

## Vliv činitelů prostředí na klíčení bakteriálních spor a na jejich další vývoj

V. VINTER, V. ZALA BÁK, J. BABIČKA, J. ŠTASTNÁ

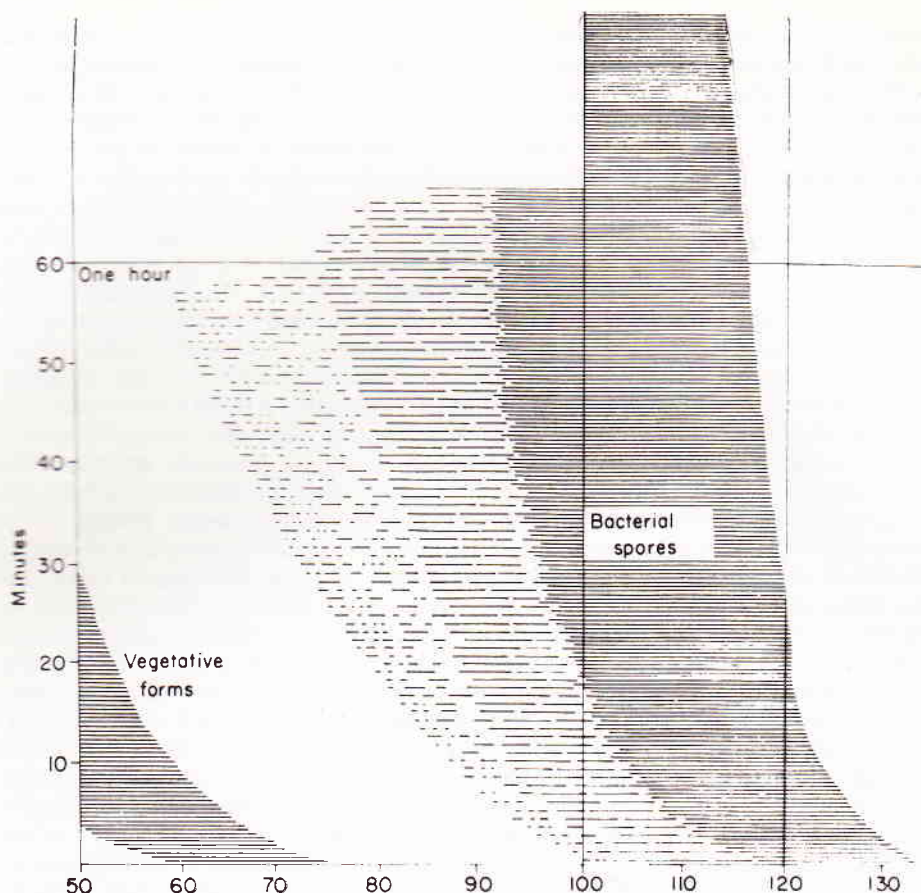
K prevenci množení a nežádoucích syntetických i degradačních aktivit mikroblů musíme znát spolehlivě především množství i kvalitu mikrobiálních kontaminantů ve vzorcích potravinářských surovin. Tato elementární mikrobiologická kontrola je tím složitější, jsou-li kontaminanti obdařeni vysokou odolností vůči drastickým inaktivačním faktorům, schopností přežívat ve zcela kryptobiotickém nebo tzv. superdormantním stavu. Neméně důležitými kontaminanty jsou ty mikroby, které za nevhodných nutričních podmínek po krátkodobé manifestaci nežádoucích syntetických nebo degradačních aktivit mohou vytvářet znovu přechodné hypometabolické, případně i rezistentní buněčné formy. Ty pak mohou v daném materiálu přežívat v neaktivní formě, avšak při změně podmínek prostředí mohou obnovit svůj nový vegetativní cyklus a své biochemické aktivity. Téměř všechna tato kritéria splňují aerobní i anaerobní sporulanti, bacily a klostridia. O problému všestranné rezistence bakteriálních spor není nutno v tomto kolektivu odborníků mnoho hovořit. Je obecně známo, a dnes je již samozřejmé, že veškeré sterilizační procedury jsou již nakalibrovány právě na vysoce rezistentní spory bakterií. Těchto vyjimečných buněčných forem mikroorganismů se běžně používá jako umělých kontaminantů při všech ověřovacích testech nových inaktivačních, jednoduchých i kombinovaných metod. V potravinářství jsou spory bacilů a klostridií používány jako test-organismy již proto, že některé druhy sporulantů jsou přirozenými kontaminanty potravinářských surovin. Nechybí mezi nimi ryze patogenní mikroorganismy, na př. *Clostridium botulinum*, *Cl. perfringens*, *Bacillus anthracis*, některé kmeny *Bacillus cereus* atd. Mezi sporulanty je i značné množství nepatogenních bakterií, které v postgerminačním období a při vegetativním množení jsou značně biochemicky aktivní a uskutečňují výrazné nežádoucí změny v potravinářské surovině nebo výrobku. Bakteriální spory jsou v potravinářských surovinách a výrobcích nebezpečím ve více směrech. Jsou kryptobiotickou rezistentní buněčnou formou, a ačkoliv samy nemetabolizují, jsou potenciálním zdrojem rychlého obnovení biochemických aktivit po vyklíčení. Rezistence spor i v rámci populace jednoho druhu je heterogenní a nepatrná frakce buněk může vykazovat značnou rezistenci, například vůči vysokým dávkám záření nebo vysoké teplotě. Vlastnost kryptobiózy, případně vysokého stupně dormance, je často překážkou při detekci spor. Nutným předpokladem pro přesné určení počtu spor je vytvoření opti-

málních podmínek nejen pro vyklíčení, ale i pro postgerminační vývoj a dělení buněk: tedy umožnění tvorby viditelné kolonie nebo zákalu.

V tomto příspěvku se stručně zmíníme o těch vlastnostech bakteriálních spor, známých nebo méně známých, které mohou mít v potravinářské mikrobiologii značnou závažnost. Veškeré údaje byly použity z výsledků základního výzkumu spor, dosažených v naší laboratoři i na jiných pracovištích u nás i v cizině. Vynechali jsme detailnější údaje v těch úsecích, které podle programu mají být uvedeny podrobněji v dalších příspěvcích této konference. Některé grafy použité v této přednášce jsou součástí dvou prací, které jsou v současné době v tisku v Bulletinu VÚP SPA.

Základní znalosti o vlastnostech bakteriálních spor a různých buněčných forem sporulantů vůbec považujeme za nutný odrazový můstek pro aplikovaná odvětví mikrobiologie, ve kterých rezistentní, dormantní až kryptobiotické formy mikroorganismů hrají významnou roli [1, 2]. Je vhodné si nejprve vyjasnit některé elementární pojmy ustálené v bakteriální sporologii na úrovni základního výzkumu. Zejména proto, že nejsou vždy totožné s těmi, které jsou součástí terminologie používané u aktinomycet, plísní a u dalších mikroorganismů. Pojem rezistence spor vůči inaktivačním faktorům je celkom jasný. Postup inaktivační (zabíjející spory) v kryptobiotickém stavu je vždy drastický a ekonomicky náročný. Od tohoto inaktivačního postupu je nutno odlišit ty procedury, které, ačkoliv aplikovány na kryptobiotické spory, mohou vykazat účinek až po vyklíčení spor. Například chemické inaktivační agens se schopností pevnější vazby na periferní vrstvy spory může po zdánlivě důkladném odmytí zůstat v dostatečně účinném množství vázáno na buňku a projevit svůj inhibiční nebo letální účinek až v postgerminační fázi. V potravinářské technologii tento typ inaktivace spor nepřipadá v úvahu. V mnoha případech, kdy byly testovány nízké, přípustné koncentrace inhibitorů na inaktivaci spor, byl test prováděn v živném prostředí, umožňujícím fyziologickou ztrátu rezistence spor vyklíčením. Z našich studií i z výsledků jiných pracovníků vyplývá důležitý poznatek o rezistenci bakteriálních spor. Mechanismy rezistence vůči jednotlivým inaktivačním faktorům jsou na sobě navzájem nezávislé. Mohli jsme u bacilů modelově připravit spory poměrně termosenzitivní, ale normálně, nebo dokonce více radiorezistentní. Z prací více autorů je známo mnoho případů, kdy překvapující citlivost spor vůči jednomu drastickému fyzikálnímu nebo chemickému faktoru je provázena značnou tolerancí vůči jinému inaktivačnímu zásahu [3].

Další termíny používané v bakteriální sporologii je nutno vysvětlit blíže. Jde o pojmy: dormance, kryptobiotický stav, aktivace, klíčení spor a jejich postgerminační vývoj a konečně proliferace buněk. Výraz *dormance* vyjadřoval ve starší literatuře (v některých dalších odvětvích mikrobiologie dosud vyjadřuje) neschopnost spor vyklíčit v kompletním živném médiu za optimálních podmínek. Dnes je obecně ztotožněn pojem dormance bakteriálních spor s pojmem hypometabolický stav a u spor mikrobů a u klidových forem nesporelujících mikrobů lze tedy rozlišovat různý stupeň dormance. Extrémním případem ve stupnici hypometabolické aktivity mikrobů je kryptobiotický stav bakteriálních spor. Tento pojem se kryje s pojmy ametabolismus, anabióza, abióza, latentní život, anhydrobióza atd., známými ze starší biologické literatury [4, 5, 6]. Prvním stupněm k porušení kryptobiotického stavu je *aktivace* spor [7]. Aktivací je míněn výlučně reverzibilní proces zvýšení schopnosti spor



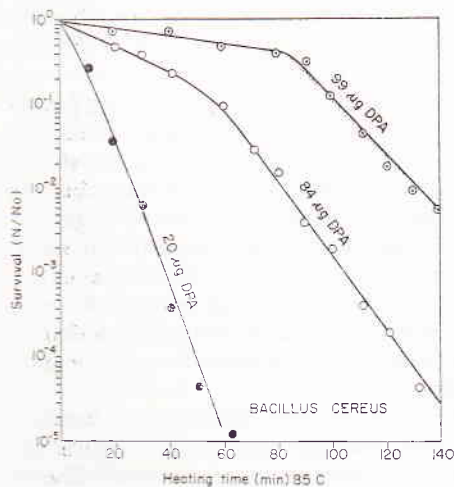
Obr. 1. Rozptyl stupně thermorezistence bakteriálních spor, izolovaných z různých lokalit a materiálů, nebo modelově za fyziologických podmínek produkovaných v laboratořích. Šrafované zóny naznačují velmi zhruba zastoupení spor s různou termorezistencí.

vyklíčit v daném médiu. Spora však zachovává více nebo méně vysoký stupeň dormance a ve většině aktivačních procedur si udrží plnou rezistenci vůči inaktivačním zásahům. Nelze mluvit o jediném specifickém aktivačním mechanismu, neboť aktivaci je možno vyvolat velmi různorodými zásahy: tepelným šokem, nízkým pH, redukčními látkami (merkaptotetanol, tioglykolát atd.), kalciumdipikolinátem a dalšími chemikáliemi, též ionizujícím zářením. Také dlouhodobé uchovávání bakteriálních spor jako test-organismů, a to i při nízké teplotě nebo v suchém stavu, vede ke zvýšení schopnosti spor vyklíčit. Hypotéz o povaze aktivačního mechanismu spor u jednotlivých druhů bakterií je více a opodstatněnější jsou jen hypotézy prokazující změnu v permeabilitě spory a reverzibilní alteraci plášťové struktury.

Na rozdíl od aktivace, *kličení* [8] představuje ireverzibilní změnu kvality buňky: vazbu a utilizaci specifických germinačních substrátů, hydrataci spory, aktivaci lytických enzymů, depolymerizaci endogenní podplášťové

stěny spory (kortextu), exkrece některých komponent do média — kortikálních štěpů a kalciumdipikolinátu. Z praktického hlediska znamená vyklíčení spory ztrátu odolnosti vůči vysoké teplotě, vysoké dávce záření a metabolickým inhibitorům. Klíčení probíhající za optimálních podmínek během několika vteřin až minut je ireverzibilní proces. Vzhledem k tomu, že při iniciaci klíčení dochází jen k degradačním, a nikoliv syntetickým pochodům, je tento proces zcela rezistentní vůči téměř všem antibiotikům a inhibitorům. Právě v této fázi představuje obecně přijatý termín klíčení bakteriální spory hlavní rozdíl od smyslu tohoto slova u spor plísňí nebo aktinomycet, kde zahrnuje i pozdější období syntetických aktivit, tvorbu hyfy atd. Veškerá další stadia vývoje bakteriálních spor od vyklíčení do prvního rozdělení primární vegetativní buňky jsou označena jako *postgerminální vývoj* a zahrnují zjednodušeně fázi botnání, vysunutí hydratované buňky z plášťových obalů a její elongaci. Je to stadium výrazných syntetických aktivit, obvykle daleko méně tolerantní vůči nutričním i fyzikálním faktorům prostředí. V této fázi rychlých syntéz nových makromolekul buňky, nukleových kyselin, proteinů a stěnového materiálu se buňka stává enormně citlivou vůči všem inhibitorům, schopným inhibovat nebo inaktivovat vegetativní, dělicí se buňky daného druhu.

Po tomto velmi stručném vymezení pojmů z bakteriální sporologie je možno přikročit k rozboru některých otázek závažných pro potravinářskou mikrobiologii. Značná drastičnost i ekonomická náročnost postupů, destruujiících rezistentní kryptobiotické bakteriální spory, stále stimuluje základní výzkum ke hledání všech prostředků umožňujících snížení resistance spor. Není možno žádným schůdným způsobem indukovat přirozenou ztrátu resistance spor, vyklíčení, leda v umělých laboratorních podmínkách. Nicméně existují prostředky, kterými je možno snížit rezistenci spor, aniž by došlo ke zrušení zcela dormantního stavu, nebo kdy dochází nejvýše ke změnám aktivačního typu. Výzkum senzitivace spor zatím pokročil nejvíce v oblasti termorezistence. Za tuto vlastnost je u spor odpovědna především hladina  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a její specifická interakce s dipikolinovou (pyridin-2,6-dikarboxylovou) kyselinou (DPA), a to jak u bacilů, tak u klostridií. Ve sporulačním médiu bez vápníku



Obr. 2. Termoinaktivace spor *Bacillus cereus* s různým obsahem dipikolinové kyseliny při zahřívání na 85 °C.



je možno uměle vytvořit spory značně termosenzitivní, typické též nízkým obsahem DPA. Vlastnost termorezistence je specificky vázána na obsah vápníku v intrasporální struktuře. Některými kationty, například  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  atd. je možno při sporogeneze indukovat výraznou syntézu dipikolinové kyseliny i akumulaci těchto kationtů do spor, vytvořených v mateřské buňce, sporangiu. Spory, kde  $\text{Ca}^{2+}$  ionty byly nahrazeny  $\text{Ba}^{2+}$  nebo  $\text{Sr}^{2+}$  ionty, jsou však termosenzitivní [9].

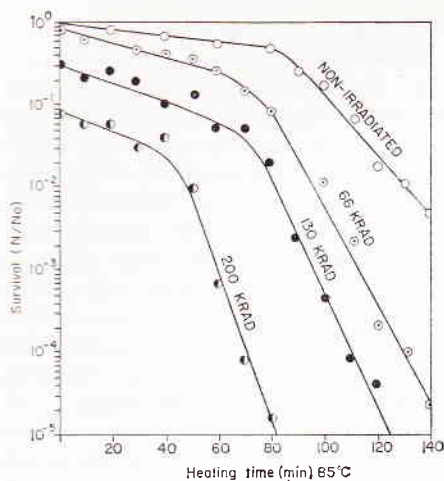
Výzkum senzitivizací spor se tedy logicky obrátil ke studiu: 1. lokalizace tohoto komplexu v buňce, 2. labilizace komplexu Ca-DPA ve sporách, 3. možnosti labilizace tohoto komplexu, a 4. extraktibility vápníku ze spor. Průkazy jevů aktivace i naklíčení spor Ca-dipikolinátem [10, 11], existence dvou frakcí vápníku s různou pevností vazby v intrasporální struktuře [12, 13, 14, 15] i možnosti vytěsnění části vápníku ze spor různými postupy [6, 12 až 16] vedly v základním výzkumu spor rychle k výsledkům významným pro praxi. Povrch spor bacilů i klostridií má vlastnosti iontoměniče. Titrací spor do tzv. „H-forem“ je možno odstranit labilnější frakci vápníku ze sporové periferie. Tento proces je reverzibilní. Spory je možno experimentálně zpětně saturovat vápníkem nebo jinými kationty. Prakticky významným výsledkem těchto studií je důkaz, že nízké pH svou schopností eliminovat část vápníku ze sporové periferie snižuje termotoleranci spor. Spory po odpojení frakce labilního vápníku, ať nízkým pH nebo i jinými umělými zásahy [13, 16, 17] jsou vysokou teplotou inaktivovány rychleji a mizí i výrazná prodleva v termoinaktivaci, typická pro vápníkem bohaté spory [13, 16, 18]. Je nutno zdůraznit, že spory takto senzitivizované vůči vysoké teplotě si zachovávají nezměněnou radiorezistenci i odolnost vůči chemickým inhibitorům.

V souvislosti s radiosenzitivizačními studiemi spor je z praktického hlediska významný druhý hlavní směr základního výzkumu senzitivizací spor. Je již dlouho známo, že preiradiace značně zcitlivuje spory vůči následnému termálnímu stressu, zatímco opačná sekvence obou faktorů vede pouze k součtu inaktivačních účinků. Některé údaje o tomto typu senzitivizace byly již uvedeny v jednom z našich článků v Bulletinu VÚP ŠPA [19] a nebudeme je dále rozebírat. Uvedeme jen dva příklady výsledků naší laboratoře, ve kterých byl sledován průběh termoinaktivace po předchozím ovlivnění ionizujícím zářením, a to u modelové připravených spor *Bacillus cereus* s vysokým i nízkým obsahem vápníku a dipikolinové kyseliny (použité grafy jsou z prací 18 a 20).

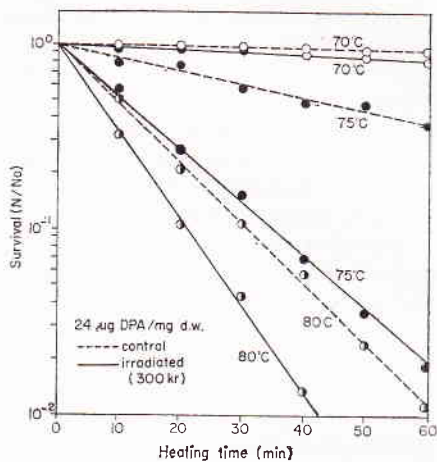
U všech postupů majících za cíl destruovat kryptobiotické spory bakterií můžeme narazit na problém, zda způsob kontroly inaktivačního účinku je spolehlivý. Může prokázat v technicky schůdné době pouze vyklíčení spor, následované postgerminálním vývojem a proliferací buněk. Nezáleží na tom, zda je možno v testovaném materiálu stanovit kvantitativně nebo semikvantitativně přímo počet přeživších spor, nebo zda definujeme kontaminaci změnou materiálu vzniklou biochemickou aktivitou vegetativních buněčných forem sporulantů. V obou případech je detekce závislá na pomnožení buněk po vyklíčení spor. V jedné z našich předchozích prací v Bulletinu VÚP ŠPA [21] jsme již publikovali zjednodušené schéma vývoje a aktivit sporulantů od vyklíčení spory do vytvoření populace, a není nutno je na tomto místě znovu uvést.

Při důkazu životaschopnosti a rezistence spor bakterií, nacházejících se v plně kryptobiotickém stavu, narážíme na klíčový problém základního

výzkumu. Můžeme vždy spolehlivě prokázat buňky živé. Mnohem méně bezpečně můžeme stanovit smrt spor. U spor platí v plné míře klasická definice Lewisova [6]: cituji ji v originále: „Extreme dormancy is operationally indistinguishable from death“. V každé populaci spor bakterií jednotlivých species existuje frakce tzv. „superdormantních“ spor, které nelze za inkubačních podmínek, optimálních pro většinu spor, prokázat za živé [6, 8]. Právě



Obr. 3. Termoinaktivace spor *Bacillus cereus*, předem x-ozářených různými dávkami. Ohřev 85 °C, detekce v Difco Nutrient Agar. Spory obsahují více než 10 % dipikolinové kyseliny v sušině a jsou též plně saturovány vápníkem.

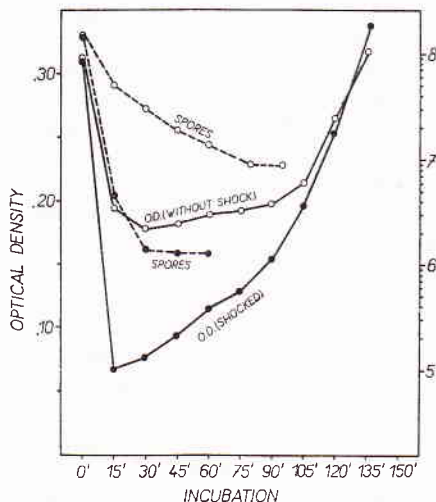


Obr. 4. Termoinaktivace spor *Bacillus cereus* předem x-ozářených dávkou 300 kiloroentgenů. Ohřev 70 °C, 75 °C a 80 °C. Použité spory jsou značně termosenzitivní, obsah dipikolinové kyseliny 24 µg/mg sušiny.

tyto superdormantní spory, u kterých může ke klíčení, postgerminálnímu vývoji a nežádoucím aktivitám dojít až za extrémně dlouhou dobu, mohou být v konzervářenském průmyslu zdrojem značných obtíží. Je jistě varovným příkladem, že retardace klíčení superdormantních spor může obnášet řádově interval i několika let [22]. U klostrií byl tento jev popsán u několika druhů, mimo jiné i u *Clostridium botulinum*; byl pozorován i u zástupců rodu *Bacillus* [6, 8, 22, 23]. O podstatě superdormance frakce spor v jedné populaci existují zatím více méně jen dohady. Jistý vztah k jevu blokady klíčení spor má již několikrát popsaná skutečnost, že vyklíčené spory většiny bakterií konvertují L-alanin, který je u velké většiny spor specifickým stimulatorem klíčení, alamin-racemózou na D-alanin. Ten je silným, vysoce specifickým inhibitorem iniciace klíčení a může zabránit klíčení u spor, jež nevyklíčili ihned.

Zatím jsme uvedli stručně jen příklady, kdy se přítomnost potencionálně životaschopných spor může vymknout detekci při rutinně prováděné kontrole již na úrovni iniciace klíčení. Bylo již řečeno, že vyklíčení spor je minimálně náročné vůči podmínkám prostředí a obvykle lze tento proces indukovat u převážné části populace. Klíčení u většiny spor bacilů i klostrií může být navozeno i velmi jednoduchými látkami, glukózou, jednotlivými L-amino-kyselinami, ribozidy, atd., nebo jen směsí několika těchto látek. Tento proces

lze indukovat i řadou fyzikálních nebo i mechanických zásahů [4, 8]. Klíčení je inertní vůči prakticky všem dosud známým inhibitorům i letálně působícím látkám, které snadno atakují vegetativní buněčné formy sporulantů. Postgerminační vývoj spory, jako období nových syntéz, a tedy vlastní cytodiferenciace buňky, je podstatně více citlivé vůči podmínkám prostředí a daleko méně tolerantní vůči nutričnímu složení prostředí. Je možné, že vlastnost superdormance malé frakce spor se ve fylogenetickém vývoji sporulantů zakotvila jako přirozený obranný jev proti značnému riziku, do kterého vstupují spory vyklíčením, a tedy ztrátou odolnosti vůči stressům všeho druhu. Pokud buňky zůstanou zastaveny ve vývoji ihned po vyklíčení, unikají mikrobiologické kontrole přítomnosti živých spor podobně jako spory nevyklí-



Obr. 5. Vliv aktivačního tepelného šoku (65 °C/15 min) na klíčení, postgerminační vývoj a dělení. *Bacillus cereus* NCIB 8122. Baktopeptonové médium.

čené, superdormantní. Inaktivační zásahy, vysoká teplota i iradiace, a též různé podmínky při těchto vlastních inaktivacích mohou měnit značně odpověď přeživších spor vůči složení média i dalším podmínkám prostředí. Pokud se tato změna v odpovědi přeživších spor projeví pouze jistou lag-fází, a tím jen opožděním vývoje, je možno spolehlivě charakterizovat jak průběh inaktivačních křivek, tak změny testovaného materiálu biochemickou aktivitou mikrobů. Subletální dávky iradiace i ohřevu, používané pro orientační charakterizaci průběhu inaktivace, mohou na druhé straně vést u přeživších spor k aktivaci ke klíčení [3, 7, 18]. Je tak eliminováno nebezpečí nezaregistrování té frakce spor, která by v daném médiu bez aktivace nevyklíčila vůbec, nebo nikoliv v technicky schůdné době. Nutným předpokladem pro posouzení účinku inaktivačního zásahu však nicméně dále zůstává, zda přeživší spory mohou po vyklíčení v daném detekčním médiu realizovat postgerminační vývoj a proliferaci. Na konci tohoto příspěvku bude ještě zmínka o možnostech vyklíčené spory vytvářet v limitovaných podmínkách přechodné hypometabolické silnostěnné buňky, nebo, po vývoji v primární vegetativní buňku, znovu vytvořit sporangium a novou sporu bez dělení buněk (tzv. mikrocyklovou sporogenezu). Také v těchto případech nelze tedy při přechodném ne-

dostatku vhodných živin na testovaném materiálu samém, nebo při ne zcela vhodném detekčním subkultivačním médiu bezprostředně prokázat přítomnost živých spor. Zůstává úkolem základního výzkumu, aby dovedl rozlišit při studiu dosavadních a při vyvíjení nových metod inaktivací kryptobiotických spor skutečný stupeň účinku na buňku. Při charakterizaci inaktivačních křivek, zvláště při použití iradiačních metod, nelze považovat za kritérium přežití jen tvorbu celé nové populace, kolonie. Například „letálně“ ozářené (1,25 Mrad) spory *Clostridium botulinum* normálně klíčí, nevytvoří kolonii, vykazují však velmi značnou enzymatickou aktivitu [24]. Ani vyšší dávka gamma-iradiace (3,8 Mrad) nezabrání sporám *Cl. botulinum* vyklíčit a syntetizovat nové proteiny včetně botulotoxinu, i když jejich schopnost dělení je narušena [25]. Naštěstí původní počet těchto zvláště nebezpečných kontaminantů v potravinářských surovinách nebývá veliký a vhodnou konzervační technikou lze vyloučit možnost přežití spor a dodatečné proliferace buněk.

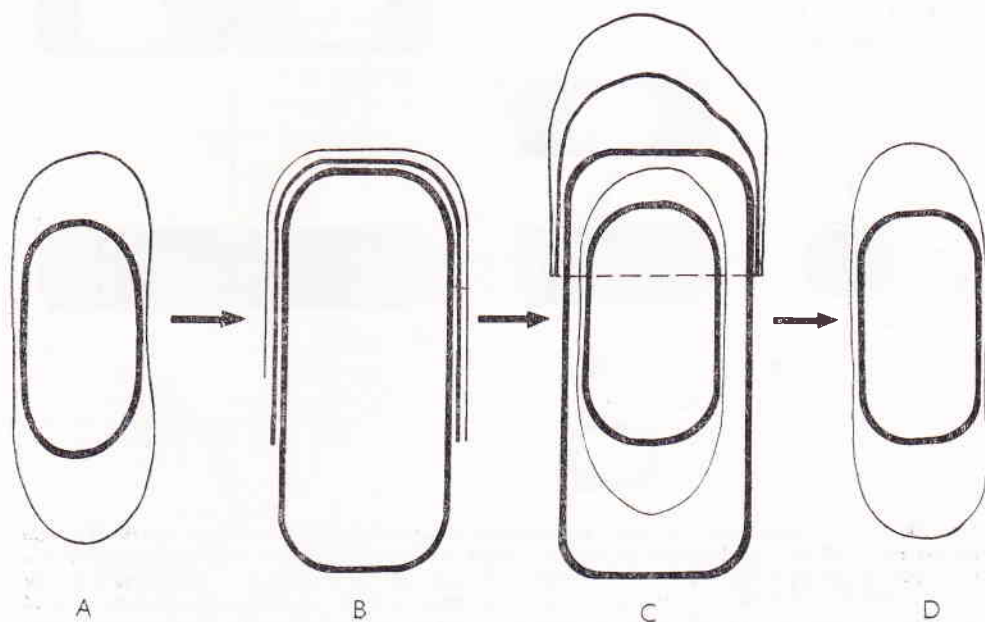
Z dalších faktorů, které mohou snížit přesnost hodnocení inaktivačních účinků na spory, je ochranný vliv různých látek v komplexních materiálech. Tento problém je již spíše záležitostí aplikovaného mikrobiologického výzkumu v potravinářství, neboť je zde nutno charakterizovat již konkrétní vlastnosti jednotlivých potravinářských surovin a výrobků. Afinita sporového povrchu vůči možným ochranným látkám je specifická podle druhu, podle podmínek, za kterých se spory vytvořily, podle toho, zda spora zůstává obalena stěnovým materiálem původní vegetativní buňky, sporangia, atd. Obecnější vlastnosti sporového povrchu u bakterií je jeho hydrofobie, která určuje i charakter látek snadno se vázajících na spory, a tím i dostupnost germinačních stimulatorů. Determinuje i vlastnost značné flotability spor na povrchu tekutin a v pěně a zvyšuje možnost jejich shlukování. Flotační techniky mohou být dobře využity k oddělování volných spor od vegetativních buněk. Shlukování spor však bývá často zdrojem značných chyb při počítání množství buněk v suspenzích. Právě při základním výzkumu etap klíčení spor a jejich postgerminačního vývoje na tekutých médiích za aerace je nutno zabezpečit homogenní distribuci spor v médiu. Do těchto suspenzí je nutno přidávat neaptné množství smáčedel. U našich hlavních pokusných kmenů bacilů se osvědčil například Tween 80 v konečné koncentraci 0,01 %. Při charakterizaci průběhu inaktivace spor v tekutých médiích během vlastního inaktivačního procesu i při následném zředování suspenzí vede pochopitelně agregace spor, nebo náhodné rozpadání shluků v jednotlivých ředěních k deprimujícím chybám v určení počtu přeživších spor.

V poslední části tohoto příspěvku obrátíme pozornost stručně ještě na schopnost atypického vývoje spor do přechodných hypometabolických forem. Tvorba těchto buněčných forem může rovněž vést ke snížení přesnosti mikrobiologické kontroly počtu životaschopných spor. Pokud detekční médium, pevné či tekuté, nebo přímo vlastní testovaný potravinářský materiál, umožňují vyklíčení, postgerminační vývoj, spolehlivě zjištělné dělení buněk a jejich biochemické aktivity, není problém bezprostředního průkazu kontaminantů (spor přeživších konzervační postupy) obtížný. Ve vhodných nutričních podmínkách může množení buněk sporulantů probíhat, i když znáčně zpomaleně, i za poměrně nízké teploty. Klíčení a růst mezofilních sporulujících bakterií jsou při teplotě  $+5^{\circ}\text{C}$  silně omezeny, nebo prakticky zastaveny. Mezi zástupci rodu *Bacillus* a *Clostridium* je však dosti fakultativních a obli-



gátních psychofilů, které mohou vyklíčit a množit se i pod touto teplotou. U spor několika testovaných kmenů *Clostridium botulinum* a dalších klostridií bylo prokázáno klíčení při teplotě pod  $+5^{\circ}\text{C}$  během několika dnů nebo týdnů [26, 27]. Buňky byly za této teploty schopny vytvářet i detegovatelné množství botulotoxinu [28 až 32]. Při teplotě  $+4^{\circ}\text{C}$  jsou schopny klíčit spory několika kmenů *Bacillus subtilis* [33]. U značně psychofilních aerobních a anaerobních sporulantů může dojít ke klíčení spor i za teplot pod  $0^{\circ}\text{C}$  [34 až 36]. V některých z těchto případů byl prokázán i pozvolný postgerminační vývoj až dělení, generační doba však byla poměrně dlouhá, až několik dnů. Při dlouhodobém skladování potravinářských surovin i produktů, vhodných svým složením pro klíčení a množení sporulantů, je nutno počítat i s tímto, byť pomalým vývojem populace.

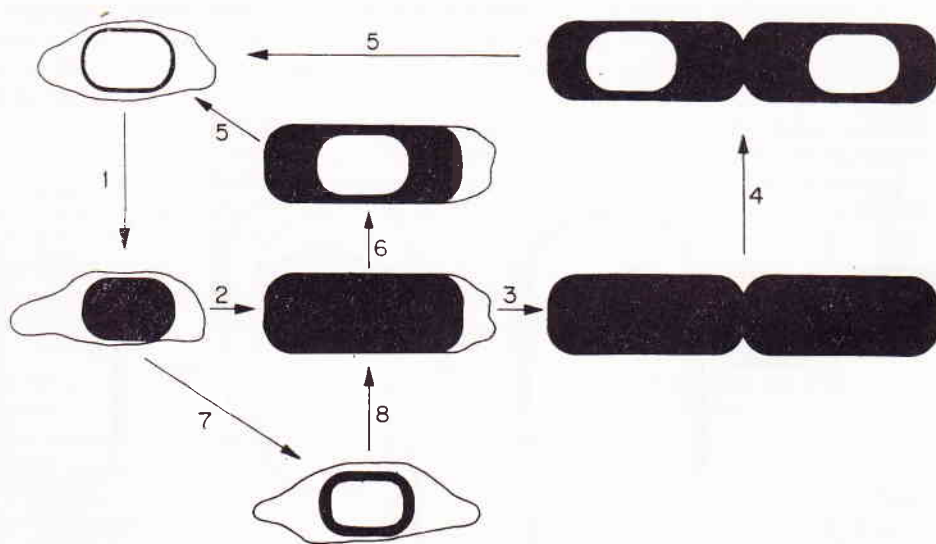
Na druhé straně, ani při vyšší nebo dokonce optimální teplotě růstu jednotlivých sporulantů nemusí dojít bezprostředně po vyklíčení spor k proliferaci buněk. V podmínkách, kde signál o vyčerpání některé (některých) složky (složek) média, nutné pro normální vegetativní vývoj, zastihne buňky v postgerminační fázi (konkrétně hlavně ve stadiu zahájení replikace DNK v buňce), dochází k resporulaci primární vegetativní buňky, tedy k vytvoření nového sporangia a spory bez předchozího dělení. Tento jev tzv. mikrocyklové sporulace [37, 38, 39] je závažný tím, že znemožňuje bezprostřední detekci sporových kontaminantů. Dále tím, že je vytvořena nová spora, více nebo méně rezistent-



Obr. 6. Schéma mikrocyklové sporogeneze. Médium umožňující pouze postgerminační vývoj a tvorbu nového sporangia. Za těchto podmínek se původně přítomná primární spora vymyká mikrobiologické detekci. A — volná spora, B — primární vegetativní buňka, C — nové sporangium (připojen též plášť původní spory), D — uvolněná sekundární spora, vytvořená v primární buňce.

ní vůči inaktivačním zásahům. Její obsah vápníku i dipikolinové kyseliny je obvykle normální, též její termorezistence i stupeň dormance jsou značně vysoké. Tyto sekundární spory, vzniklé mikrocyklovou sporogenezí bez dělení buněk, se mohou lišit i v odpovědi na prostředí, do kterého snadno vyklíčila rodičovská dormantní spora. Při rutinních testech na přítomnost metabolizujících a dělících se vegetativních buněk se tedy spory, ocitnuvší se v podmínkách vhodných pro indukci mikrocyklové sporogeneze, vymykají bezprostřední detekci. Tyto sekundární spory však představují nežádoucí potencionální možnost sekundární proliferace buněk po změně nutričních podmínek média.

Podobně ve zcela limitovaných podmínkách, kde sice mohou spory vyklíčit, ale nemohou realizovat bezprostředně postgerminační vývoj, je nelze prokázat jako živé. Vyklíčené spory totiž uskuteční jen omezené syntetické aktivity a konvertují v silnostěnné, cystám podobné buňky se snižujícími se biochemickými aktivitami a respirací [40, 41]. Do několika hodin uchovávání lze tyto silnostěnné hypometabolické buněčné formy prokázat bezpečně jako živé. Jsou-li přeočkovány v tomto období, vytvářejí normální kolonie za téměř normální kultivační dobu. Po několika dnech již nelze tyto buňky detegovat rutinními metodami: jejich konverze v normální vegetativní buňky i jejich množení vyžadují řádově několik desítek hodin. Navíc schopnost vytvořit



Obr. 7. Zjednodušené schematické znázornění možností cytodiferenciace spory *Bacillus cereus* po vyklíčení v závislosti na složení inkubačního média. 1 — zrušení kryptobiotického stavu spory, klíčení, 2 — tvorba primární vegetativní buňky, 3 — proliferace buněk ve vhodných nutričních podmínkách, 4 — tvorba nových sporangii po makrocyklové sporogenezi (po stadiu několika dělení), 5 — uvolnění zralých spor ze sporangii, lyze sporangii, 6 — tvorba spory ve sporangiu (limitované podmínky média, spora se vytváří v primární buňce bez stadia dělení (= mikrocyklová sporogeneze), 7 — konverze vyklíčené spory v silnostěnnou, cystě podobnou buňku (limitované podmínky, médium umožňuje pouze vyklíčení spory), 8 — zpětná konverze silnostěnné hypometabolické buňky ve vegetativní buňku. Další cytodiferenciace může probíhat ve směru makro- i mikrocyklové sporulace.

kolonii na běžné používaných komplexních médiích má jen menší frakce těchto silnostěnných buněčných forem. Atypické silnostěnné buňky po vyklíčení spor se nevytvářejí pouze ve zcela limitovaném médiu, ale i za jiných podmínek, např. při nižším pH a při zvýšeném poměru zdrojů uhlíku ke zdrojům dusíku [41].

Poslední uvedené příklady atypického vývoje spor, t. j. mikrocyklové sporogeneze bez množení buněk i tvorba silnostěnných buněk tedy naznačují, že i po vyklíčení spor přeživších inaktivační procedury mohou buňky v post-germinační fázi uniknout detekci. Jejich hypometabolismus znamená poměrně značnou nezávislost vytvořených atypických forem na okolním prostředí, i když je to prostředí vhodné pro klíčení. Bohužel znamená i možnost pozdějšího vývoje těchto buněk v normální plně metabolizující vegetativní formy sporulantů. Tento vývoj může nastat změnou podmínek, např. změnou fyzikálních faktorů prostředí, uvolněním chybějících prekursorů autolýzou některých buněk, difuzí těchto látek ze vzdálenějšího místa atd.

Ještě několik poznámek na závěr. Problematika destrukce rezistentních spor bakterií je jistě pro řadu potravinářských i jiných průmyslových odvětví závažná. Ve svém příspěvku jsme uvedli několik příkladů studia elementárních vlastností sporulujících bakterií tak, jak je analyzuje základní výzkum. Je samozřejmé, že ve vlastním aplikovaném konzervářenském výzkumu i průmyslu je nutno uvažovat i mnoho jiných faktorů: technické problémy destrukce mikrobiálních kontaminantů ve velkovýrobě při zachování co nejvyšší kvality produktů, otázky semisterilizačních technologických postupů, skladování surovin, ekonomiky jednotlivých postupů v potravinářské technologii atd. V mnoha směrech se tedy problematika i terminologie základního výzkumu i praxe různí. Náš slovník může být odlišný, ale konečný cíl máme společný: zabezpečit dostatek kvalitní potravy lidem naší socialistické země!

## Literatura

1. BAIRD-PARKER, A. C.: In: *The Bacterial Spore* (Ed. G. W. Gould a A. Hurst). London — New York, Academic Press 1969, s. 517. Tato kniha je nadále citována u dalších autorů „TBS“.
2. INGRAM, M.: TBS. 1969, s. 549.
3. ROBERTS, T. A. — HITCHINS, A. D.: TBS. 1969, s. 611.
4. SUSSMAN, A. — HALVORSON, H. O.: *Spores: their dormancy and germination*. New York — London, Harper and Row 1966.
5. SUSSMAN, A.: TBS. 1969, s. 1.
6. LEWIS, J. C.: TBS. 1969, s. 301.
7. KEYNAN, A. — EVENCHIK, Z.: TBS. 1969, s. 359.
8. GOULD, G. W.: TBS. 1969, s. 397.
9. FOERSTER, H. F. — FOSTER, J. W.: *J. Bacteriol.*, 91, 1969, s. 1333.
10. RIEMANN, H. — ORDAL, J. Z.: *Science*, 133, 1961, s. 1703.
11. FLEMING, J. — ORDAL, J. Z.: *J. Bacteriol.*, 88, 1964, s. 1529.
12. LEWIS, J. C. — SNELL, N. S. — ALDERTON, G.: *Spores III*. (Ed. L. L. Campbell a H. O. Halvorson.) *Am. Soc. Microbiol.*, 1965, s. 47.
13. VINTER, V.: International atomic energy agency, FAO, No 653207, PL-151. Viedeň 1965.
14. VINTER, V. — ŠTASTNÁ, J. — ČÁSLAVSKÁ, J.: *Spores IV*. (Ed. L. L. Campbell.) *Am. Soc. Microbiol.*, 1969, s. 289.
15. LEVINSON, H. S. — HYATT, M.: *Tamtéž*, 1969, s. 262.
16. VINTER, V. — VÉCHET, B.: *Folia Microbiol.*, 9, 1964, s. 238.
17. ALDERTON, G. — SNELL, N. S.: *Science*, 163, 1969, s. 1212.

18. LEŠKOVÁ, Z. — VINTER, V. — BABIČKA, J.: Dílčí závěrečná zpráva VÚP SPA, 1972.
19. VINTER, V.: Bulletin VÚP SPA, 9, 1970, s. 1.
20. VINTER, V. — VÉCHET, B.: Folia Microbiol., 9, 1964, s. 352.
21. VINTER, V.: Bulletin VÚP SPA, 11, 1972, s. 1.
22. DICKSON, E. C.: Proc. Soc. exp. Biol. Med., 25, 1927, s. 426.
23. GOULD, G. W. — JONES, A. — WRIGHTON, C.: J. appl. Bact., 31, 1968, s. 357.
24. COSTILOW, R. N.: J. Bacteriol., 84, 1962, s. 1268.
25. KEMPE, L. L. — GRAIKOSKI, J. T.: Appl. Microbiol., 10, 1962, s. 31.
26. ROBERTS, T. A. — HOBBS, G.: J. appl. Bact., 31, 1968, s. 75.
27. MUNDT, J. O. — MAYHEW, C. J. — STEWART, G.: Fd Technol. Champaign, 8, 1954, s. 435.
28. AJMAL, M.: J. appl. Bact., 31, 1968, s. 120.
29. SCHMIDT, C. F. — LECHOWICH, R. V. — FOLINAZZO, J. F.: J. Fd Sci., 26, 1961, s. 626.
30. EKLUND, M. W. — WIELER, D. I. — POYSKY, F. T.: J. Bacteriol., 93, 1967, s. 1461.
31. ABRAHAMSSON, K. — GULLMAR, B. — MOLIN, N.: Can. J. Microbiol., 12, 1966, s. 385.
32. SINCLAIR, N. A. — STOKES, J. L.: J. Bacteriol., 87, 1964, s. 562.
33. WILLIAMS, D. J. — CLEGG, L. F. L. — WOLF, J.: J. appl. Bact., 20, 1957, s. 167.
34. KNAYSI, G.: J. Bacteriol., 87, 1964, s. 619.
35. LARKIN, J. M. — STOKES, J. L.: J. Bacteriol., 91, 1966, s. 1667.
36. HALVORSON, H. O. — WOLF, J. — SRINIVASAN, V. R.: Proc. Low. Temp. Microbiol. Symp., Camden, New Jersey, USA, 1961, s. 27.
37. VINTER, V. — SLEPECKY, R. A.: J. Bacteriol., 90, 1965, s. 803.
38. VINTER, V. — CHALOUPKA, J.: Acta Facult. Med. Univ. Brun., 29, 1967, s. 63.
39. VINTER, V.: TBS. 1969, s. 73.
40. VINTER, V. — CHALOUPKA, J. — ŠTASTNÁ, J.: Symposium Genetic and Biochemical Regulation of Dormancy. Kyoto (Japonsko) 1970, s. 31.
41. VINTER, V. — CHALOUPKA, J. — ŠTASTNÁ, J. — ČASLAVSKÁ, J.: Spores V. (Ed. H. O. Halvorson, R. Hanson, L. L. Campbell). Am. Soc. Microbiol., 1972, s. 390.

Vliv činitelů prostředí na klíčení bakteriálních spor a na jejich další vývoj

V. Vinter, V. Zalabák, J. Babička, a J. Štastná. Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha.

### Souhrn

V příspěvku je proveden rozbor těch vlastností bakteriálních spor, které jsou důležité z hlediska potravinářské technologie. Kromě základního popisu kryptobiotického stavu spor, aktivace spor a jejich klíčení a postgerminálního vývoje v různých podmínkách, jsou uvedeny údaje o termo- a radiorezistenci spor a o možnostech senzitivizace spor. Při charakterizaci senzitivizačních postupů jsou diskutovány blíže: problém labilizace komplexu vápník — dipikolinová kyselina ve sporové struktuře, význam extrakce labilního vápníku ze spor v kyselém prostředí a otázka radiosenzitivizace spor bakterií vůči následnému termálnímu stressu.

V článku je věnována pozornost i spolehlivému průkazu životaschopnosti spor s přihlédnutím k jevu tzv. „superdormance spor“. Skutečnost, že živá spora nemusí při méně vhodných nutričních podmínkách dát vznik makrokolonii, je v článku zdůrazněna údaji o bezprostřední tvorbě sekundárních spor v primární vegetativní buňce, tzv. mikrocyklové sporogenezi a o tvorbě silnostěnných hypometabolických forem přímo z vyklíčené spory. Přetrvávání těchto sekundárních hypometabolických forem představuje potenciální nebezpečí druhotného růstu populace a obnovení destruktivních biochemických aktivit po restauraci vhodnějších nutričních podmínek prostředí. Stručně jsou uvedeny i příklady, kdy spory klostridií, inaktivované např. iradiací, nelze již prokázat tvorbou nové populace, lze však u nich dokázat nežádoucí reziduální syntetické aktivity, na př. tvorbu toxinů.



# Влияние факторов среды на прорастание бактериальных спор и на их дальнейшее развитие

## Выводы

В статье приводится анализ тех свойств бактериальных спор, которые важны с точки зрения пищевой технологии. Кроме основного описания криптобиотического состояния спор, активации спор и их прорастания и постгерминального развития в различных условиях, приведены данные о термо- и радиосопротивляемости и о возможностях сенситизации спор. Характеризуя процессы сенситизации рассматриваются более подробно: проблема лабильзации комплекса кальций — дипиколовая кислота в строении спор, значение экстракции лабильного кальция из спор в кислой среде и вопрос радиосенситизации спор бактерий по отношению к термальному давлению (стрессу).

В статье уделяется внимание и достоверному доказательству жизнеспособности спор с учетом явления т. н. „супердормансии спор“. Факт, что живая спора не должна в менее подходящих питательных условиях дать возникновение макроколоний, в статье подчеркнут данными о непосредственном образовании вторичных спор в первичной вегетативной клетке, т. н. микроциклическом спорогенезисе, и об образовании токсостенных гипометаболических форм прямо из проросшей споры. Переживание этих вторичных гипометаболических форм представляет потенциальную опасность вторичного возрастания популяции и возобновление деструктивных биохимических активностей после реставрации более подходящих питательных условий среды. Вкратце приводятся также примеры, когда споры клостридий, инактивированные напр. посредством иррадиации, невозможно уже удостоверять образование новой популяции, но можно доказать у них нежелательные остаточные синтетические активности, напр. образование токсинов.

## Influence of environment agents on germination of bacterial spores for their farther development

### Summary

In this lecture those properties of bacterial spores are analysed which are important from the point of view of the technology. Except the basic description of cryptobiotic condition of spores, the activation of spores and their germination and postgermination development in different conditions there are further data on thermo- and radiorezistance of spores and on possibilities of spores senzitzation. When characterizing sensitization procedures following problems are discussed indetails: the problem of labilization a complex calcium-dipicolin acid in sporestructure, the significance of extraction of labile calcium from spores acid environment and question of spore-radiosensitization of bacterii against the resulting thermal stress.

In the article the attention is also devoted to reliable evidence of sporesvitality in the regard to phenomenon of so-called "spore superdormancy".

The fact that live spores under less suitable nutrition conditions needn't give the rise to macrocolony is emphasised in the article by giving the data on immediate formation of secondary spores in the primary vegetative cell, so-called microcycle spore genesis, and on formation of amply dimensioned walls hypometabolic forms directly from the germinated spores. Life-expectancy of these secondary hypometabolic forms presents potential danger of secondary growth of population and recovery of destructive biochemical activities after restauration of more suitable nutrition conditions of environment. Brief examples are given about clostridium spores enactivated, e. g. by irradiation, are not provable by formation of new population, but it is possible to prove undesirable residual syntetis activity, e. g. the cration of toxins.