Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

Výskyt sporulujících bakterií v konzervách

Bakalářská práce

Autor práce: Kateřina Růžičková

Vedoucí práce: prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Výskyt sporulujících bakterií v konzervách" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 16. 4. 2014 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce prof. Ing. Vojtěchu Radovi, CSc. za podnětné rady, připomínky a čas, který věnoval vedení mé bakalářské práce.

Výskyt sporulujících bakterií v konzervách

Occurence of sprephorming bacteria in canned food

Souhrn

Konzervace potravin je velice důležitý proces zabraňující kažení potravin. Tento proces nebyl znám odjakživa, ale postupem času se začal vyvíjet a zdokonalovat. Lidé po staletí vymýšleli mnoho způsobů, jak potraviny uchovat co nejdéle, ale významný pokrok nastal teprve, když Nicholas Appert objevil proces tepelné konzervace, který byl mnohem účinnější a dokázal potraviny uchovávat na delší dobu než kdy předtím.

Ačkoliv cílem tepelné konzervace potravin je zničení všech mikroorganismů, tyto výrobky stejně za určitých podmínek prodělávají mikrobiální kažení. A podle způsobu tepelného opracování se konzervované produkty dělí do několika skupin. Aby bylo možné lépe porozumět tepelnému zničení mikroorganismů ve vztahu k ochraně potravin v konzervování, jsou v této práci popsány některé základní pojmy spojené s touto technologií.

V této práci jsou charakterizovány mikroorganismy, které se nejčastěji vyskytují v konzervách. Je popsáno, jak jsou bakterie velmi odolné vůči teplu i tlaku. Jsou uvedeny nejvíce odolné mikroorganismy, a uvedeny faktory, které ovlivňují jejich odolnost vůči vysokým teplotám. Jedním takovým faktorem je hodnota pH, podle které se konzervované potraviny rozdělují na kyselé, slabě kyselé a neutrální.

Dnes je známa spousta metod konzervování potravin, každá metoda má jiné podmínky skladování. Nelze konzervovat jednou metodou všechny potraviny, ale naopak, každá potravina vyžaduje jiný způsob konzervace.

V závěru bakalářské práce je uvedena metodika a hrubý nástin výzkumu výskytu bakterií v konzervách. Je popsáno jakým způsobem se má daný vzorek zpracovat, vyhotovit ředicí řada, zalít kultivačním mediem a jakým způsobem se bude kultivovat při zjišťování výskytu určitého rodu. Jsou uvedeny i předběžné výsledky, při nichž byly izolovány sporulující bakterie z konzerv.

Klíčová slova: konzervy, *Bacillus*, *Clostridium*, *Geobacillus*, maso, spora

Summary

Food preservation is a very important process to prevent food spoilage. This process hasn’t been always known, but by the time it has begun to develop and improve. For centuries people had been inventing many ways how to preserve food as long as possible, but significant progress occurred when Nicholas Appert discovered the process of thermal canning. This process was much more efficient and it was able to preserve food for a longer period of time than ever before.

Although the aim of the thermal preservation of food is the destruction of all microorganisms, anyway these products undergo microbial spoilage at certain conditions. According to the method of the thermal canning the canned products are divided into several groups. Some basics concepts associated with the thermal destruction of microorganisms in relation to food safety in canning are described in this work, in order to better understand the technology.

There are characterized microorganisms that can be mostly presented in cans in this work. It is described how bacteria are very resistant to heat and pressure. Most resistant bacteria are mentioned. Also, the factors that influence their resistance to high temperatures are described. Value of pH is one of these factors, by which the preserved food is classified as acidic, weakly acidic and neutral.

Nowadays it is known a lot of methods of food preservation; each method has different storage conditions. It is not possible to preserve all kinds of food by one method, but on the contrary, each food requires a different way of preservation.

In the end of the bachelor's thesis is given a methodology and a rough outline of a research of bacteria in cans. It is described how the particular sample is supposed to be processed, prepared dilution series, embedded culture medium and how to cultivate it in determining the occurrence of a particular genus. Finally, preliminary results of the experiment are presented. Spore-forming bacteria were isolated from canned food.

Keywords: cans, *Bacillus*, *Clostridium*, *Geobacillus*, meat, spore

Obsah

1. Úvod 8

2. Cíl práce 8

3. Literární rešerže 9

3.1. Historie konzervování 9

3.1.1. Rozvoj potravinářské mikrobiologie 11

3.1.2. Otevírání konzerv 12

3.2. Teorie konzervace 13

3.2.1. Tepelné zničení mikroorganismů 13

3.2.1.1. D-hodnota 13

3.2.1.2. z-hodnota 14

3.2.1.3. Q_{10}-hodnota 14

3.2.1.4. F-hodnota 14

3.2.1.5. Koncept 12-D 15

3.3. Typy konzerv 16

3.3.1. Konzervy (normální konzervy) 16

3.3.2. Konzervy do tropů 17

3.3.3. Polokonzervy 17

3.3.4. Třičtvrtě konzervy 17

3.3.5. SSP produkty 17

3.4. Odolnost mikroorganismů 18

3.4.1. Tepelná odolnost 18

3.4.2. Tlaková odolnost 18

3.4.3. Srovnání tepelné a tlakové odolnosti 19

3.5. Spory a jejich tepelná odolnost 20

3.5.2. Ochranný obal spor 23

3.5.2.1. Morfologie spor 23

3.5.2.2. Biochemická analýza pláště 23

3.5.2.3. Funkce pláště 24

3.6. Kažení konzerv 25

3.6.1. Nedostatečná sterilace 25

3.6.2. Nedostatečné chlazení 25

3.6.3. Kontaminace přes švy 26

3.6.4. Nedostatečné zpracování potravin 26

3.6.5. Diagnostika kažení 26

3.7. Rozdělení konzerv podle pH 28

3.7.1. Mírně kyselé potraviny (pH > 4,6) ... 28
3.7.2. Kyselé potraviny (pH 4,6 až 3,7) ... 28
3.7.3. Velmi kyselé potraviny (pH < 3,7) ... 29
3.8. Mikroorganismy ... 30
3.8.1. Rod Clostridium ... 30
3.8.2. Rod Bacillus ... 30
3.8.3. Rod Geobacillus ... 31
3.8.4. Rod Byssochlamys ... 31
3.9. Metody konzervování potravin ... 32
3.9.1. Odstraněním mikroorganismů ... 32
3.9.2. Tepelným zákrokem ... 32
3.9.3. Zářením ... 33
3.9.4. Dalšími fyzikálními zákroky ... 34
3.9.5. Sníženou teplotou ... 34
3.9.6. Osmoanabiozou (snížením vodní aktivity) ... 34
3.9.7. Chemicky ... 35
3.9.8. Cenoanabiózou (biologickými metodami konzervace) ... 35
4. Metodika ... 36
5. Výsledky a diskuze ... 38
6. Závěr ... 40
7. Seznam použité literatury ... 41
8. Seznam použitých zkratek ... 44
9. Přílohy ... 45

1. Úvod

Obecně platí, že sporulující bakterie jsou více tepelně odolné než bakterie nesporulující. Spory jsou vysoce odolné „spící“ buňky sloužící bakteriím k přežívání nepříznivých podmínek. Na povrchu jsou obklopeny pevným, tuhým a nepropustným pláštěm, který je činí odolnější než samotné bakterie. Spory mohou zůstat ve své spící a odolné formě po několik let, ale při obnově živin v prostředí se můžou navrátit k životu během několika minut v procesu klíčení.

Proto snahou konzervace je zlikvidovat jak bakterie vegetativní, tak i jejich spory a tím zabránit kažení konzerv. Konzervy jsou sterilní produkty, které jsou získávány zahřátím konzervovaného produktu v obalech na dobu pětinásobku minimálního času potřebného k inaktivaci (F_0-hodnoty ≥ 5). Obaly jako jsou například pocínovaný plech, hliník, sklo, termorezistentní plastické hmoty (např. polypropylen a jiné), znemožňují následnou rekontaminaci.

Někdy je nesprávně označována jako konzerva také plechovka – dóza vyráběná obdobným způsobem, ale produkt v ní však nebývá konzervován.

2. Cíl práce

Cílem práce je popsat postup při testování výskytu sporulujících bakterií v masových a jiných konzervách. Testovat nafouklé konzervy nakoupené v maloobchodních sítích, eventuálně konzervy z domácích zásob.

Hypotézou pro praktickou část práce je, že v konzervovaných potravinách budou přežívat zejména bakterie rodů *Bacillus* a *Clostridium*.

3. Literární rešerže

3.1. Historie konzervování

Již mnoho let lidé objevovali mnoho důmyslných a vynalézavých způsobů jak předejít zkažení potravin a tak postupně vznikaly první metody konzervace. Úplně první metodou konzervování, kterou lidé objevili, bylo sušení (Schwartz, 1996). Nejprve byly sušeny semena, obilky, plody ovoce apod. Později bylo sušení využíváno ke konzervaci potravin a potravinářských surovin - masa, ryb, mléka (Voldřich, 2004a). Lidé zjistili, že maso, které nechali venku, slunce vysušilo, a tak vydrželo déle než čerstvé, bylo lehčí a mohli ho snáze transportovat. Tento objev znamenal, že už nemuseli spotřebovat maso hned na místě, kde zvíře ulovili. Sušení na slunci a ve větru bylo dobré v horkých suchých klimatech ale ve studeném, vlhkém prostředí nebylo moc praktické. Proto se začal využívat oheň a kouř, který urychlil proces sušení. Navíc uzené ryby a maso najednou získali i pikantnější chuť. Déle vydržely částečně i proto, že kouřový zápach odpuzoval hmyz (Schwartz, 1996).

Stejně tak je dost pravděpodobné, že pračlověk obývající převážně jeskyně mohl náhodou zjistit, že když uloží maso do její chladné části, kam nedosáhlo teplo ohně (spíš to ale udělal z důvodu, aby se k jeho zásobám nedostala menší zvířata), vydrží tam mnohem déle než v teplejší části (Klescht, 2013).

Ve starověku byly odhaleny konzervační vlastnosti soli. Zjistilo se, že sůl je silné vysoušecí činidlo, které vytáhne vlhkost z tkání, vysuší je a vytvoří prostředí, které zabraňuje růstu zhoubných bakterií. Solená masa a ryby sehrály podstatnou roli v jídelníčku středověké Evropy: obzvláště v době válek, kdy solené ryby byly jediným dostupným zdrojem proteinů. Nasolená masa a ryby představovaly také vhodné lodní zásoby a brávaly se zejména na dlouhé plavby (Schwartz, 1996).

Stejně jako sůl i cukr působí jako dobré konzervační činidlo – ve velké koncentraci vytváří prostředí, které ztrácí schopnost podporovat růst živých organismů. Cukr ale nebyl znám tak dlouho jako sůl. Starověcí Egypťané a Hebrejci ho neznali a není o něm zmínka ani v raných řeckých a římských spisech. Základním sladidlem byl tehdy med (Schwartz, 1996).

Třetí základní konzervační přísadou byl ocet, který vytváří kyselé prostředí, v němž kontaminující bakterie nemohou přežít. Ocet dostáváme organickým procesem: jestliže je

vinný, ovocný nebo obilný zákvas vystaven vzduchu, bakterie zreagují a přemění alkohol na kyselinu octovou (Schwartz, 1996).

Naši předkové rovněž zjistili, že potraviny mohou konzervovat i zamezením přístupu vzduchu. K tomuto účelu se používal med a olej. Tyto suroviny se využívaly například ke konzervování masa. Na chladnějším severu, kde olej neznali, se pro stejné účely užíval zvířecí tuk (Schwartz, 1996).

Přestože si lidé po staletí uchovávali potraviny pomocí nasolování, ukládání do vrstev sněhu a ledu, uzení kouřem, nakládání do octa, medu a později cukrového roztoku, žádná z těchto metod je neuchovávala na dlouhou dobu (Štěpničková, 2010).

Až v roce 1795 vyhlásil známý francouzský vojevůdce a pozdější císař Napoleon Bonaparte odměnu (12 000 franků) pro toho, kdo objeví způsob delšího uchování potravin pro jeho armádu (Žižková a Caisová, 2011). Vedly ho k tomu osobní zkušenosti z průběhu táboření francouzského vojska u Toulonu v roce 1793, kdy se projevovaly značné problémy při zásobování (Štěpničková, 2010). Francouzská vláda ztrácela více vojáků kvůli podvýživě a chorobám jako jsou kurděje než vojenskými ztrátami (Goldblith, 1971b).

Významným pokrokem byl proces tepelné konzervace, na který, po patnáctiletém experimentování, přišel pařížan Nicholas Appert, který se od výrobce svíček, sládka a vinaře propracoval až k profesi kuchaře a cukráře. (Štěpničková, 2010). Všiml si, že sirupy, které používal pro své cukrovinky, uchovával téměř neomezeně, když je zahřál a skladoval ve vzduchotěsných skleněných láhvích. Proto začal experimentovat se zachováním ostatních druhů potravin (Goldblith, 1971). Částečně tepelně upravené (povařené) potraviny plnil do sklenic, uzavřel korkovými zátkami, povařil ve vodě a zapečetil (Štěpničková, 2010).
Appert nevěděl sice nic o mikrobech jako původcích kažení potravin – jejich úlohu osvětlil teprve o půl století později L. Pasteur, ale prakticky ověřil, že pokud vloží příslušné potraviny do obalu, uzavře je a podrobí potřebnému záhřevu, dosáhne dlouhodobé údržnosti náplně. Konzervační účinek vysvětloval tím, že záhřevem rozloží vzduch a odstraní kyslík (Čurda, 2010)

V roce 1804 si byl natolik jistý, že svůj produkt testoval na Francouzském námořnictvu a sklidil velký úspěch (Goldblith, 1971b). Armádě předložil vzorky jídel ve sklenicích, které byly uloženy 130 dnů v moři a nezkazily se (Žižková a Caisová, 2011). Po vytažení a otevření je degustovala komise odborníků. Všech 18 různých druhů pokrmů si zachovalo čerstvost a neprodělalo v moři žádné nežádoucí změny (Štěpničková, 2010). Jeho vynález byl vyhodnocen a v roce 1810 získal slíbených 12 000 franků, ale musel zveřejnit přesné údaje o svém objevu (Goldblith, 1971b). Dříve než dostal cenu, musel Francouzské

vládě dodat 200 kopií publikace, které tisknul na vlastní náklady, o svých metodách. Appert popisoval proces zpracování takto:

- Uzavřete potraviny, které mají být zachovány, v láhvích
- Opatrně lahve zakorkujte
- Vařte lahve ve vodě po určitou dobu (v závislosti na potravinách)
- Vyjměte lahve z vody a zchlaďte je

V roce 1811 vyšlo druhé vydání ve francouzštině, ale už i angličtině a švédštině, v roce 1823 třetí a v roce 1831 čtvrté. To bylo také přeloženo do mnoha jazyků (Bitting, 1937). V roce 1844 vyšel v Praze německý překlad pátého francouzského vydání. To už bylo podstatně obsáhlejší, než první vydání. Kniha o 400 stranách popisuje ovšem nejen původní konzervační metodu a návody k její aplikaci pro široké spektrum rostlinných i živočišných produktů, ale zabývá se i dalšími způsoby úchovy potravin včetně vína. Dílo poskytuje zajímavý pohled na potravinářství v první polovině 19. století (Čurda, 2010).

Mezitím však inspirovaly Appertovy úspěchy anglické vynálezce, především Petra Duranda (Čurda, 2010). Zrodilo se další významné vylepšení, na které udělil anglický král Jiří III. Durandovi patent. Peter Durand dovážel z hrabství Cornwall tenký válcovaný ocelový plech, který pocínoval a použil místo skla na výrobu klasické válcové nádoby – konzervy, tak jak ji známe dodnes. Plechové konzervy šlo lépe vzduchotěsně uzavřít, plech byl odolnější, snáze se s ním pracovalo při výrobě i přepravě, vrstva cínu byla ochranou před korozí (Štěpničková, 2010).

První firmu na výrobu potravinových konzerv založili v roce 1812 Angličané Bryan Doklin a John Hall, kteří koupili Durandův patent za tisíc liber. Produkce konzervovaných potravin se brzy rozšířila i do dalších zemí. V roce 1818 byl Durandův patent uznán v USA (Žižková, Caisová, 2011). Rozvoj konzervárenského průmyslu v Americe umocnila zlatá horečka a později občanská válka (Štěpničková, 2010). V ČR se výroba konzerv průmyslově rozběhla až po první světové válce (Žižková a Caisová, 2011).

3.1.1. Rozvoj potravinářské mikrobiologie

V 19. století byla potravinářská mikrobiologie v plenkách. Mnoho lidí přispělo k jejímu rozvoji. Několik vědců významně přispělo k pochopení vědy o konzervaci (Goldblith, 1972). V roce 1897 Samuel Prescott a William Lyman Underwood publikovali studii „Mikroorganismy a sterilační proces v konzervárenském průmyslu“ (Čurda, 2010).

Spolu udělali obrovské množství práce, která měla skvělý efekt na rozvoj konzervování. Tyto vědecké práce ukázaly, že:

- bakterie jsou příčinou kažení konzervovaných potravin
- některé druhy potravin potřebují být zahřáty nad bod varu, aby zajistily sterilitu
- je důležitý prostup tepla
- je důležité po zpracování konzervované potraviny ochladit

V roce 1920 Bigelow and J. R. Esty zjistili, že spory umírají rychleji při vyšších teplotách. V roce 1922 Esty a K. F. Meyer prokázali maximální odolnost spor bakterie *Clostridium botulinum* pomocí vlhkého tepla. Položili základy pro koncept 12-D (Stumbo, 1965). V dalších desetiletích se prohlubovaly nejen znalosti o tepelné destrukci mikrobů, ale i o účincích záhřevu na jednotlivé složky potravin. To spolu s poznatky o sdílení tepla a se zlepšující se technikou měření a regulace sterilačního procesu umožnilo posléze optimalizovat tepelné ošetření potravin a zajistit nejen bezpečnost, ale i vysokou kvalitu výrobku (Čurda, 2010).

3.1.2. Otevírání konzerv

I když od doby, kdy se konzerva otevírala bajonetem, již nějaký čas uběhl, přesto otevírání bylo (a někdy ještě i je) dlouhodobě slabinou tohoto typu obalu. Vedle klasického otvíráku se lze u konzerv setkat s otevíráním pomocí klíčového otvírače (např. u sardinkových plechovek). První takové klíče jsou z roku 1866, systém tohoto otevírání využil faktu menší pevnosti letovaného plechu (Žižková a Caisová, 2011).

O něco později se ještě v témže století objevily různé typy pákových otevíračů. Teprve když se koncem 19. století začalo používat naválcování dna a víka plechovky pomocí tzv. dvojitého švu místo letování, bylo možno použít otevíračů, které vedou řezný nástroj po obvodu hladkého uzávěru. Až v 50. letech dvacátého století se objevuje možnost obejít se při otevírání plechovek bez dalšího nástroje. Tzv. „easy open“, tedy snadno otevíratelné uzávěry, vycházejí ze ztenčení materiálu víka v obvodové rýze budoucího otvoru na tloušťku, kterou je možno odtrhnout nebo vtlačit pouhou rukou. Zprvu toto řešení umožňovala vzhledem ke své měkkosti pouze hliníková víčka, která byla používána i pro ocelové plechovky. Teprve v 80. letech se rozšiřují snadnootevíratelná víčka i z pocínovaného ocelového plechu, což je stimulováno také požadavkem homogenního složení plechovek kvůli recyklaci (Čurda, 2010). Snazší otevírání se vyskytuje u tzv. polokonzerv (Žižková a Caisová, 2011).

3.2. Teorie konzervace

3.2.1. Tepelné zničení mikroorganismů

Aby bylo možné lépe porozumět tepelnému zničení mikroorganismů ve vztahu k ochraně potravin a konzervování, je nutné pochopit některé základní pojmy spojené s touto technologií. Níže jsou uvedeny některé z důležitých pojmů (Jay et al., 2005).

3.2.1.1. D-hodnota

D-hodnota se označuje jako čas, který je při dané teplotě potřebný ke snížení počtu mikroorganismů na 10%, čili čas potřebný k decimální redukci (z angl. „Decimal reduction time“). Usmrcení mikrobiální populace při sterilaci se neuskutečňuje najednou, ale exponenciálně v tzv. logaritmické řadě (Görner a Valík, 2004).

D-hodnota se vypočítá ze vztahu:

$$\mathbf{D = t/(\log a - \log b)}$$

Kde: a = počáteční počet mikroorganismů v objemové nebo hmotnostní jednotce
b = konečný počet mikroorganismů v objemové nebo hmotnostní jednotce
t = čas působení mikrobicidní teploty v minutách nebo sekundách

Čím je zkoumaný mikroorganismus odolnější vůči záhřevu (termorezistentnější), tím vyšší bude při určité konstantní teplotě jeho D-hodnota. D-hodnota se bude snižovat při působení vyšších teplot na mikroorganismy. Vzhledem k tomu, že D-hodnotu ovlivňuje teplota, je potřeba ji uvést jako index. Například, D_{121} = 1 pro *Clostridium sporogenes* znamená, že pokud na testovaný kmen působí teplota 121 ºC, sníží se počet živých buněk na 10% za 1 minutu (Görner a Valík, 2004).

Hodnoty-D slouží jednak k posouzení termorezistence jednotlivých mikroorganismů a zejména jsou využívány pro hodnocení inaktivačního účinku pasteračního nebo sterilačního záhřevu (Voldřich, 2002b).

Většina vegetativních buněk je usmrcována už při teplotách 55 – 65 ºC. Jejich D-hodnota při teplotě 65 ºC (čili D_{65}) bývá obyčejně 0,2 – 2,0 minut. Gramnegativní bakterie, např. *Escherichia coli* (D_{65} = 0,1 min) jsou významně termolabilnější než grampozitivní, např. *Enterococcus* (D_{65} = 5-30 min). Významně rezistentní vůči působení vyšších teplot jsou

endospory bakterií rodů *Bacillus* a *Clostridium*, které jsou devitalizované až při teplotách 130 ºC (Görner a Valík, 2004).

3.2.1.2. z-hodnota

Zatímco *D*-hodnota odráží odolnost organismu na určitou teplotu, *z*-hodnota poskytuje informace o relativní odolnosti organismu k různým destruktivním teplotám (Jay et al., 2005). Víme, že čím je záhřev určité populace mikroorganismů vyšší, tím rychleji mikroorganismy odumírají. V podstatě z-hodnota udává o kolik stupňů celsia se musí zvýšit teplota záhřevu, aby se D-hodnota snížila na 1/10.

z-hodnota se vypočítá ze vztahu:

$$z = \frac{T_1 - T_2}{\log D_2 - \log D_1}$$

Kde: D_1 = D-hodnota při teplotě T_1

D_2 = D-hodnota při teplotě T_2

Vegetativní bakterie, kvasinky a plísně mívají z-hodnoty v oblasti 4,4 – 6,6 ºC, endospory rodů *Clostridium* a *Bacillus* 3 – 30 ºC (Görner a Valík, 2004).

3.2.1.3. Q_{10}-hodnota

Q_{10}-hodnota udává, o co rychleji proběhne devitalizace mikroorganismů, když se devitalizační teplota prostředí zvýší o 10 ºC (Görner a Valík, 2004).

Podle této definice je mezi z-hodnotou a D-hodnotou přímý vztah:

$$Q_{10} = 10^{\frac{10}{z}}$$

3.2.1.4. F-hodnota

F-hodnota udává počet minut, které jsou potřebné při teplotě 121 ºC k dosažení určitého letálního efektu (Görner a Valík, 2004). Integrovaná smrtící hodnota tepla přijatá všemi body v nádobě při zpracování je označována jako F_0. F_0 představuje míru schopnosti tepelného procesu, ke snížení počtu spor nebo vegetativních buněk daného organismu v nádobě (Jay et al., 2005). Například hodnota F_0 = 5 znamená, že k dosažení určitého

letálního efektu sterilizovaného obsahu je potřeba 5 minut při teplotě 121 ºC (Görner a Valík, 2004).

F_0-hodnota se vypočítá ze vztahu:

$$\mathbf{F_0 = D (\log a - \log b)}$$

Kde: D = teplotní rezistence hlavního mikroorganismu

a = počáteční počet mikroorganismů v objemu

b = požadovaný počet mikroorganismů v objemu po sterilizaci

3.2.1.5. Koncept 12-D

Koncept 12-D se vztahuje k procesu smrtícího požadavku v konzervárenském průmyslu a naznačuje, že minimální tepelný proces by měl redukovat pravděpodobnost přežití nejodolnějších *Clostridium botulinum* spór k 10^{-12}. Vzhledem k tomu, že spóry *Cl. botulinum* neklíčí a neprodukují toxin při pH nižším než 4,6, je tento koncept používaný pouze u potravin s hodnotou pH nad 4,6 (Jay et al., 2005).

K dosažení dostatečné zdravotní bezpečnosti se požaduje, aby se počet spór v jednom obale s potravinou snížil o 12 logaritmických řádů (kocept 12-D) (Görner a Valík, 2004).

Příklad ze „Stumba“ ilustruje tento koncept z hlediska konzervárenské technologie. Pokud se předpokládá, že každá konzerva potraviny obsahuje pouze jednu sporu *Cl.botulinum,* F_0 může být vypočítáno použitím obecné rovnice:

$$\mathbf{F_0 = D (\log \mathit{a} - \log \mathit{b})}$$

$$\mathbf{F_0 = 0{,}21 (\log 1 - \log 10^{-12})}$$

$$\mathbf{F_0 = 0{,}21 \times 12 = 2{,}52\ min}$$

nebo

$$\mathbf{F_0 = 0{,}21 (\log 10^{12} - \log 1)}$$

$$\mathbf{F_0 = 0{,}21 \times 12 = 2{,}52\ min}$$

To znamená, že zpracováním po dobu 2,52 minuty při 121 ºC, by se měl snížit počet spór *Cl. botulinum* na jednu sporu v 1 z bilionu (10^{12}) konzerv (Jay et al., 2005).

3.3. Typy konzerv

Konzervací se rozumí každý úmyslný zákrok, popřípadě úprava potravin, prodlužující skladovatelnost suroviny po dobu delší než je jejich přirozená údržnost (Babička et al., 2007). Konzervované produkty lze podle způsobu tepelného opracování rozdělit do 5 základních skupin (viz. tabulka 1), kterými jsou – polokonzervy, třičtvrtěkonzervy, normální konzervy, konzervy do tropů a shelf-stable-products (SSP).

Tabulka 1

Mikrobiologické třídění masových konzerv (podle Leistner et al., 1970)

Označení a maximální skladovatelnost	**Tepelné opracovaní**	**Záhřevem jsou devitalizované**
I. Polokozervy 6 měsíců, < 5 ºC	65 – 75 ºC	většina vegetativních mikroorganismů
II. Třičtvrtě konzervy 6-12 měsíců, <15 ºC	F_0 = 0,65 – 0,80	všechny vegetativní mikroorganismy a spory mezofilních druhů *Bacillus*
III. Normální konzervy 4 roky, < 25 ºC	$F_0 \geq 5,0$	jako u II. a spory mezofilních klostridií
IV. Konzervy do tropů 1 rok, > 40 ºC	$F_0 \geq 15 - 20$	jako u III. a spory termofilních druhů *Bacillus* a *Clostridium*
V. Shelf-stable-products a_w – SSP 1 rok při 20 ºC	75 – 80 ºC $a_w < 0,95$	vegetativní mikroorganismy a přežívající mikroorganismy jsou v jejich rozvoji brzděné

3.3.1. Konzervy (normální konzervy)

Za normální konzervy jsou označovány produkty konzervačních zákroků, jejichž trvanlivost je téměř neomezená, pokud jde o působení mikroorganismů (Babička et al., 2007).

Konzervy jsou sterilní produkty, které jsou získávány zahřátím konzervovaného produktu v obalech na F_0-hodnoty ≥ 5. Obaly jako jsou například pocínovaný plech, hliník, sklo, termorezistentní plastické hmoty (např. polypropylen a jiné), znemožňují následnou rekontaminaci. Mezi konzervy jsou řazeny i kyselé pasterizované produkty, jejichž hodnota pH je nižší jak 4,5 (např. ovocné šťávy), neboť při tak nízkém pH nemohou spory, které přežily pasteraci, vyklíčit (Görner a Valík, 2004).

Někdy je nesprávně označována jako konzerva také plechovka – dóza vyráběná obdobným způsobem, ale produkt v ní však nebývá konzervován (Žižková a Caisová, 2011).

3.3.2. Konzervy do tropů

V konzervách určených do tropických regionů musí být devitalizované i spory termofilních bakterií (např. rody *Bacillus* a *Clostridium*), proto musí být záhřev uskutečněný na F_0-hodnoty až do 20 (Görner a Valík, 2004).

3.3.3. Polokonzervy

Za polokonzervy považujeme zboží, jehož trvanlivost je zvýšená pouze na omezenou dobu, nejvýše 6 měsíců, za předpokladu dodržení předepsaných skladovacích podmínek (Babička et al., 2007).

Polokonzervy se na devitalizaci vegetativních mikroorganismů podrobují pouze pasterizací nebo vařením (např. vařené marinády, potraviny v aspiku). Růstu mikroorganismů zabrání i konzervované kyselé roztoky (kyselina octová) anebo se k nim přidávají povolené konzervační látky (např. kyselé rybí produkty a marinády). Polokonzervy nejsou trvanlivým produktem a i v chlazených skladech mají jen omezenou trvanlivost. Mezi polokonzervy se řadí i termolabilní masové konzervy, které byli v jádře zahřáté jen na 65 až 75 ºC. Při těchto způsobech konzervace nejsou devitalizované bakteriální spory a můžou v nich přežívat i termorezistentní nesporotvorné bakterie, například rod *Enterococcus*. Proto se polokonzervy musí skladovat v chlazených skladech (Görner a Valík, 2004).

3.3.4. Třičtvrtě konzervy

K třičtvrtě konzervám se řadí konzervárenské produkty v obalech zabraňujících jejich rekontaminaci, jako jsou například vařené uzeniny, jaterní výrobky a jiné, které se zahřívají na F_0-hodnoty 0,6 až 0,8 (Görner a Valík, 2004).

3.3.5. SSP produkty

Tzv. SSP produkty (shelf-stable products) jsou potraviny v obalech zabraňující jejich rekontaminaci. Při pokojové teplotě mají trvanlivost až jeden rok (datum minimální trvanlivosti). Jejich trvanlivosit se dosahuje záhřevem na teploty < 100 ºC a pomocí doplňujících faktorů vnitřního prostředí, například snížením jejich a_w-hodnoty na méně než 0,95 (Görner a Valík, 2004).

3.4. Odolnost mikroorganismů

3.4.1. Tepelná odolnost

Obecně platí, že tepelná odolnost mikroorganismů se týká jejich optimální růstové teploty. Psychrofilní mikroorganismy jsou velmi citlivé na teplo, následují mikroorganismy mezofilní a termofilní. Sporulující bakterie jsou obecně více tepelně odolné než bakterie nesporulující. Z toho termofilní sporulující jsou ještě více tepelně odolné než mezofilní sporulující. S ohledem na Gramovu reakci, mají tendenci Gram-pozitivní bakterie být více tepelně odolné než bakterie Gram-negativní. Koky jsou odolnější než nesporulující tyčinky. Kvasinky a plísně, mají tendenci být poměrně citlivé na teplo (Jay et al., 2005).

Pro určení relativní odolnosti spor nebo vegetativních buněk proti teplu mohou být použity D-hodnoty. Zatímco spory nejvíce tepelně odolných kmenů *Cl.botulinum* typů A a B mají D-hodnotu 0,21, tepelně odolné teplomilné spory *Geobacillus stearothermophilus* mají D-hodnoty kolem 4,0 -5,0 (Jay et al., 2005).

Odolnost vůči vysokým teplotám také ovlivňují faktory prostředí, jako jsou pH, a_w (vodní aktivita, z angl. water activity) a přítomnost ochranných látek. Nejtermorezistentnější bývají mikroorganismy při takových hodnotách pH, při kterých je jejich růst optimální. S klesající hodnotou pH prostředí klesá i termorezistence mikroorganismů. Kyselé prostředí tedy zvyšuje mikrobicidní účinky sterilace, čehož se využívá v konzervárenském průmyslu. Při devitalizaci mikroorganismů přenáší letální energii na mikroorganismy voda. Proto s klesajícími hodnotami a_w termorezistence výrazně stoupá. Ochranné látky: tuky, bílkoviny a sacharidy jako složky potravin zvyšují termorezistenci buněk tím, že je obklopují jako ochranný koloid, který má nižší tepelnou vodivost jako voda samotná (Görner a Valík, 2004).

3.4.2. Tlaková odolnost

Mikroorganismy nejsou odolné pouze vůči teplu ale i vůči tlaku. A stejně jako u tepla jsou Gram-pozitivní bakterie odolnější než Gram-negativní. Z hlediska růstu populace jsou buňky rostoucí exponenciálně více citlivé na tlak, než buňky ve stacionární fázi (Smelt, 1998).

Zatímco většinu vegetativních forem bakterií, kvasinky a plísně lze deaktivovat při tlaku v rozmezí 300 a 600 MPa, bakteriální spory mohou přežívat tlaky přes 1000 MPa. Jsou tedy přímo zabity až tlakem vyšším než 1000 MPa. Spory jsou však citlivé i na tlak mezi

50 a 300 MPa, při kterém je stimulováno jejich klíčení. Spory vyklíčí, a následně můžou být zabity relativně mírným tepelným zpracováním nebo mírným tlakovým ošetřením. Avšak, ve většině případů může malý zlomek spor tento způsob ošetření přežít. V atmosférických podmínkách je často nutná "aktivace" spor před klíčením. Aktivace může být dosaženo nízkým pH nebo teplem (Smelt, 1998).

Bylo zjištěno, že maximální odolnost proti tlaku se pohybuje kolem neutrálního až mírně zásadité pH. Škodlivý účinek nízké a vysoké hodnoty pH se neutralizuje roztokem chloridu sodného a glukosy (Timson et Short, 1965).

I když zatím není známo, zda tlak může skutečně zvýšit odolnost vůči fyzickému ošetření, buňky vystaveny dalšímu stresu jinému než tlak (např. subletální teplo) se stávají odolnější vůči tlaku. Například *Lactobacillus plantarum* v exponenciální fázi je více odolný proti tlaku, když buňky jsou pěstovány při suboptimální teplotě (Smelt, 1998).

3.4.3. Srovnání tepelné a tlakové odolnosti

Bakteriální spory jsou velmi odolné proti teplu a tlaku, ale zdá se, že mezi odolností vůči tlaku a teplu v rámci spor u sporulujících bakterií není žádný vztah. Byly zkoumány tlakové odolnosti spor šesti kmenů *Bacillus spp.* při teplotách 5 až 10 ºC, a byly srovnány s jejich tepelnými odolnostmi. Tlakovým ošetřením (při 981 MPa po dobu 40 minut a při 588 MPa po dobu 120 min) nebyly inaktivovány spory *G. stearothermophilus*, *B. subtilis* a *B. licheniformis*. Nicméně, tyto spory měly velké rozdíly v tepelné odolnosti. Například spory *B. megaterium* byly 9,3 krát více odolné proti tlaku, ale 246 krát méně tepelně odolné než *B. stearothermophilus*. Spóry *B. coagulans* byly aktivovány tlakovým ošetřením. (Nakayma et al., 1996).

3.5. Spory a jejich tepelná odolnost

Extrémní tepelná odolnost bakteriálních spor způsobuje velké znepokojení v tepelném uchování potravin. Přes intenzivní studium v průběhu několika desetiletí, přesný důvod, proč jsou bakteriální spory tak tepelně odolné, není stále zcela jasný (Jay et al., 2005).

Z důvodů vystavování bakterií stresům jako je například hladovění, vytvořili různé druhy bacilů a klostridií tzv. „spící“ typ buněk, nazývaný spory (Driks, 1999). Spory se vyskytují všude na zemi a byly nalezeny i ve velmi starých geologických útvarech. Jsou určeny k zachování rodu a v jejich podobě bakterie přečkávají nepříznivé období (Lát a Hökl, 1954). Vydrží tedy celou řadu útoků, které by vegetativní buňky nepřežily. To už pozoroval Robert Koch před 100 lety, že *Bacillus anthracis* pomocí výtrusů přežil var, a tím podnítil začátek studia spor s cílem zjištění, jak tento zvláštní „spící“ typ buněk může vydržet teplo a další namáhání (Driks, 1999).

Spory rodu *Bacillus* jsou vysoce odolné „spící“ buňky vykazující vysokou odolnost vůči namáhání v oblasti životního prostředí. Spora je obklopena strukturálně komplexním proteinovým pláštěm, který se skládá z několika soustředných vrstev obalujících dehydrovaný genetický materiál ve středu. Jeden z těchto obalů, volně zesítěná vrstva peptidoglykanu (mureinu), nazývaná kůra, obklopuje jádro (Sahin, 2012). Tato vrstva je velmi důležitá pro tepelnou a radiační odolnost spor (Turnbull, 1996). Plášť chrání genetický materiál a umožňuje difuzi vody a malých molekul do interiéru spor. Přestože plášť musí být chemicky odolný a pevný, má významnou mechanickou pružnost. Zralá spora není statická. Po ukončení sporulace se její objem zvětšuje nebo zmenšuje v závislosti na relativní vlhkosti prostředí, bez významného odporu pláště. Jakmile jsou k dispozici živiny, spora je schopna zase pokračovat v metabolické aktivitě a vrátit se do vegetativního růstu, proto vyžaduje rychlé shození pláště (Sahin, 2012).

Spora je nejzahuštěnější formou bílkoviny bez všech balastních látek, jsou v ní soustředěny jen podstatné složky bakteriálního těla. Na povrchu je obklopena pevným, tuhým a nepropustným pláštěm (membránou), který ji činí odolnější než bakterie (Lát a Hökl, 1954). Zjistilo se, že dehydratovaný stav vnitřku spor zajišťuje, že spory přežívají ohřev (Driks, 1999). Vysoká odolnost spor ke škodlivým vlivům, například teplotě, se projevuje jednak tím, že voda v nich je vázaná na plasmu a jednak nepatrnou propustností pláště (membrány).

Obsah vody ve sporách je sice o něco nižší než u vegetativních buněk, ale tento rozdíl není tak značný, aby jím byla vysvětlena velká termostabilita spor (Lát a Hökl, 1954).

Teplota potřebná k usmrcení spor je obecně asi o 50 ºC vyšší než teplota potřebná k usmrcení vegetativních buněk. Odolnost mikrobů vůči teplotě závisí na optimální teplotě jejich růstu a množení. I bacily, které vyžadují k růstu a množení vyšší teploty, jsou odolnější vůči teplu. K jejich zničení je třeba vyšších teplot, popřípadě delší doby než u bacilů, které se množí a rostou optimálně při nízkých teplotách (Lát a Hökl, 1954).

Z jedné bakterie vznikne zpravidla jen jedna spora a to tak, že se protoplasma bakteriálního těla zahustí v některém místě. Tak vznikne základ spory, do něhož jsou pojmuty všechny důležité látky. V bacilu se začne tvořit zrnéčkovitý shluk, který může být umístěn buď uprostřed tyčinky (ekvatoriálně) nebo v blízkosti některého konce tyčinky (subterminálně), popřípadě zcela na konci (terminálně). V nebarveném preparátu zrnéčko láme světlo (svítí), při orientačním zbarvení zůstává nezbarveno, neboť velmi obtížně přijímá barviva. Tento základ spory se zvětšuje a vytváří kolem sebe zónu, která se vyvine v pevný obal, doroste tloušťky tyčinky, případně ji i přeroste. Mateřská buňka se zpravidla postupně rozloží, a tak vznikne volná spora. Spora se nemnoží a nevyžaduje živné prostředí. Životní úkony téměř ustávají, bakterie však zůstává na živu prakticky nekonečně dlouho a v příznivých podmínkách opět vyklíčí ve vegetativní, činnou tyčinku (Lát a Hökl, 1954).

Spory rodu *Bacillus* mohou zůstat ve své „spící“ a odolné formě po několik let, ale při obnově živin v prostředí se můžou navrátit k životu během několika minut v procesu klíčení. Tento proces vyžaduje určitý počet specifických proteinů, z nichž většina je ve vnitřní membráně spor nebo alespoň k ní připojená. Tyto proteiny zahrnují klíčící receptory, které reagují na živiny (Setlow, 2014).

Při klíčení se stěna spory vydouvá, prodlužuje, ztenčuje a nakonec praská. Doba klíčení spor ve vegetativní buňky značně kolísá a závisí na teplotě a vlhkosti. Nejrychleji spory klíčí při teplotě optimální pro množení příslušných bacilů. Převážná část bakterií klíčí v rozmezí teplot od 8 do 53 ºC, přitom optimální hranice kolísá od 28 do 37 ºC. K vyklíčení spor je dále nezbytná vlhkost (volná voda). V suchých výrobcích nebo ve výrobcích, v nichž je voda pevně vázaná, spory nevyklíčí (Lát a Hökl, 1954).

Problematika tvorby spor není jednoznačně objasněna. Tvorba spor nesouvisí s nepříznivými podmínkami ani se stářím kultury. Tvorba spor začíná ke konci aktivního

vzrůstu kultury. Také bylo zjištěno, že sporotvorné zárodky tvoří spory i za optimálních podmínek v prostředí bohatém na živiny. Zdá se tedy, že tvorba spor je normální částí vývojového cyklu některých mikroorganismů (Lát a Hökl, 1954).

Události zapojené do sporulace vegetativních buněk a klíčení spor jsou komplexní a jsou ovlivněny faktory jako je teplota, pH a dostupnosti některých dvojmocných kationtů (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}), uhlíku a sloučenin obsahujících dusík. Spory vzniklé za různých podmínek, mají různou stabilitu a stupně odolnosti proti teplu, záření, chemickým látkám, vysušení a dalším nepříznivým podmínkám (Turnbull, 1996).

Zjistilo se, že jednomocné soli, například chlorid sodný, chlorid amonný, chlorid draselný apod. působí stimulačně na tvorbu spor aerobních mikroorganismů. Naproti tomu soli dvojmocné a vícemocné vznik spor nepodporují. A také, že dusičnan sodný v 1 % koncentraci zabraňuje sporulaci *Cl. botulinum*, kdežto soli amonné tvorbu spor *Cl. botulinum* podporují. Sporulaci klostridií a bacilů také podporuje vápník a fosfor. Vápník je též ve vysokém procentu obsažen ve sporách (Lát a Hökl, 1954).

Tepelná odolnost spor je spojena s dehydratací protoplastů, mineralizací a tepelnou adaptací. U kyseliny dipikolinové (pyridin - 2, 6 - dikarboxylové kyseliny nebo PDC a DPA), která je charakteristická pro bakteriální spory, se věřilo, že je zodpovědná za tepelnou odolnost, zejména jako dipikolinát vápenatý. Avšak bylo zjištěno, že tepelná odolnost není na komplexu závislá, a právě jakou roli hraje v tepelné odolnosti, není zcela jasné (Jay et al., 2005). DPA u rodu *Bacillus* obsahuje přibližně 10 % suché hmotnosti spor. A i když se velmi pravděpodobně podílí na odolnosti spor proti vlhkému teplu a stabilitě spor, konečný důkaz o úloze této molekuly stále chybí. Například kmen FB122 *Bacillus subtilis* produkoval velmi stabilní spory, které postrádaly DPA, a sporulace tohoto kmene s DPA přinesla spory s téměř normální úrovní DPA. (Setlow et al.,2006). Malé proteiny rozpustné v kyselině (SASP) typu alfa / beta se nacházejí ve sporách, a tím také přispívají k tepelné odolnosti. Tepelná odolnost se zdá být spojena i s kontraktilní kůrou, která buď snižuje obsah vody protoplastů, nebo ji udržuje ve stavu dehydratace. Je opodstatněné, že dehydratace a zmenšení protoplastů je hlavním faktorem tepelné odolnosti spor, ale ostatní faktory mají aditivní účinek (Jay et al., 2005).

Spory určitého druhu pěstované při maximální teplotě jsou více tepelně odolné než ty pěstované při nízkých teplotách. Zdá se, že obsah vody protoplastů je snížen touto tepelnou

adaptací, což má za následek tepelně odolnější spory. Tepelná odolnost je zevně ovlivněna změnami obsahu minerálních látek. Ačkoli všechny tři faktory uvedené přispívají k tepelné odolnosti spor, dehydratace se zdá být nejdůležitější (Jay et al., 2005).

3.5.2. Ochranný obal spor

Plášť tvoří až 50 % objemu spor, a chrání je před chemikáliemi, enzymy, apod. (Turnbull, 1996). Plášť tvoří vícevrstevnou strukturu obklopující spory a skládá se z více než 25 polypeptidových druhů, organizovaných do několika morfologicky odlišných vrstev. Plášť uděluje rezistenci spor například k šetření chloroformem nebo napadení lysozomem. Plášť však neposkytuje jen ochranu spor, ale také sporám umožňuje reagovat na obnovenou přítomnost živin v prostředí, tím, že je převede na rostoucí buňku prostřednictvím procesu nazývaného klíčení (Driks, 1999).

Mechanismy, které řídí tvorbu pláště, byly do značné míry neznámé až do nedávné doby. Nyní víme, že správné formování pláště závisí jak na genetickém programu, který řídí syntézu komponent spor při vývoji, tak i na morfogenetických proteinech určených k montáži pláště (Driks, 1999).

3.5.2.1. Morfologie spor

Strukura a počet vrstev pláště spor se u různých druhů liší. Od jednoduchého pláště *B. cereus* (složeného z velké části z jednoho druhu proteinu), po relativně složitý plášť *B. sphaericus*. Je možné, že tyto druhově specifické rozdíly ve struktuře odráží funkční rozdíly v plášti, které pomáhají sporulujícím bakteriím přežívat na stanovištích, ve kterých se pohybují. Strukturální rozdíly mezi vrstvami spor různých druhů musí být ještě v korelaci s rozdíly s funkcí pláště (Driks, 1999).

3.5.2.2. Biochemická analýza pláště

Při studiích prováděných v průběhu roků 1960 a 1970, byly stanoveny základní biochemické vlastnosti pláště. Tyto biochemické pokusy ukázaly, že plášť se skládá převážně z proteinů s menším množstvím sacharidů a lipidů, a že obalové proteiny jsou obzvláště bohaté na aminokyseliny tyrosin a cystein (Driks, 1999).

Pláště spor různých bakterií obsahují různé množství polypeptidových druhů, od jednoho významného proteinu v *B. cereus* po více než 25 v *B. subtilis*. Tyto studie také

zjistily, že některé obalové proteiny jsou vysoce zesíťované, což má za následek velké množství nerozpustného materiálu v extraktech pláště (Driks, 1999).

3.5.2.3. Funkce pláště

Hlavní známá a již zmiňovaná funkce pláště je ochrana spor. Plášť se skládá ze dvou vrstev a je zřejmé, že jak vnitřní (tzv. lammellar), tak i hustá vnější vrstva (tzv. elektron) hraje klíčovou roli v ochraně. Příspěvky z vnitřní a vnější vrstvy této funkce může být měřena na základě analýzy „mutantních“ spor, kterým chybí buď vnitřní, nebo vnější vrstva. Schopnost pláště být jako bariéra byla zkoumána měřením schopnosti chránit kůru od lysozymu. Studie cotE spor ukazuje, že vnější vrstva je důležitá pro odolnost proti lysozymu (Zheng, 1988). Spory z gerE mutantního kmene, kterým chybí vnitřní plášť a zůstává pouze zbytek vnějšího pláště, jsou silně citlivé na lysozym - více, než cotE spóry (Moir, 1981). Spory z gerE jsou zhruba stejně citlivé jako spory, kterým chybí, v důsledku kombinace gerE a cotE mutace, jak vnitřní, tak i vnější vrstva (Driks, 1999).

3.6. Kažení konzerv

Kažení je způsobeno přirozeným rozkladem organických látek následkem činnosti enzymů a růstu kvasinek, plísní a bakterií. Tyto procesy potřebují jisté podmínky, jako jsou teplo, vlhko, vyvážené pH faktory a přísun kyslíku. Omezením jednoho nebo více z těchto faktorů se rozklad výrazně zpomalí nebo ustane (Schwartz, 1996).

Kažení konzerv může mít chemické a mikrobiologické příčiny (Görner a Valík, 2004). Ačkoliv cílem tepelné konzervace potravin je zničení všech mikroorganismů, tyto výrobky stejně za určitých podmínek prodělávají mikrobiální kažení. Hlavními důvody pro to jsou procesy, jako nedostatečná sterilace (např. nízká teplota), nedostatečné chlazení a kontaminace konzervy přes švy (Jay et al., 2005). Mikrobiologické znehodnocení může mít původ i v nedotatečném zpracování surovin, které jsou nadměrně mikrobiologicky kontaminované nebo zkažené (Görner a Valík, 2004). Protože některé konzervované potraviny jsou jen nízko-tepelně zpracované, je třeba očekávat, že poměrně velký počet různých typů mikroorganismů se bude v těchto potravinách nacházet (Jay et al., 2005).

3.6.1. Nedostatečná sterilace

Na nedostatečnou sterilizaci poukazuje důkaz sporotvorných bakterií jako jediného původce mikrobiologického kažení. Nejčastěji přežívají spory termofilních bakterií, které jsou obyčejně velmi termorezistentní. Jejich minimální růstová teplota je vysoká (≥ 40 ºC), proto se jimi způsobené kažení konzerv zpravidla vyskytuje v tropech. Sporotvorné bakterie, zejména klostridie, tvoří při fermentaci plyny (H_2, CO_2, H_2S a NH_3), což způsobuje bombáž obalů, nepříjemný zápach (hnilobný, nakyslý), změnu textury a barvy obsahu nebo silné či slabé kysnutí. (Görner a Valík, 2004).

3.6.2. Nedostatečné chlazení

Je-li chlazení příliš pomalé, nedostatečné nebo jsou plechovky uloženy při velmi vysokých teplotách například v tropických zemích, mohou růst a množit se vysoce odolné spóry například *G. stearothermophilus*. Optimální teplota pro růst tohoto organismu se pohybuje mezi 59 a 65 ºC. Při teplotě 28 ºC, nebo při hodnotě pH menší než 5 růst nebude. Spolu s *B. oagulans* jsou hlavní příčinou "flat-sour" kažení v konzervovaných potravinách. Většina kmenů *B. coagulans* roste při teplotách 50-55 ºC. Růst budou také i ve více kyselých podmínkách (Collinns et al., 1995).

3.6.3. Kontaminace přes švy

Netěsnost se může projevovat ve formě tenkých vlasových trhlin obalů nebo nedostatečně těsných spojů - spoj pláště a dna, boční šev (Jay et al., 2005). Po autoklávování a během chlazení vznikne v plechovce záporný tlak a chladící voda, obsahující baterie může být vpravena dovnitř. Konzervované potraviny tak mohou být kontaminovány patogeny. Jen velmi málo organismů, patogenů je třeba vpravit do plechovky, protože se rychle množí. Z důvodu kontaminace se musí používat voda pitná (Collins et al., 1995). Kažení netěsných konzerv při chlazení je charakteristické pro nesporulující organismy, které by tepelné zpracování nepřežily. Tento způsob kažení konzervárenských potravin se někdy označuje jako tzv. "únikový - typ" kažení. Organismy vstoupí do konzervy na začátku chlazení pomocí vadných švů, které obvykle vznikají poškozením konzervy a lze je nalézt buď na konzervě, nebo v chladicí vodě (Jay et al., 2005). Do úvahy přichází například čeleď *Enterobacteriaceae* nebo bakterie mléčného kvašení ale i kvasinky. Mikroskopické vláknité houby (plísně) se pro jejich náročnost na kyslík vyskytují jen při větších netěsnostech. Nejsou tu vyloučené ani původci alimentárních intoxikací a toxikoinfekcí, jako například *Cl. perfringens*, *Cl. botulinum*, salmonely a jiné (Görner a Valík, 2004). Tento způsob kažení je minimalizován, pokud konzervárna chladí vodou obsahující menší množství jak 100 bakterií / ml (Jay et al., 2005).

3.6.4. Nedostatečné zpracování potravin

Tato situace může nastat, když se s materiálem, který bude konzervován, nesprávně manipuluje. Například předvařené maso s velkým počtem přežívajících spor uchované příliš dlouho ve vysokých teplotách může mít za následek vyklíčení spor a produkci plynu. V takto pozdně konzervovaných produktech budou mikroorganismy inaktivovány, ale již vytvořený plyn způsobí nafouknutí (Collinns et al., 1995).

3.6.5. Diagnostika kažení

Při diagnostice příčiny kažení konzervovaných potravin jsou někdy důležité minimální růstové teploty kažení termofilních. Bylo zjištěno například, že *B. coagulans* (*B. thermoacidurans*) roste pomalu při teplotě 25 ºC, ale dobře roste při teplotách 30 – 55 ºC. *G. stearothermophilus* neroste při teplotě 37 ºC, její optimální teplota je okolo 65 ºC. *T. thermosaccharolyticum* nerostou při 30 ºC, ale byl hlášen růst při 37 ºC (Jay et al., 2005).

Významné v diagnostice příčiny kažení konzervovaných potravin je také vzhled neotevřené konzervy. Konce konzerv jsou obvykle ploché nebo mírně konkávní. Ale při růstu mikroorganismů jsou produkovány plyny a tím může dojít k řadě změn, které jsou viditelné z vnějšku. Konzerva označovaná jako „*flipper*“, má jeden konec vypouklý (konkávní) úderem nebo ohříváním konzervy (Jay et al., 2005). Konzerva označovaná jako „*springer*“ je způsobena další tvorbou plynu. Stisknutím jednoho konec plechovky způsobí, že druhý konec vyskočí v bouli. V další fázi je tzv. "swell ", kdy jsou vyboulené oba konce plechovky (Collinns et al., 1995). „*Soft swell*“ odkazuje na konzervy s oběma konci vyboulenými, které mohou být promáčknuté pouze stisknutím prsty. „*Hard swell*“ má oba konce vyboulené tak, že ani jeden konec nemůže být promáčknut ručně. „*Flippers*“ a „*springers*“ mohou být inkubovány pod pokličkou při teplotě odpovídající pH a typu potravin, aby nebyl možný další růst jiných organismů, které by mohly být přítomny. Tyto efekty v konzervách ne vždy představují pouze mikrobiální kažení (Jay et al., 2005).

Všeobecně lze shrnout příčiny bombáže, ať již pravé nebo nepravé, asi takto: přeplnění konzerv, příliš nízká teplota obsahu při uzavírání (teplem se jeho objem zvětší), nedostatečné odvzdušnění, dlouhé časové rozmezí od naplnění do sterilace (značně se pomnoží mikroorganismy), konzervování kazícího se masa (tedy masa s vysokým obsahem mikroorganismů, často sporotvorné), porušení souvislosti obalu (prorezavění), netěsné uzávěry, výkyvy ve vlhkosti a teplotě skladiště, nešetrné zacházení s konzervami, chemické reakce mezi příměsí a masem, chemické reakce mezi obalem a obsahem (Lát a Hökl, 1954).

„*Soft swell*“ často představuje mikrobiální kažení, stejně jako „*hard swell*“. Ve vysoce kyselých potravinách jsou však „*hard swell*“ často „*hydrogen swell“*, které vyplývají z uvolňování plynného vodíku působením potravinářských kyselin na železo plechovky. Další dva nejběžnější plyny v konzervách znehodnocených potravin jsou CO_2 a H_2S, z nichž oba jsou důsledkem metabolické aktivity mikroorganismů. Zatímco sirovodík se může poznat jeho charakteristickou vůní, CO_2 a vodík mohou být stanoveny pouze zkouškou (Jay et al., 2005).

Kažení nemusí mít za následek vždy tvorbu plynu. Další znehodnocení bude zřejmé, až když se plechovka otevře. Tento druh kažení se někdy označuje jako tzv. " flat-sour " kažení (Collinns et al., 1995). „Flat sour“ způsobuje například *Bacillus coagulans*. (Görner a Valík, 2004). Některé potraviny kontaminovány patogeny, například *Salmonella typhi*, se může při otevření projevit zvukem. (Collins et al., 1995).

3.7. Rozdělení konzerv podle pH

Klasifikace konzervovaných potravin na bázi kyselin:

3.7.1. Mírně kyselé potraviny (pH > 4,6)

Do této kategorie patří maso, mořské produkty, mléko, některé druhy zeleniny (např. kukuřice, fazole), masové a zeleninové směsi, ryby (obvykle o pH 5,0) a tak dále (Jay et al., 2005). V těchto potravinách dochází k růstu termofilních sporotvorných bakterií například *B. stearothermophilus* (s minimální růstovou teplotou T_{min} = 45 až 30 ºC) který v nich způsobuje slabé kysnutí bez tvorby plynu, tzv. „flat-sour“ kažení. *Cl. nigrificans* čili *Desulfotomaculum nigrificans* (T_{min} = 27 ºC) tvoří sirovodík, který reakcí se železem dává černý sulfid železnatý – FeS (Görner a Valík, 2004). *Cl. nigrificans* způsobuje tzv. "sulphur stinkers" (Collins et al., 1995). *Clostridium thermosaccharolyticum* (T_{min} = 43 až 35 ºC) způsobuje bombáže konzerv, kysnutí a slabě nakyslý zápach nejvíce v zeleninových a jiných konzervách obsahujících sacharidy (Görner a Valík, 2004). Tento jev se někdy také nazývá jako "hard swell" (Collins et al., 1995).

Jelikož se konzervy skladují při středních teplotách, může se na jejich kažení zúčastnit i řada mezofilních sporulujících bakterií, jako například *Cl. sporogenes* a toxin tvořící *Cl. botulinum* typu A a B, který tvoří plyn a hnilobný zápach (Görner a Valík, 2004).

3.7.2. Kyselé potraviny (pH 4,6 až 3,7)

Pokud je hodnota pH 3,7 - 4,6, stejně jako ve většině konzervovaného ovoce, aerobní a anaerobní nositelé spor můžou způsobit kažení, ale není to běžné. Tyto potraviny nejsou obvykle pod tlakem. Jsou příliš kyselé pro růst většiny bakterií a zkažení je neobvyklé (Collins et al., 1995). Nicméně kažení můžou způsobit například termofilní *B. coagulans*, který způsobuje mírné kysnutí bez tvorby plynu (Görner a Valík, 2004). Mezi mezofilní sporulující bakterie se řadí například *B. polymyxa (B. macerans), Cl.pasteurianum, Cl. butyricum, Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, laktobacily, a další (Jay et al., 2005). *Cl. pasteurianum* tvoří v konzervách plyn (bombáž) a kyselinu máslovou. V nedostatečně zahřátých kyselých potravinách se jako škůdci vyskytují i kvasinky a bakterie mléčného kvašení (Görner a Valík, 2004).

3.7.3. Velmi kyselé potraviny (pH < 3,7)

Tato kategorie zahrnuje ovoce, ovocné a zeleninové výrobky - například nakládanou zeleninu, citrusové plody, ovocné šťávy, zelí, okurky, a tak dále (Jay et al., 2005). Silně kyselé potraviny se obyčejně jen pasterizují (Görner a Valík, 2004). Tyto potraviny jsou obecně kaženy nesporulujícími mezofilními kvasinkami, plísněmi, *Alicyclobacillus spp.*, a bakteriemi mléčného kvašení. *Alicyclobacillus spp.* může růst a způsobit zkažení jablečné, rajčatové a bílé hroznové šťávy (Jay et al., 2005). Tyto potraviny obvykle nejsou pod tlakem během ohřevu (Collins et al., 1995).

Tabulka 2

D-hodnoty vybraných mikroorganismů, které se častěji účastní kažení konzerv (upraveno podle Krämer, 1987)

Mikroorganismy a jejich prostředí	Teplota úpravy (ºC)	D-hodnota (min)
Mírně kyselé (pH > 4,6)		
Termofilní bakterie		
Cl. thermosaccharolyticum	120	3 až 4
G. stearothermophilus	120	4 až 5
Cl. nigrificans	120	2 až 3
Mezofilní mikroorganismy		
Cl. botulinum typu A a B	120	0,1 – 0,2
Kyselé (pH 4,6 – 4, 0)		
Termofilní bakterie		
B. coagulans	120	0,1 (0,01 až 0,07)
Mezofilní bakterie		
B. polymyxa (B. macerans)	100	0,1 až 0,5
Cl. pasterianum	100	0,1 až 0,5
Velmi kyselé (pH < 4,0)		
Mezofilní mikroorganismy		
Bakterie mléčného kvašení, kvasinky a plísně	65	0,5 až 1

3.8. Mikroorganismy

3.8.1. Rod *Clostridium*

Clostridium, je rod tyčinkovitých, obvykle gram-pozitivních sporulujících pohyblivých či nepohyblivých bakterií. Nacházejí se v půdě, vodě, a střevním traktu lidí a jiných živočichů. Většina druhů má oválné nebo kulovité spory, které obvykle roztahují buňku. Spory jsou vysoce odolné vůči teplu, vysušení, toxickým chemikáliím a detergentům (Jay et al., 2005). Většina druhů je obligátně anaerobní, avšak tolerance ke kyslíku se velmi liší. Některé druhy můžou růst i v přítomnosti vzduchu při atmosférickém tlaku, ale nemůžou zde však tvořit spory. Pro většinu druhů je růst nejrychlejší při teplotě mezi 30 a 37 ºC a při pH 6,5 – 7. V současné době je známo asi 168 druhů tohoto rodu (Vos, 2009). Druhy jsou variabilní ve velikosti. Například typický druh *C. butyricum* se pohybuje v rozmezí od 0,6 mikrometrů v průměru a od 3 do 7 mikrometrů v délce. Ve své aktivní formě vylučují tyto bakterie silné toxiny, které jsou zodpovědné za takové onemocnění, jako tetanus, botulismus. Toxiny jsou relativně tepelně stabilní, ale můžou být zničeny vařením. Čtyři klinicky nejvýznamnější druhy jsou *Clostridium botulinum, Clostridium tetani*, *Clostridium difficile* a *Clostridium perfringens* (AvianBiotech, 2009).

Clostridium botulinum je organismus, který způsobuje botulismus. Obecně je přítomen v půdě. Požití organismu není škodlivé. Nebezpečí hrozí, až tehdy, když jsou příznivé podmínky pro růst a následně i pro tvorbu toxinu. Toxin produkovaný bakterií *C. botulinum*, je považován za jeden z nejsilnějších přírodních jedů. Organismu se nejlépe daří ve vlhkém vzduchu a relativně vysoké teplotě, v prostředí obsahujícím rozpadající se organické materiály (rostlina nebo zvíře). Rozkládající se zdechliny jsou častým zdrojem toxinu. Vzhledem k tomu, že toxin je rozpustný ve vodě, může dojít ke kontaminaci vodního zdroje a poskytnutí tak zásobníku pro nemoc (AvianBiotech, 2009).

3.8.2. Rod *Bacillus*

Bacillus je rovná tyčinkovitá, Gram-pozitivní bakterie, která tvoří spory a v přírodě je všudypřítomná. Na jednu buňku je formovaná vždy jen jedna spora, víc ne. Tento rod je aerobní nebo fakultativně anaerobní, ale některé druhy můžou být dokonce striktně anaerobní. Rod *Bacillus* je Gram-pozitivní. Některé druhy se s věkem můžou stát i Gram-negativní a některé jsou dokonce rovnou Gram-negativní (Vos, 2009).

Mnoho druhů rodu vykazují širokou škálu fyziologických schopností, které jim umožní žít v každém přirozeném prostředí. Nejen, že jsou spory rodu *Bacillus* odolné vůči teplu, chladu, záření, vysychání, a dezinfekčních prostředků, ale také různé druhy mají neobvyklé fyziologické vlastnosti, které jim umožňují přežít a prosperovat v náročných prostředích, od pouštního písku, horkých pramenů až po arktické půdy (Turnbull, 1996).

Některé druhy jsou používány v mnoha lékařských, farmaceutických, zemědělských a průmyslových procesech, které využívají jejich širokou škálu fyziologických charakteristik a jejich schopnost produkovat řadu enzymů, antibiotik a jiných metabolitů. Bacitracin a polymyxin jsou dva známé antibiotika získané z rodu *Bacillus*. (Turnbull, 1996).

3.8.3. Rod *Geobacillus*

Geobacillus je rod grampozitivních sporulujících aerobních tyčinek. Nejznámějším druhem je *G. stearothermophilus*, který je však fakultativně anaerobní a může vyvolávat kažení konzerv. Je rezistentní vůči $NaNO_2$. Onemocnění z potravin nevyvolává. (Jay et al., 2005). Jeho tyčinky jsou elipsoidní, někdy válcovité a jsou 2 – 3,5 μm dlouhé a 0,6 – 1,0 μm v průměru (Vos, 2009). Vyskytují se buď samostatně, nebo v krátkých řetězcích a díky Peritrichálním bičíkům jsou pohyblivé. Kolonie jsou různého tvaru a velikosti. Růstová teplota se pohybuje v rozmezí 37 až 75 ºC, s optimem při 55 až 65 ºC a pH růst se vyskytuje v rozmezí pH 6,0 až 8,5 (Zeigler, 2001). Spory jsou extrémě termorezistentní a jsou lokalizovány subterminálně, někdy terminálně (Vos, 2009).

3.8.4. Rod *Byssochlamys*

Jsou mikroskopické houby – plísně, taxonomicky řazené mezi askomycety. Tvoří odolné spory, které se svou termorezistencí blíží bakteriálním sporám. Vydrží teplotu až 90 ºC po dobu až 12 minut. Vyvolávají kažení pasterovaných ovocných kompotů. Na rozdíl od většiny ostatních plísní tolerují nízký oxidačně-redukční potenciál (Jay et al., 2005).

3.9. Metody konzervování potravin

3.9.1. Odstraněním mikroorganismů

Ultrafiltrace – způsob konzervace čirých ovocných šťáv a podobných výrobků, při kterém je materiál filtrován přes membránu nepropustnou pro mikroorganismy (Voldřich, 2002a).

Baktofugace – metoda odstranění bakteriálních spor v mléce odstředěním, která je používána spolu s dalšími zákroky zejména pasterací (Voldřich, 2002a).

3.9.2. Tepelným zákrokem

Záhřev na teploty, při kterých dochází k inaktivaci mikroorganismů, je součástí většiny procesů používaných při zpracování potravin nebo přípravě pokrmů. Různé mikroorganismy a jejich formy jsou různě odolné vůči záhřevu. Obecně vegetativní formy většiny bakterií (vyjma termofilních) jsou inaktivovány záhřevem 10 minut při 65 ºC. Většina termofilních bakteriálních buněk je inaktivována záhřevy od 5 do 10 minut při teplotách 75 až 80 ºC. Ale bakteriální spory jsou odolnější. Na inaktivaci všech druhů spor obvykle stačí 15 minut záhřevu při 121,1 ºC (Voldřich, 2002b).

Pasterace – záhřev na teploty do 100 ºC, který inaktivuje vegetativní formy mikroorganismů a používá se ke konzervaci kyselých potravin, tedy potravin, jejichž pH je menší nebo rovno 4,0 (Voldřich, 2002a). V kyselých potravinách totiž nemohou růst sporulující bakterie, tak není nutné záhřevem inaktivovat i spory (Voldřich, 2002b). V případě pasterace nekyselých (hotových pokrmů apod.) je pasterace doplněna dalším zákrokem např. konzervací sníženou teplotou (Voldřich, 2002a).

Sterilace – záhřev na teploty vyšší než 100 ºC (obvykle 121,1 ºC), která inaktivuje vegetativní formy mikroorganismů včetně bakteriálních spor a používá se ke konzervaci nekyselých potravin, tedy potravin, jejichž pH je vyšší než 4,0 (Voldřich, 2002a).

Frakcionovaná sterilizace (tyndalace) – opakovaný záhřev na tepoty do 100 ºC provedený v průběhu jednoho až několika dnů, který se používá ke konzervaci nekyselých potravin, přičemž opakovaný záhřev umožní inaktivaci přítomných bakteriálních spor po jejich vyklíčení (Voldřich, 2002a).

Blanšírování – tepelná úprava (ovoce a zeleniny), která vede k inaktivaci enzymů, k úpravě konzistence, odstranění vzduchu. Zákrok předchází další způsob konzervace (Voldřich, 2002a).

Při zahřívání musí dojít k dosažení dané teploty ve všech částech potraviny, tj. i v nejhůře prohřívaném místě produktu. U tuhých produktů, jako jsou například masové konzervy, se teplo sdílí vedením. U kapalin (nápoje, homogenní polévky) se teplo sdílí prouděním. Oba tyto způsoby se můžou kombinovat (vedení a proudění) pokud zahříváme kousky v kapalině. Procesy mohou probíhat ve stacionárních nebo rotačních zařízeních (autoklávy), sdílení tepla je závislé na velikosti a tvaru obalů zahřívaných potravin a míře homogenity teplotního pole v zařízení. V každém případě je nezbytné účinky záhřevu posuzovat v nejhůře ohřívaném místě výrobku (Voldřich, 2002b).

3.9.3. Zářením

Ultrafialové záření – záření má malou energii, malou pronikavost, usmrcuje mikroorganismy jen na povrchu, podporuje oxidační procesy. Prakticky se využívá k ošetření povrchů, ošetření vody apod. (Voldřich, 2003a).

Beta záření je pronikavější v porovnání s UV zářením, ale vzhledem k charakteru záření (proud elektronů) má také omezenou pronikavost a používá se k povrchovému ošetření potravin (Voldřich, 2003a).

Gama záření – jediné účinné záření, kterým je možné usmrtit mikroorganismy na povrchu i uvnitř potravin (Voldřich, 2003a).

Obecně platí, čím je organismus menší a jednodušší, tím je odolnější k záření a je nezbytné použití vyšších dávek. Sporulující mikroorganismy, například *Clostridium botulinum* a *Bacillus cereus*, jsou více odolné k záření než nesporolující bakterie (Voldřich, 2003a).

Záření je schopné pronikat obalem do zabaleného materiálu, tím je významně sníženo riziko sekundární kontaminace ošetřených produktů. Avšak záření vyvolává změny obalových materiálů a může tak způsobovat nežádoucí senzorické změny (Voldřich, 2003b).

3.9.4. Dalšími fyzikálními zákroky

Konzervace ultrazvukem – vystavení potraviny působením ultrazvuku, který vede k usmrcení přítomných mikroorganismů (Voldřich, 2002a).

Konzervace vysokým hydrostatickým tlakem – metoda ošetření spočívající ve vystavení potraviny účinku vysokého tlaku (až 10 000 atm) po dobu několika minut, při kterém dojde k usmrcení mikroorganismů (Voldřich, 2002a).

3.9.5. Sníženou teplotou

Průmyslová technologie **mražení** zaručuje vyšší kvalitu než mražení domácí. Domácí mrazničky totiž neprochladí celý objem potraviny dostatečně rychle. A tak do doby celkového prochlazení potraviny se v ní dále mohou množit choroboplodné zárodky. Trvanlivost doma mražených potravin je výrazně kratší. Rozmrazené potraviny se nesmí znovu zmrazovat (Pelcová, 2007).

3.9.6. Osmoanabiozou (snížením vodní aktivity)

Je zřejmé, že potraviny s nižším obsahem vody jsou údržnější a vydrží déle, avšak kromě samotného obsahu vody záleží také na složení potraviny. Zkazitelnost potraviny nezávisí na celkovém obsahu vody, ale na obsahu tzv. volné vody, kterou mohou mikroorganismy využívat (Voldřich, 2004a).

Sušení – zákrok, při kterém je z materiálu odstraněno takové množství vody, aby vodní aktivita produktu bránila rozvoji kazících mikroorganismů. Sušení zahrnují i další technologické operace (pečení, uzení atd.) (Voldřich, 2002a).

Koncentrování - zákrok, při kterém je z materiálu odstraněno takové množství vody, aby vodní aktivita produktu bránila rozvoji kazících mikroorganismů (Voldřich, 2002a). Nejčastějším způsobem koncentrování je odpaření vody (Voldřich, 2004b).

Solení, proslazování – snížení aktivity vody přídavkem látek, které na sebe vodu váží a tím sníží podíl volné využitelné vody pro růst mikroorganismů (Voldřich, 2004b).

3.9.7. Chemicky

Chemosterilace – stabilizace přídavkem chemických látek, které způsobí usmrcení přítomných mikroorganismů. Mezi postupy chemosterilace patří například ozonizace, která slouží k úpravě vody (Voldřich, 2003c).

Chemoanabioza – stabilizace přídavkem chemických látek, které nemusí způsobit usmrcení přítomných mikroorganismů, ale zpomalí jejich životní pochody. Zabrání jejich pomnožení, vyklíčení spor, omezí jejich metabolismu, mikroorganismy mohou postupně hynout (Voldřich, 2004c).

3.9.8. Cenoanabiózou (biologickými metodami konzervace)

Biologické metody konzervace spočívají v podpoře rozvoje úzké skupiny mikroorganismů, která vytváří překážky konkurenční mikroflóře. Konzervační účinek spočívá v produkci metabolitů, které mají inhibiční účinky na jiné nežádoucí mikroorganismy, které neusmrcují, ale potlačují jejich růst. Cenoanabióza zahrnuje konzervaci ethanolovým kvašením, mléčným kvašením a fermentační procesy založené na proteolýze (Voldřich, 2005).

Tabulka 3

Přehled vlastností hlavních patogenních organismů (upraveno podle Voldřich, 2002a)

	Clostridium perfringens	***Clostridium botulinum***
Zdroje kontaminace	Zažívací trakt člověka a zvířat, Prostředí (půdní bakterie)	Zažívací trakt člověka a zvířat, Prostředí (půdní bakterie)
Potraviny, ve kterých se mohou vyskytovat	Masové konzervy	Šunka, masové a zeleninové konzervy, ryby (typ E)
Závažnost	Častý výskyt, termorezistentní spory	Řídce se vyskytující ale velmi nebezpečný. Celková paralýza se smrtelnými následky.
Infekční dávka	Vysoká (10 mg toxinu)	Velmi nízká (0,2 μg toxinu)
Inkubační doba	8 – 24 hodin	12 – 36 hodin
Symptomy	Průjem, nucení ke zvracení, není doprovázeno horečkou	Závrať, poruchy vidění, ochrnutí, smrt
Vlastnosti	G+, sporulující, anaerobní	G-, sporulující, anaerobní

4. Metodika

Sporulující bakterie jsou obecně více tepelně odolné než bakterie nesporulující. A s ohledem na Gramovu reakci, mají tendenci Gram-pozitivní bakterie být více tepelně odolné než bakterie Gram-negativní (Jay et al., 2005). Díky sporám vydrží bakterie celou řadu útoků, které by vegetativní buňky nepřežily (Driks, 1999).

Spory tvoří především tyčinkové bacily, zvláště rody *Clostridium* a *Bacillus*. Oba tyto druhy jsou Gram-pozitivní. Ale zatímco rod *Clostridium* je anaerobní, rod *Bacillus* je aerobní, Aerobní mikroorganismy tvoří spory jen v prostředí s kyslíkem (i když jednotliví příslušníci této skupiny mají různé nároky na kyslík), anaerobní jenom v prostředí bez kyslíku (Lát a Hökl, 1954).

Postup:

Nafouklou konzervu nejprve propíchneme a necháme vyfouknout plyn. Vytvoříme desítkovou ředicí řadu a to tak, že vždy odebereme po ml vzorku a dáme do následující zkumavky. V případě ovocných kompotů začneme jednoduše odebírat 1 ml rovnou z konzervy a dále pokračujeme do zkumavek. Ale v případě masových konzerv, kde nelze první vzorek odebrat do injekční stříkačky, musíme nejprve skalpelem seříznout kousek masa (z různých míst). Snažíme se seříznout 1 g masa, abychom pak dále mohli přidávat po 1 ml v ředící řadě do dalších zkumavek. Jelikož se nikdy nepovede odebrat přesně 1g vzorku, musíme dopočítat, kolik ml přesně budeme dávat do dalších zkumavek (1/množství vzorku, které je odebráno). Aby bylo ředění přesné, musíme použít při každém odebírání novou (čistou) injekční stříkačku.

Když je ředicí řada připravená, tak po ½ ml vzorku z každé zkumavky dáme do Petriho misek (o průměru 60 mm), poté zalijeme agarem a rychle přiklopíme (tím zabráníme kontaminaci) pořádně promícháme tak, že Petriho misku zatočíme šestkrát doprava a šestkrát doleva a necháme zaschnout. Vzorky necháme inkubovat po dobu 24 - 48 hodin při teplotě 35 ºC ± 0,5 ºC. Jelikož zkoumáme výskyt mikroorganismů rodu *Bacillus*, který je aerobní a rodu *Clostridium*, který naopak vyžaduje anaerobní podmínky, je nutné tyto podmínky vytvořit i při výzkumu. To znamená, že Petriho misky, ve kterých očekáváme výskyt aerobních mikroorganismů (hl. rod *Bacillus*) inkubujeme volně, tak jak jsou. Ale

Petriho misky, ve kterých očekáváme výskyt anaerobních mikroorganismů (hl. rod *Clostridium*) musíme inkubovat v anaerostatech (Oxoid).

Po inkubaci spočítáme, kolik a jaké kolonie se vytvořily v jednotlivých Petriho miskách a mikroskopujeme. Počet bakterií vyjadřujeme jako počet kolonií tvořících jednotek na jeden gram (KTJ/g), který vypočteme podle vzorce:

$$\mathbf{P = [(P_1 + P_2)/11] \times F}$$

Kde P_1 a P_2 jsou počty kolonií na dvou po sobě jdoucích počitatelných ředění a F je převrácená hodnota vyššího ředění.

Použitý materiál:

Kultivační médium – Wilkins-Chalgren agar (Oxoid)

Ředicí řady

Zkoumané konzervy – masová, ananasová a broskvová

Popis konzerv:

Masová konzerva – Ďáblík-čertovská pomazánka

Ďáblík byla bombážní konzerva s dobou trvanlivosti 15. 8. 2016 (viz. přílohy).

Ananasová konzerva

Tato konzerva byla poměrně dost bombážní, ale několik let prošlá (viz. přílohy).

Broskvová konzerva

Tato konzerva s dobou trvanlivosti do 31. 12. 2011 byla natolik bombážní, že praskla a vytekla (viz. přílohy).

5. Výsledky a diskuze

V bakalářské práci je uvedena metodika a hrubý nástin výzkumu výskytu bakterií v konzervách. Cílem bylo objevit v bombážních konzervách sporulující bakterie. Podrobnější výzkum však bude proveden až v dalších letech výzkumu (v diplomové práci).

Je popsáno jakým způsobem se má daný vzorek zpracovat, vyhotovit ředicí řada, kde se jednotlivé ředění zalije kultivačním mediem a jakým způsobem se bude kultivovat při zjišťování výskytu určitého rodu.

Zkoumané konzervy:

Masová konzerva – Ďáblík-čertovská pomazánka

Ve svém složení obsahovala E 252, proto se dalo očekávat, že se v ní nebude vyskytovat *Clostridium botulinum.* Po inkubaci při aerobním prostředí byly pozorované kulovité žlutooranžové koolonie a při mikroskopování byly objeveny pohyblivé tyčinky (viz. příloha). Po inkubaci při anaerobním prostředí byly pozorovány velké, skoro průhledné kolonie s nepravidelnými tvary. Mikroskopováním byly pozorovány pohyblivé tyčinky (viz. přílohy).

Prostředí kultivace	**Počet bakterií**
Aerobní	1,909 x 10^2 KTJ/g
Anaerobní	0, 909 x 10^2 KTJ/g.

Ananasová konzerva

Tato konzerva byla bombážní, ale několik let prošlá. Její pH hodnota byla 4, 4. Po inkubaci při anaerobním prostředí byly pozorovány tyčinky.

Prostředí kultivace	Počet bakterií
Aerobní	0,182 x 10^2 KTJ/g
Anaerobní	0, 182 x 10^2 KTJ/g.

Broskvová konzerva

Tato konzerva byla natolik bombážní, že praskla a vytekla. Po inkubaci při aerobním prostředí byly pozorovány koky, diplokok a sarciny. Při anaerobním prostředí byly pozorovány diplokoky.

Prostředí kultivace	Počet bakterií
Aerobní	0,091 x 10^2 KTJ/g
Anaerobní	0, 273 x 10^2 KTJ/g.

Výzkum značně ovlivňuje řada faktorů. Jedním z těchto faktorů je kontaminace kultivačního média spadem z prostředí. Tato kontaminace, která může vzniknout například při úplném otevření Petriho misek, nebo následně pomalým uzavřením. Všechen spad z prostředí nebo neomytá pracovní deska a ruce lihem způsobují, že výzkum není příliš přesný. Dalším faktorem, který ovlivní výsledek sledování je stáří konzervy. Pokud je bombážní konzerva dlouhou dobu prošlá, můžou organismy, které v ní kdysi žili vymřít, tudíž výzkum nemůže být přesný. A v neposlední řadě pokud je konzerva natolik bombážní, že se vytvoří štěrbina/dírka, tak je konzerva kontaminovaná ze vzduchu, uvnitř se vytvoří aerobní prostředí, výzkum tedy nemůže být přesný.

6. Závěr

Sporulace bakterií je schopnost tvořit spory, které slouží k zachování rodu během nepříznivých podmínek. Proto cílem konzervace je snaha zlikvidovat všechny bakterie včetně spor, aby se tak zabránilo kažení konzerv.

Cílem této práce bylo testovat nafouklé konzervy nakoupené v maloobchodních sítích, eventuálně konzervy z domácích zásob. Z výzkumu bylo pozorováno, že bombážní konzervy obsahovaly od 0,091 x 10^2 do 1,909 x 10^2 KTJ/g bakterií a vyskytovaly se hlavně pohyblivé, sporulující tyčinky.

7. Seznam použité literatury

AvianBiotech, 2009. Clostridium [online]. Tallahassee. Dostupné z:

http://www.avianbiotech.com/diseases/clostridium.htm

Babička, L., Kouřimská, L., Prokůpková, L. 2007. Masové a zeleninové konzervy. Moderní obchod. 15 (3). 32 s.

Bitting, A. W. 1937. Appertizing or The Art of Canning; its History and Development. The Trade Pressroom, San Francisco, California.

Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M. 1995. Collins and Lyne´s Microbiological Methods, Seventh edition. Great Britain. ISBN 0 7506 0653 3.

Čurda, D. 2010. „Umění konzervovat na dobu více let všechny látky živočišné i rostlinné“ je tu už 200 let!. Výživa a potraviny. 65 (6). 148 - 149.

Goldblith, S. A. 1971a. Pasteur & Truth in Labelling „Pro bono publico“ – In the Best Scientific Tradition. Food Technology, 25. 228 – 229.

Goldblith, S. A. 1971b. A Condensed History of The Science and Technology of Thermal Processing – Part 1. Food Technology, 25. 1256 – 1262.

Goldblith, S. A. 1972. A Condensed History of The Science and Technology of Thermal Processing – Part 2. Food Technology, 26. 64 – 69.

Görner, F., Valík, Ľ. 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívatín. Malé Centrum. Bratislava. ISBN 80-967064-9-7.

Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. 2005. Modern Food Microbiology, Seventh Edition. Springer. New York. ISBN 0 – 387 – 23180 – 3.

Klescht, V. 2013. Konzervatnty. Potravinářská revue. 2. 37 – 39.

Lát, J., Hökl, J. 1954. Masové konservy. Státní nakladatelství technické literatury. Praha. 424 s.

Moir, A. 1981. Germination properties of a spore coat – defective mutant of Bacillus subtilis. Journal of Bacteriology. 146. 1106 – 1116.

Nakayma, A., Kobayashi, Y. Y., Ishikawa, M., Sakai, K. 1996. Comparison of pressure resistances of spores of six Bacillus strains with their heat resistances. Applied and Environmental Microbiology. 62 (10). 3897 – 3900.

Pelcová, O. 2007. Konzervování má svá pravidla. Gastro Plus. 10 (1). 43.

Sahin, O., Yong, E. H., Driks, A., Mahadevan, L. 2012. Physical basis for the adaptive flexibility of *Bacillus* spore coats. J. R. Soc. Interface. 9 (76). 3156 – 3160.

Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Kozoil-Dube, K., Setlow, P. 2006. Role of Dipicolinic Acid in Resistance and Stability of Spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA - Protective α/β - Type Small Acid-Soluble Proteins. Journal of Bacteriology. 188 (11). 3740 – 3747.

Setlow, P. 2014. Germination of Spores of *Bacillus* Species: What We Know and Do Not Know. Journal of Bacteriology. 196 (7). 1297 – 1305.

Schwartz, O. 2010. Konzervování. Ikar. Praha 191 s. ISBN 978-80-249-1492-3.

Stumbo, C. R. 1965. Thermobacteriology in Food Processing. Academic Press, New York and London.

Štěpničková, O. 2010. Oslavme 200. narozeniny konzervy. Výživa a potraviny. 65 (3). 63.

Timson, W. J., Short, A. J. 1965. Resistance of microorganisms to hydrostatic pressure. Biotechnology and Bioengineering. 7 (1). 139 – 159.

Turnbull, P., C., B. 1996. Medical Microbiology. 4th edition. Chapter 15 Bacillus. Galveston. Texas. ISBN-10: 0-9631172-1-1.

Voldřich, M. 2002a. Metody konzervace potravin. Část 2. Přehled potravinářských výrobků podle způsobu konzervace. Kvalita potravin. 2 (1). 22 - 25.

Voldřich, M. 2002b. Metody konzervace potravin. Část 2. Termoinaktivace – usmrcování mikroorganismů záhřevem. Kvalita potravin. 2 (2). 16 - 18.

Voldřich, M. 2003a. Metody konzervace potravin. Část 6. Konzervace zářením. Kvalita potravin. 3 (1). 13 – 17.

Voldřich, M. 2003b. Metody konzervace potravin. Část 7. Konzervace zářením (II.). Kvalita potravin. 3 (2). 10 – 11.

Voldřich, M. 2003c. Metody konzervace potravin. Část 9. Metody usmrcování mikroorganismů (abiosy) (II.) – chemosterilace. Kvalita potravin. 3 (4). 10 – 11.

Voldřich, M. 2004a. Metody konzervace potravin. Část 10. Konzervace potravin anabiosou. Kvalita potravin. 4 (2). 13 – 17.

Voldřich, M. 2004b. Metody konzervace potravin. Část 11. Konzervace potravin anabiosou (II.). Kvalita potravin. 4 (3). 12 – 17.

Voldřich, M. 2004c. Metody konzervace potravin. Část 12. Chemoanabióza – konzervace chemickými látkami (I.). Kvalita potravin. 4 (4). 15 – 17.

Voldřich, M. 2005. Metody konzervace potravin. Část 15. Konzervace biologickou úpravou potravin – cenoanabióza. Kvalita potravin. 5 (4). 10 – 14.

Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. - H., Whitman, W. B. 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Springer. New York. 1450 p. ISBN: 978 – 0 – 387 – 95041 – 9.

Zeigler, D., R. 2001. Bacillus Genetic Stock Center Catalog of Strains. Seventh Edition. Volume 3: The Genus Geobacillus. Ohio.

Zheng, L. B., Donovan, W., P., Fitz-James, P. C., Losick, R. 1988. Gene encoding a morphogenic protein required in the assembly of the outer coat of the Bacillus subtilis endospore. Genes & Development. 2. 1047 – 1054.

Žižková, J., Caisová, L. 2011. Když se řekne konzerva…. Svět balení. 4. 47, 49.

8. Seznam použitých zkratek

a_w - vodní aktivita (angl. water aktivity)

B. – *Bacillus*

Cl. – *Clostridium*

DPA - kyselina dipikolinová (pyridin - 2, 6 - dikarboxylové kyseliny)

G. – *Geobacillus*

KTJ – kolonie tvořící jednotka

T. – *Thermoanaerobacterium*

9. Přílohy

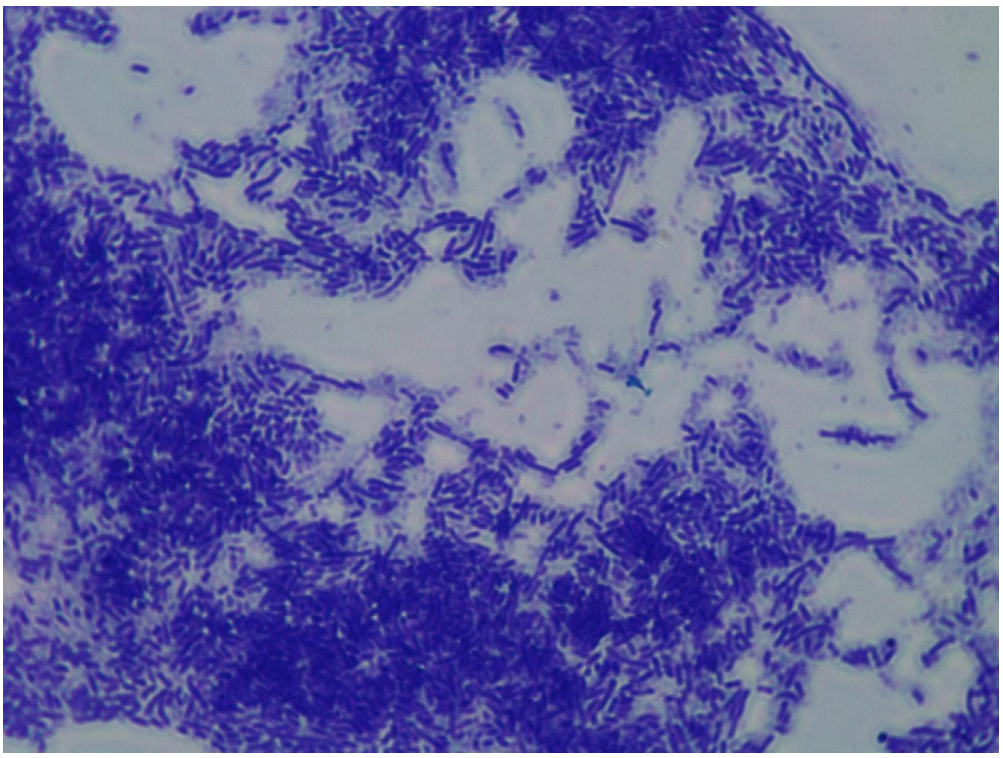
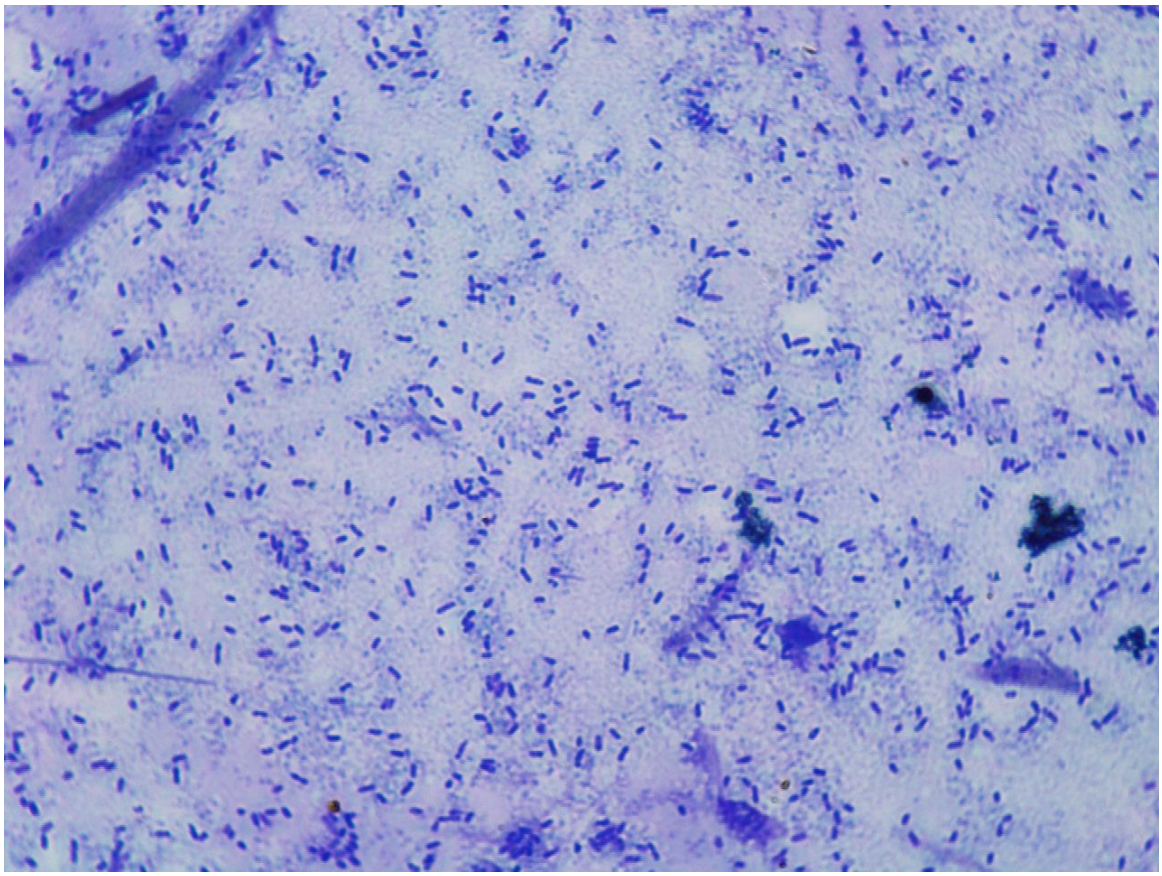
Masová konzerva: Ďáblík – čertovská pomazánka

Ananasová konzerva

Broskvová konzerva

Bekterie v masové konzervě (Ďáblík – čertovská pomazánka)

Při inkubaci v aerobním prostředí



Při inkubaci v anaerobním prostředí