují druh a rychlost množení mikroorganismů vnitřní a vnější faktory
- vnitřní faktory - fyzikálně-chemické vlastnosti potraviny
  - Složení potraviny
  - pH
  - Aktivita vody
  - Oxidačně-redukční potenciál
  - Textura
  - Antimikrobiální látky v potravinách
- vnější faktory – podmínky skladování potravin
  - Podmínky zpracování a skladování potravin
  - Teplota
  - Relativní vlhkost vzduchu
  - Složení atmosféry
  - Doba skladování potravin

### Složení potraviny

- obsah vody
- zdroje energie (sacharidy, alkoholy, aminokyseliny)
- zdroje dusíku (proteiny, peptidy, aminokyseliny)
- obsah vitamínů a růstových faktorů (vitamíny sk. B)
- obsah minerálních látek

Potraviny obsahující více nízkomolekulárních látek a větší množství vody se kazí rychleji (nízkomolekulární látky jsou metabolizovány přímo)

### pH

Bakterie: většina roste při pH 6,6 - 7,5

- minimální hodnota pH pro většinu bakterií (mnohé bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, druhy rodu *Bacillus*, které se zúčastňují při kažení potravin) je 4,4 - 4,6
- bakterie octového kvašení (*Acetobacter acidophilus*) - 2,6 - 6,3
- bakterie mléčného kvašení (laktobacily) - 5,5 - 6

Kvasinky: kyselé prostředí, optimum pH 4,2 - 5,5

Plísně: širokém rozmezí pH (1,2 - 11,0), optimum při neutrálním pH

- mikroorganismy alkalifilní (urobakterie, denitrifikační bakterie), acidofilní (plísně)

### Vliv hodnoty pH na:

- rozmnožování bakterií, rychlost růstu a vitalitu
- intenzitu a charakter metabolismu
- propustnost cytoplasmatické membrány (transport látek)
- změnu dostupnosti kovových iontů v alkalickém prostředí
- termorezistenci bakterií (maximální při optimálním pH)
- klíčení bakteriálních spor (při  $\text{pH} < 4,0$  spory neklíčí proto se např. ovocné kompoty či zelenina v kyselém nálevu ošetřují teplotami do  $100^{\circ}\text{C}$ )

Vliv má nejen nízká hodnota pH, ale i druh kyselin, které se na snížení hodnoty podílely.

### Hodnota pH potravin

- určuje druhy mikroorganismů schopných se v dané potravine rozmnožovat, působit kažení či představovat zdravotní riziko
- řada potravin je přirozeně kyselých (fermentované mléčné a masné výrobky, kysané zelí)
- kyseliny mohou být do potravin záměrně přidávány nebo jsou produkovány enzymatickou činností mikroorganismů

### Aktivita vody - $a_w$

- mikroorganismy potřebují pro látkovou přeměnu vodu
- snižování obsahu vody v buňce způsobuje zpomalení růstu, za nepřítomnosti vody se látková přeměna zastaví, některé mikroorganismy i odumírají
- některé složky potravin, jako sůl, cukr, bílkoviny, mohou vodu vázat natolik, že ji mikroorganismy nemohou využít pro svůj metabolismus
- používá se pro vyjádření míry využitelnosti vody pro mikroorganismy
- vyjadřuje poměr parciálního tlaku vodních par nad substrátem, vztaženým ke tlaku vodních par nad destilovanou vodou
- zvýšení osmotického tlaku prostředí vede k snížení  $a_w$  uvnitř buňky
- čistá voda má  $a_w = 1,0$
- snížila-li se množství využitelné vody, je hodnota  $a_w < 1,0$
- optimální hodnota  $a_w$  je pro většinu mikroorganismů  $a_w > 0,98$
- mikroorganismy ke svému životu potřebují určité minimální množství volné vody v potravinách, tj. minimální  $a_w$
- hranice růstu většiny mikroorganismů  $a_w < 0,60$ 
  - 0,93 dolní hranice bakterií
  - 0,88 dolní hranice kvasinek
  - 0,80 dolní hranice vláknitých hub
  - 0,61 xerofilní houby

Mikroorganismy - xerotolerantní: tolerance vůči nízkým hodnotám  $a_w$

- osmotolerantní: tolerance vůči vysokému osmotickému tlaku

- halotolerantní: tolerance vůči soli

Snížení aktivity vody:

- odstranění využitelné vody sušením, uzením, odpařením, mražením
- zvýšení obsahu tuku
- zvýšení koncentrace rozpuštěných látek (cukry-sacharóza, NaCl) v prostředí → zvýšení osmotického tlaku (hypertonické prostředí) → difuze vody z buňky do prostředí → zastavení metabolismu až smrt buňky

- minimální hodnoty  $a_w$ , které mikroorganismy potřebují pro svůj růst jsou spoluurčované i dalšími faktory prostředí: pH, teplota, parciální tlak kyslíku

### **Oxidačně redukční potenciál**

- každé prostředí vykazuje určitý oxidačně redukční potenciál (Eh)
- jeho hodnota je závislá na poměru oxidovaných a redukovaných látek
- tento poměr je ovlivněn chemickým složením potraviny a parciálním tlakem  $O_2$  v potravine
- oxidační proces je definovaný odevzdáváním elektronů, redukční proces jejich přijímáním
- oxidované prostředí vyhovuje aerobům (Eh 200 mV a vyšší – mléko, potraviny rostlinného původu), při svém metabolismu redox potenciál snižují.
- anaeroby vyžadují nízký redox potenciál (Eh 0 a méně mV – konzervy, zrající sýry)
- mezi tím jsou fakultativně anaerobní mikroorganismy

### **Redox potenciál se snižuje v potravinách:**

- přidáním látek s redukční schopností (např. k. askorbová)
- růstem mikroorganismů spotřebovávajících kyslík (aerobní bakterie)
- tvorbou redukujících zplodin metabolismu anaerobních bakterií
- vakuovým balením

### **Redox potenciál se snižuje v potravinách:**

- přidáním látek s redukční schopností (např. k. askorbová)
- růstem mikroorganismů spotřebovávajících kyslík (aerobní bakterie)
- tvorbou redukujících zplodin metabolismu anaerobních bakterií
- vakuovým balením

### **Textura**

- povrch mnoha potravin vytváří přirozené krytí, které potravinu chrání před kontaminací mikroorganismy

### **Příklady**

- skořápka vajec nebo ořechů
- kůže na povrchu ryb a masa
- vazivová pouzdra orgánů a povázky masa
- kůrka na povrchu pečiva
- slupky na ovoci

### **Antimikrobiální látky v potravinách**

- přirozené antimikrobiální látky zabraňují růstu a množení mikroorganismů
- potraviny s obsahem esenciálních olejů (eugenol v hřebíčku, allicin v česneku, alylisoithiokyanát v hořčici, isothymol a thymol v oreganu, atd.)
- brusinky – obsahují k. benzoovou – potlačuje růst plísní
- kravské mléko - laktoferin, laktoperoxidasový systém, lysozym, kasein
- vejce - lysozym, ovotransferin, avidin

### **Antimikrobiální enzymy**

- jsou hojně rozšířeny v přírodě a hrají důležitou roli při obranných mechanismech živých mikroorganismů proti infekcím

Hydrolasy – degradují klíčové struktury buněčných stěn (peptidoglykan)

- lysozym - aktivní zejména vůči gram pozitivním bakteriím

Oxidoreduktasy – vytváří reaktivní molekuly, které rozrušují vitální proteiny v buňce

- glukosooxidasy - jsou produkovány některými plísněmi, podstata cytotoxicity spočívá v tvorbě peroxidu vodíku (oxidace glukosy na k. glukonovou a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- laktoperoxidasy - vyskytují např. ve slinách, mléce (za přítomnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dochází k oxidaci thiokyanátu na hypothiokyanát), bakteriocidní účinek na gramnegativní, na gram pozitivní bakteriostatický

### **Teplota**

- jeden z hlavních faktorů ovlivňující rychlost rozmnožování a přežívání mikroorganismů

Podle optimální růstové teploty se mikroorganismy zařazují do 4 skupin:

1. Psychofilní bakterie : 12 – 15<sup>0</sup> C
2. Psychrotrofní bakterie: 25 – 30<sup>0</sup> C
3. Mezofilní bakterie: 30 – 40<sup>0</sup> C
4. Termofilní bakterie: 55 – 75<sup>0</sup> C

Psychofilní mikroorganismy se adaptovaly na nízké teploty a při vyšších nerostou (> 20<sup>0</sup> C).

### **Vliv vysokých teplot**

#### **Letální teplota**

- nejnižší teplota, při které dochází za určitý čas k usmrcení mikroorganismů
- obecně teplota 70 °C po dobu 10 minut (např. tepelné opracování masných výrobků)
- vegetativní buňky mikroorganismů jsou ničeny při teplotách o 10 až 15 °C vyšších, než je jejich růstové optimum
- spolehlivě jsou zničeny při 100 °C/10 minut
- bakteriální spory – výrazně odolnější (stavba protoplastu, dehydratace, atd.)

Dochází k narušení semipermeability cytoplazmatické membrány, degradace RNA, denaturace bílkovin, inaktivace enzymů

#### **Letální teplota závisí na:**

- druhu mikroorganismu
- jeho fyziologickém stavu (stáří, růstová fáze)
- koncentraci buněk (tj. počtu mikroorganismů)
- jejich uspořádání (např. shluky stafylokoků)
- charakteru prostředí (potraviny)

#### **Termorezistenci mikroorganismů ovlivňuje:**

- růstová fáze (exponenciální x stacionární a lag fáze)
- optimální teplota růstu (psychofilní x mezofilní)
- a<sub>w</sub> a vlhkost prostředí (suché x vlhké prostředí)
- pH prostředí
- obsah ochranných látek
- genetická výbava

### **Vliv nízkých teplot**

- nejdřív je zastaveno rozmnožování, poté metabolismus
- u řady mikroorganismů je růst zastaven při teplotě nad bodem mrazu
- některé plísně mohou růst i při  $-5\text{ °C}$ , se sníženou intenzitou až do  $-10\text{ °C}$  (velmi dlouhá lag fáze - dny, týdny až měsíce)
- nižší než optimální teploty přežívá řada mikroorganismů dlouhou dobu
- morfologické změny mikroorganismů
- G+ bakterie jsou odolnější než G-
- 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 přítomnost ochranných látek

### **Chlazení**

- teplota neklesá pod  $0\text{ °C}$
- délka skladování závisí na teplotě, druhu potravin, proudění vzduchu a jeho vlhkosti
- chladový šok přenesení intenzivně se množících mikroorganismů z optimálních teplot do teploty kolem  $0\text{ °C}$  (část odumírá, část je reverzibilně poškozena)
- odolnost mikroorganismů ovlivňuje dostatek živin, pH,  $a_w$

### **Mrazení**

- použití teplot pod  $0\text{ °C}$
- pomalé zmrazování: z vnitro i mimobuněčné vody se tvoří velké krystaly ledu, které bakteriální buňku nevratně poškozují
- rychlé zmrazování: vytvořené mikrokrystalky ledu buňky poškozují jen minimálně, teploty  $-30\text{ °C}$  až  $-180\text{ °C}$ ; uchovávání mikroorganismů
- krystaly vody působí mechanicky, současně se snižuje aktivita vody (mrzne volná voda)

### **Složení atmosféry**

- úprava složení atmosféry má při skladování potravin ochranný účinek
- určuje dominantní typ mikroorganismů
- vakuové balení (inhibice růstu aerobních MO)
- balení v řízené nebo modifikované atmosféře
- balení v ochranné atmosféře inertního plynu (dusík, oxid uhličitý)

### **CO<sub>2</sub>**

- brání růstu aerobní mikroflóry, má ochranný účinek proti růstu kvasinek a plísní, vyšší koncentrace inhibují i klíčení spor plísní
- používá se při skladování ovoce a zeleniny, nesmí se používat pro potraviny s vysokým obsahem tuku, protože má silné antioxidační účinky a způsobuje žluknutí tuků

### **Relativní vlhkost prostředí**

- vysoká relativní vlhkost ( $R_v$ ) prostředí ovlivňuje aktivitu vody potravin
- čím vyšší je teplota, tím nižší musí být  $R_v$  prostředí a naopak, aby se údržnost potravin zvýšila
- potraviny s  $a_w$  pod 0,60 je nezbytné skladovat v suchém prostředí

## Čas

- čím delší je doba působení daných faktorů na mikroorganismy, tím výraznější je jejich účinek
- např. čím delší je doba působení vyšší teploty, tím vyšší je počet inaktivovaných bakterií
- vzájemné působení vnějších i vnitřních faktorů

K dalším faktorům, které mají vliv na mikroorganismy patří:

- tlak
- záření
- povrchové napětí
- ultrazvuk
- elektrický proud
- mikrovlnný ohřev
- působení desinfekčních prostředků

## Tlak

- Rozmnožování mikroorganismů je většinou za normálního atmosférického tlaku.
- Zvýšením tlaku na 10 až 20 MPa se rozmnožování mikroorganismů zpomaluje, při 30 až 40 MPa se zastaví.
- Pro usmrcení mikrobů je zapotřebí tlaku kolem 600 až 700 MPa
- Spory rodu *Bacillus* však nejsou usmrceny ani při hodinovém působení tlaku 1700 Mpa.
- Některé bakterie se dobře rozmnožují i při tlaku 60 Mpa – **barofilní x barotolerantní** (v hlubinách moří).
- Vysoký tlak nepříznivě působí na syntézu buněčné stěny, způsobuje anomálie v dělení buněk.

## Záření

Elektromagnetické vlnění různých délek se značně liší svými účinky na mikroorganismy.

Hertzovy vlny a infračervené záření

- nejdelší vlnové délky, nemá letální účinek na mikroorganismy, působí tepelnými účinky

Viditelné světlo (380 – 760 nm)

- využíváno fototrofními mikroorganismy jako zdroj energie, indukce karotenoidních barviv je také indukována světlem, řada bakterií se rozmnožuje lépe za tmy než za světla, fototropismus u některých plísň (sporangia se obracejí ke zdroji světla)

Ultrafialové záření (210- 310 nm)

- má silné mutagenní a letální účinky, malá pronikavost

Ionizující záření ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )

- mají silné mutagenní a letální účinky, vysoká pronikavost
- přímé působení na DNA i prostřednictvím volných radikálů, indukují zlomy chromozomů

Odolnost mikroorganismů:

nejcitlivější jsou G- bakterie → G+ bakterie → kvasinky a plísně

Přítomnost vzdušného kyslíku zvyšuje citlivost mikroorganismů, zatímco sloučeniny silně redukující působí ochranně, stejně jako zmrazené nebo vysušené prostředí( je omezen vznik radikálů vody).



### **Povrchové napětí**

Některé mikroorganismy se špatnou smáčitelností buněk rostou v tekutinách ve formě blanky (křísu) – např. plísně.

Povrchově aktivní látky (tenzidy) jsou sloučeniny, jež obsahují jak hydrofobní tak hydrofilní část molekuly – snižují povrchové napětí prostředí.

Anionaktivní tenzidy

- alkylsulfáty a alkylsulfonáty, ve vyšších koncentracích poškozují cytoplazmatickou membránu, denaturace bílkovin

Kationaktivní tenzidy

- kvarterní amoniové nebo pyrimidinové soli, silné mikrobicidní účinky, smáčecí schopnost je však malá

Neionogenní tenzidy:

- ani ve vysokých koncentracích nepůsobí na mikroorganismy nepříznivě (Tween)

### **Ultrazvuk**

- Zvukové vlny o frekvenci vyšší než 20 kHz působí na bakterie letálně pouze při vysoké intenzitě.

Kavitační ultrazvuk

- ultrazvuk o vysoké intenzitě a nízkém kmitočtu
- působí na mikroorganismy letálně, vzniká prudká pulsace buněčných membrán a plazmy, tím se snižuje nebo zvyšuje tlak
- nejcitlivější jsou dlouhé tyčinkovité a vláknité mikroorganismy, koky a kvasinky jsou poměrně odolné

### **Elektrický proud**

- Střídavý elektrický proud o malé intenzitě (30 –100 mA) nemá na mikroorganismy nepříznivý vliv, může mírně stimulovat jejich metabolismus a růst.
- Stejnoseměrný elektrický proud může mikroorganismy nepříznivě ovlivňovat elektrolytickými účinky (vznik mikrobicidních sloučenin při elektrolýze v prostředí).

### **Mikrovlnný ohřev**

- založen na tepelném účinku energie elektromagnetického záření velmi vysoké frekvenci
- mikrovlny působí rotací molekul vody → teplo
- další teplo vzniká migrací iontů solí v potravině
- hloubka průniku, homogennost výrobku

Mikrovlnná energie inaktivuje mikroorganismy podobně jako tepelné ošetření, účinnost je nižší (kratší doba působení, vznik teplých a chladných míst ve výrobku).

### **Desinfekční látky**

- antimikrobiální látky s mikrobistatickými (zastavení růstu mikroorganismů) nebo mikrobicidními (usmrcení mikroorganismů) účinky

Sanitace = čištění a dezinfekce

- čištění – odstranění nečistot a zbytků organického materiálu
- dezinfekce – odstranění mikroorganismů

Důležité je dodržovat teplotu a dobu působení čistících a desinfekčních prostředků!

Mechanismy působení desinfekčních prostředků: oxidace, hydrolýza, tvorba solí s bílkovinami, koagulace bílkovin, změny permeability, poškození enzymatického systému, mechanická disrupce.

### Kyseliny

- účinkují vlivem pH a činností nedisociovaných molekul
- HNO<sub>3</sub>, organické perkyseliny (kyselina peroctová–Persteril)

### Alkalie

- destrukce mikroorganismů je dána aktivitou hydroxylových iontů
- nejúčinnější KOH, NaOH a NH<sub>4</sub>OH

### Oxidační činidla

- kyslík ve stavu zrodu je schopný rychle oxidovat organické látky
- chlor a jeho sloučeniny (hypochloridy, chloraminy), sloučeniny jodu (jodofory, jodonaly), manganistan draselný, peroxid vodíku

### Povrchově aktivní látky

- zvlhčovačla, detergencie, emulgátory, kvartérní amonné báze (Ajatin, Septonex)

### Alkoholy

- koagulují ve vyšší koncentraci protoplazmu a odvodňují buňku
- ethylalkohol je nejúčinnější v 50 - 70% koncentraci