

Možnosti ovlivnění germinace a postgerminačních syntetických aktivit bakteriálních spor a jejich praktický význam

V. VINTER
Mikrobiologický ústav ČSAV

Schopnost mikroorganismů rychle se množit za vhodných podmínek je důležitý biologický jev, který svým významem zasahuje do mnoha oborů lidské činnosti. Praktický význam prudkého množení mikrobů je nepochybný. Medicina i průmysl vděčí mikroorganismům za nesčetné množství produktů cenných pro lidstvo. Rozvinutí kultivačních technik, zejména metody kontinuálního přidávání živin, umožňuje v mnoha směrech maximálně využít reprodukčních schopností mikrobů. Výhod rychlého množení mikroorganismů lze použít v praxi od produkce krmné biomasy k velkovýrobě mikrobních proteinů pro účely výživy lidí až po tvorbu důležitých mikrobních metabolitů, na př. antibiotik. Na druhé straně vysoká rychlost metabolických procesů i schopnost rychlé reprodukce mikroorganismů jsou v některých průmyslových odvětvích jevy nežádoucími. Prevence množení mikrobů, nebo jejich částečná až úplná inaktivace, je závažnou finanční i technickou zátěží průmyslu, hlavně potravinářského. Vhodnými inaktivačními postupy lze nejsnáze atakovat právě rychle se množící mikrobiální buněčné formy. Tyto senzitivní aktivní buněčné typy však nejsou bohužel jedinou složkou v heterogenní mikrobiální populaci. Řada mikroorganismů je schopna vytvářet klidové až kryptobiotické buněčné formy s nižším, nepatrným, nebo zcela nedokazatelným metabolismem. U mikroorganismů je známa řada buněčných diferenciací tohoto typu. Je to na příklad tvorba spor u bacilů, klostridií a sporosarciny, cyst u azotobaktera, mikrocyt u myxobakterií, tvorba sporonosných útvarů a spor u aktinomycet, plísni atd.

V této práci chci zúžit pozornost jen na jednu z nejextrémnějších forem živé hmoty vůbec, na bakteriální spory. Z celkové problematiky spor bakterií se omezím podrobněji jen na otázky aktivace a inaktivace spor, a dále klíčením a možnostmi postgerminačního vývoje u spor různým způsobem ovlivněných.

Tvorba bakteriálních spor je specializovanou odpovědí buňky na populační explozi, tak běžnou v mikrobiálním světě. V přirozených podmínkách vede prudké namnožení buněk k rychlé spotřebě živin. Právě periodické vyčerpávání živných substrátů zakotvilo ve fylogenetickém vývoji některých mikrobů složitý a důležitý adaptační mechanismus: vytvoření

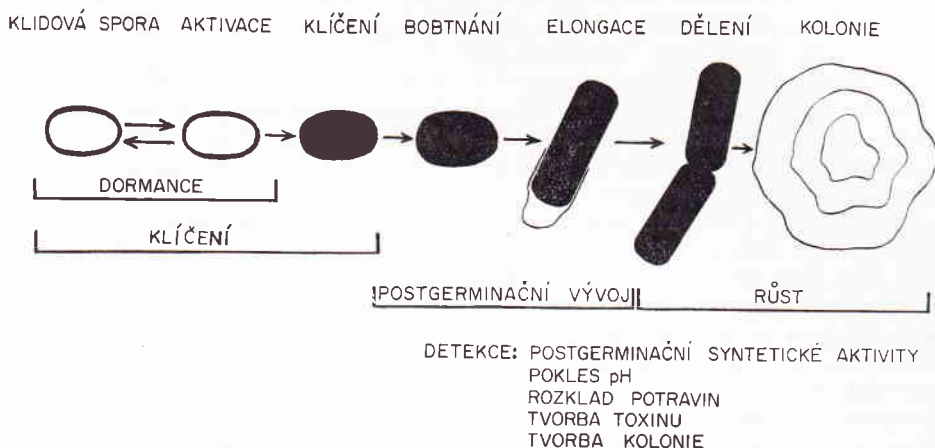
spory. Při limitaci živin a zpomalení růstu se regulační systém sporogenní bakteriální buňky přepojuje na nový, konečný systém buněčného rozdělení. Místo vytvoření další stejnocenné kopie aktivní rostoucí vegetativní buňky se zapíná mechanismus specializovaného nitrobuněčného rozdělení: mateřská buňka (sporangium) se intracellulárně rozdělí tak, že z této dvojice buněk je jedna, spora, vybavena důmyslným systémem vlastností kvalitativně odlišných od mateřské buňky. Zbývá část sporangia, původní mateřská buňka, zaniká. Tímto procesem (sporegenesou, sporulací) tak vzniká z jedné vegetativní buňky po posledním rozdělení jedna klidová buňka, spora. Je schopna nejen přežívat v dormantním stavu desítky až sta let, ale též v přítomnosti několika vteřin až minut vyklíčit a dát později vznik novým milionům buněk vegetativním množením.

Spory bakterií představují extrémní případ latentního života a lze u nich mluvit o dormantním stavu a o kryptobiotické nebo dokonce „abiotické“ existenci. Zde již můžeme tušit první záludnosti spor: jsou potenciálním nebezpečím, faktorem možné biologické korose. Za vhodných nutričních a teplotních podmínek mohou proces klíčení, postgerminančního vývoje spor, množení buněk, i z toho plynoucí nežádoucí změny v potravinářském materiálu, probíhat velmi rychle. Na druhé straně, jak bude uvedeno dále, některé zvláštnosti kryptobiotického stavu bakterií mohou znemožnit spolehlivou kvantitativní detekci sporové kontaminace. Vnitřní strukturální a biochemická organizace spory však neza bezpečuje pouze udržení kryptobiotického stavu buňky. S uchováním dormance až kryptobiosy je nerozlučně spjata vysoká resistance spor vůči různým škodlivým zásahům, fyzikálním i chemickým. Jednotlivé mechanismy, např. nepropustnost sporových obalů, nízký obsah vody, konformační změny enzymů a jiných makromolekul a jejich vazba na buněčné struktury, dále vysoký obsah vápníku a pyridin-2, 6-dikarboxylové (dipikolinové) kyseliny (DPA) atd., přispívají k resistenci spor vůči faktorům, které se v přírodě prakticky nevyskytují: vysokým dávkám záření, velmi vysokým i nízkým teplotám, vyšším koncentracím toxických látek atd. Pro bezpečnou inaktivaci resistantních spor je nutno používat poměrně drastických postupů, ať již jde o sterilizaci teplem, ozářením, nebo kombinací penetrantního ozáření a následného tepelného šoku.

Metody spolehlivé inaktivace resistantních spor, sterilizační metody, jsou dobře známy a není nutno se o nich zmiňovat. Nevýhodou těchto drastických postupů je to, že nejsou vždy použitelné. Nehodí se pro každý ochraňovaný potravinářský materiál. Mohou výrazně snížit nutriční hodnotu a, v případě sterilizace ozářením, silně narušit chuťové i jiné důležité vlastnosti ochraňovaného materiálu. Cílem méně drastických inaktivčních postupů je jednak zabít co nejvyššího počtu mikrobů, kontaminujících potravinářský materiál, jednak prevence množení a biochemických aktivit přeživší frakce kontaminantů. Hlavním prostředkem ochrany prvního typu mohou být subletální dávky vysoké teploty nebo ozáření. Prostředkem ochrany druhého typu je např. inkorporace inhibičních přídavných látek do materiálu, uchovávání při nízkých teplotách, případně kombinace obou postupů. V další části tohoto článku

je vybráno několik příkladů, jak jednotlivé postupy, substerilizační zpracování materiálu a zábrana množení mikrobů, ovlivňují klíčení a postgerminační vývoj spor aerobních a anaerobních bakterií.

K tomu je třeba nejprve definovat některé pojmy, které budou v následující části použity. *Aktivace spor* je částečné narušení kryptobiotického stavu, zvýšení dispozice spor ke klíčení. Není morfologicky patrná



Obr. 1. — Stadia vývoje populace sporulujících bakterií od klidové spory k vytvoření kolonie. V obrázku jsou uvedeny příklady detegovatelných procesů, které mohou probíhat při proliferaci buněk i v postgerminačním období vývoje spory.

a není prokazatelná ani biochemicky. Je však ji možno testovat měřením rychlosti následného klíčení, zvýšenou afinitou spory vůči specifickým germinačním stimulatorům atd. Spory lze aktivovat tepelným šokem, subletální iradiací, nízkým pH a jinými zásahy. Aktivace je obvykle reversibilní.

Proces *klíčení* (*germinace*) bakteriálních spor zahrnuje:

1. interakci nízkomolekulárních živných substrátů nebo specifických stimulatorů klíčení (L-alanin, glukosa, adenosin, inosin a pod.) s receptory sporového povrchu,
2. zrušení permeabilní bariéry,
3. průnik vody do spory,
4. aktivaci lytických systémů, které rychle depolymerizují část periferních vrstev spory, a
5. uvolnění mukopeptidových fragmentů kortikální vrstvy a dále vápníku a dipikolinové kyseliny do prostředí. Během klíčení nelze ještě prokázat syntézu makromolekul, respirace se však zvyšuje. Klíčení spor lze detegovat snadno: spory ztrácejí thermoresistenci, radioresistenci a přecházejí ze světlolomné formy (pozorováno ve fázovém kontrastu) na formu ztmavlou. Při studiu klíčení spor in vitro je výhodným a spolehlivým ukazatelem klíčení pokles (více než 60 %) optické density.

Klíčení je bezprostředně následováno *postgerminačním vývojem*, t. j. syntézou bílkovin, nukleových kyselin a buněčné stěny. Spora bobtná,

po roztržení plášťových struktur se elonguje a za vhodných podmínek se dělí. Velmi jednoduché schema vývoje spory až k makropopulaci je znázorněno na obr. 1. Na tomto místě je vhodné zdůraznit, že právě různé substerilizační zásahy někdy sice umožní aktivaci a vyklíčení spory, ale vývoj nedojde dál než k postgerminančním syntézám, případně k rozdělení buňky. Pokud je příslušný inaktivační postup testován jen tvorbou makrokolonií, mohou se takto narušené spory jevit jako „mrtvé“. Takto mohou vývoj buněk ovlivnit i další zásahy. Uvedu příklad z naší práce. Jestliže po vyklíčení spor *Bacillus cereus* do germinačního syntetického media (které neumožní další vývoj) buňky nějakou dobu hladově, po obnovení hladiny živin dochází za určitých podmínek pouze k jednomu nebo několika rozdělením buňky. Tvorbu těchto mikrokolonií na povrchu agaru je možno zjistit pouze při velkém zvětšení, makroskopicky jsou nedetegovatelné.

Tepelný šok (obvykle teplota 65 °C až 100 °C, trvání několik desítek minut) zabíjí vegetativní sensitivní formy sporulantů spolehlivě. U spor může vést k 1. zabití méně resistentní frakce, 2. aktivaci, 3. ke zvýšení dormance, 4. ke kvantitativním změnám populace, jde-li o heterogenní směs spor, a 5. ke změně v germinančních požadavcích spory. Kromě inaktivace je nejdůležitějším výsledkem tepelného šoku aktivace spor. Již proto, že jakýkoliv posun fyziologického stavu spor směrem ke germinativním procesům a k narušení kryptobiosy zvyšuje naději na narušení jak termo- tak radio-protektčních mechanismů spor. Nejideálnějším případem přirozené senzitivizace spor je samo klíčení. U některých kmenů *Bacillus megaterium* dostačuje k aktivaci spor teplota 60 °C po dobu několika minut, u spor termofilního *Bacillus stearothermophilus* je pro aktivaci optimální teplota 110 °C (1). Schopnost spor k tepelné aktivaci je ovlivněna složením spor, na příklad obsahem kalciumdipikolátu (2), do značné míry závisí i na okolním mediu, na příklad na pH (3, 4), složení media (1, 5, 6, 7) atd. Též stáří spor ovlivňuje aktivovatelnost a germinabilitu. Čím jsou spory starší, tím lépe se aktivují a klíčí (8).

Nejpřesnějším testem na aktivaci spor je měření rychlosti klíčení. Na mediích s různými specifickými stimulatory klíčení lze odlišit i jemnější účinky termálního šoku. Spory *Bacillus megaterium* po tepelném šoku klíčí podstatně rychleji v glukosovém mediu (= aktivace), v přítomnosti jiného specifického germinančního stimulatoru, L-alaninu, bylo klíčení zpomalené (= suprese klíčení) (9). Spory *Bacillus stearothermophilus* jsou optimálně aktivovány teplotou 115 °C. Po tepelném šoku při pouhých 80–100 °C se neaktivují, ale naopak reversibilně zvyšují dormanci (10).

Kromě metody přímého zjištění germinace spor po tepelném šoku je nepoužívanějším testem počet vytvářených kolonií. Tento způsob počítání životaschopných spor je pochopitelně přesný jen tehdy, uskutečnil-li se všechny stupně vývoje spor, znázorněné v obr. 1. Termální šok ale může narušit některou fázi postgerminančního vývoje, aniž by poškodil germinanční mechanismus spory (11). V tomto případě mohou probíhat významné postgerminanční syntetické aktivity u buněk, které nelze (testováno jako schopnost vytvořit kolonii) prokázat jako živé. K podobnému jevu dochází i při *subletálním ozáření spor* (12, 13, 14, 15). Subste-

rilizační ozáření (penetrantní x-paprsky nebo gama-záření) má, podobně jako termální šok, kromě inaktivačního účinku na spory, též značný aktivační vliv [12, 16, 17]. Aktivace spor teplem nebo ozářením má bezesporu veliký význam. Mechanismus aktivace těmito fyzikálními, značně nespecifickými faktory, není zcela objasněn. Je zřejmě narušena permeabilitní bariéra spor [18, 19, 20], ve sporovém povrchu jsou ovlivněny receptory pro specifické germinační stimulatory [21] a dochází i k částečnému uvolnění kalciumdipikolinátu a některých aminokyselin [22, 23]. V práci se spory *Bacillus cereus* NCIB 8122 jsme prokázali, že při klíčení spor v mediu, které podporuje pouze klíčení, ale neumožní postgerminační vývoj, aplikace tepelného šoku zvyšuje penetraci radioaktivních aminokyselin do spory i jejich zabudování do bílkovin vyklíčené spory. V tomto případě je syntéza bílkovin determinována též množstvím intracelulárních volných aminokyselin. Je zřejmé, že kromě zvýšení permeability spory vede tepelný šok i k uvolnění a k zvýšené dostupnosti nitrobuněčných volných aminokyselin pro syntézu bílkovin.

O tom, že porušení nebo labilizace periferních sporových vrstev predisponuje spory ke klíčení, je i řada dalších údajů. Vnější vrstvu spory tvoří cystinem bohatý bílkovinný plášť keratinového typu [24, 25]. Jeho narušení redukčními látkami [26, 27, 3], nebo ozářením [16] umožní permeabilitu i pro makromolekuly, a jako aktivační faktor zcela nahradí termální šok [3]. Jiným typem labilizace periferních vrstev spory je nízké pH [28, 29], nebo aktivace spor kalciumdipikolinátem [22, 30]. V těchto případech je aktivace v podstatě vyvolána změnou koncentrace Ca^{++} v periferii spor. Povrch spor má vlastnosti katexu a odpojení vápníku ze sporové periferie značně ovlivňuje germinabilitu spor [31, 32, 33] a snižuje i termoresistenci spor [34, 28]. Kromě reversibilní změny v terciární struktuře povrchových sporových makromolekul spočívají tedy aktivační zásahy i v ovlivnění stability typických sporových mikrokomponent.

Z těchto údajů je zřejmé, že prostředků k předgerminačnímu reversibilnímu narušení kryptobiotického stavu je dost. Je významné i to, jak mnoho specifických i nespecifických faktorů může indukovat ve sporách kompletní irreversibilní změny germinační. Spory bakterií mohou vyklíčit v pouhé přítomnosti metabolizovatelných specifických germinačních stimulatorů, L-alaninu, adenosinu, glukosy, inosinu atd. [35, 36], i nemetabolizovatelných induktorů: iontů [37, 38, 35], povrchově účinných látek [39], chelatačních látek [40, 41, 42], nebo některých enzymatických systémů [43, 44]. Germinační změny mohou být vyvolány i fyzikálními faktory, na příklad mechanickým poškozením spor [45–49]. Do terminologie studia spor se tak dostaly nové rozlišující pojmy, jako „fysiologické“, „chemické“ a „mechanické“ klíčení [35–39]. Tuto multiplacitu mechanismů spouštějících klíčení lze vysvětlit více nebo méně specifickým působením výše uvedených faktorů na strukturu periferních vrstev spory, na jejich integritu a permeabilitu a na schopnost výměny některých intrasporálních komponent za látky exogenní. Proces klíčení tedy může v přirozených prostředích snadno probíhat i tam, kde nejsou podmínky pro germinační vývoj. Není narušen ani u spor, které byly „zabity“ ozářením [11, 12, 14]. Spory *Clostridium botulinum*, ozářené

dávku až $8,3 \times 10^5$ rad („zabito“ více než 99,99 % buněk), klíčí stejnou rychlostí a do stejného stupně jako neozářené spory [14].

Na obr. 2 je znázorněn průběh klíčení spor *Bacillus cereus* NCIB 8122 inaktivovaných z více než 90 % gama-zářením (dávka 300 Krad), a to v komplexním baktepeptonovém tekutém mediu. Inkubace byla provedena při 5°C a 30°C. Klíčení bylo testováno změnou optické density kultury při 700 nm. Pokles hodnot optické density při klíčení přesně odpovídá jak procentu spor ztmavších ve fázovém kontrastu, tak procentu buněk barvitelných metylénovou modří [24]. Údaje optické density v tomto pokuse ukazují, že klíčení při 5°C bylo silně zpomalené, při 30°C však probíhá u ozářených spor stejně rychle a do stejného stupně jako u spor neozářených. Pokus provedla v rámci naší spolupráce s Výzkumným ústavem potravinářským SPA v Bratislavě Z. Lešková, prom. chem.

Ke klíčení spor dochází i v přítomnosti inhibitorů syntéz makromolekul, chloramfenikolu, aktinomycinu D, penicilinu, cykloserinu atd. [50, 51]. Tyto inhibitory narušují buňku až ve stadiu postgerminačních syntéz [52–54].

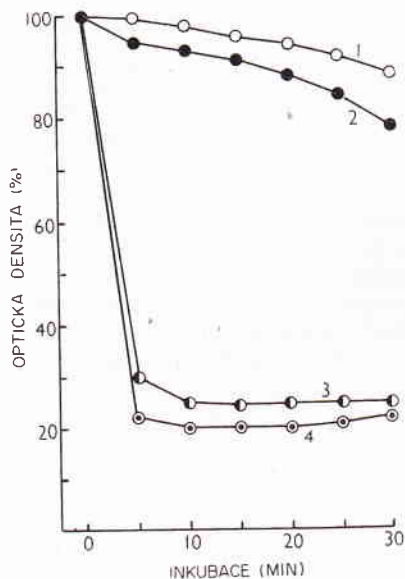
Výše uvedený přehled možností aktivace a germinace spor by mohl vést k mylnému závěru, že konverse kryptobiotických forem ve formy vyklíčené (= termo- a radio-senzitivní), a též schopné dalšího vývoje až do tvorby makrokolonie, je vždy snadná. Ve skutečnosti se často setkáváme s nežádoucím jevem, kdy spory nelze při mikrobiologických kontrolách materiálů spolehlivě detegovat. Může jít při tom jak o vysoký stupeň dormance spor, tak o porušení jejich normálního postgerminačního vývoje. U mnoha species a kmenů vyklíčí bez tepelné aktivace a vytvoří kolonii jen malá frakce spor [55, 56, 57]. Rozdíly mezi celkovým počtem spor, zjištěným přímou mikroskopií, a počtem spor schopných vytvořit makrokolonii bývají značné. Na příklad u *Bacillus stearothermophilus* vytvoří kolonii bez aktivace jen 1,2 až 5 % (podle zředovacího media) spor [56]. Při optimální tepelné aktivaci vyklíčí asi 50 % tohoto druhu [57]. Na obr. 3 jsou uvedeny příklady aktivace spor, testované tvorbou kolonie. V obou případech probíhá vedle aktivace souběžně i inaktivace části spor, což touto metodou nelze zjistit.

Při rutinních testech na dormanci a životaschopnost spor nelze vždy rozlišit, zda vývoj buněk, které nevytvořily kolonii, byl blokován již v kryptobiotickém stadiu, po vyklíčení spory, nebo v postgerminační fázi. Již proto, že aktivační tepelné šoky, blízké svým účinkem inaktivaci, mění v mnohém směru nároky ovlivněných spor [58–63]. Aktivační i inaktivační tepelný šok ponechává nedotčeny superdormantní spory [64, 65]. Jde o spory s opožděným klíčením, které často ujdou pozornosti při rutinních mikrobiologických kontrolách.

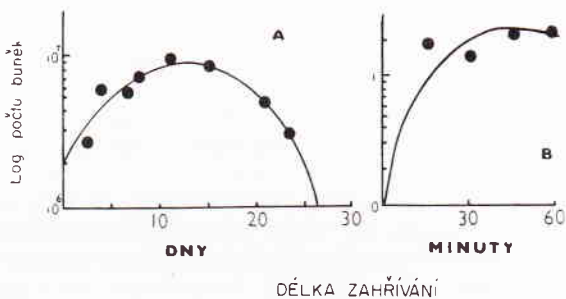
Na druhé straně je neméně závažným problémem jev, kdy spory se sice nemohou vyvíjet až ke stadiu dělení, uskutečňují však některé etapy postgerminančního vývoje. Inaktivační zásah je tedy nutno hodnotit nejen podle rutinní detekce životaschopnosti (= tvorba kolonie), ale též s přihlédnutím k možnosti postgerminačního vývoje, k residuálním enzymatickým a syntetickým aktivitám a jejich kvalitě. Značné syntetické aktivity lze zjistit už po vyklíčení intaktních spor, kdy další normální

vývoj byl blokován nutriční deficiencí. Při limitaci živin v postgerminačním období se mohou na příklad spory *Bacillus cereus* a *Bacillus megaterium* diferencovat bez rozdělení buňky v nové sporangium a v krátké době vytvořit resistantní sporu (= tzv. mikrocyklová sporogenese) [66, 67]. Blokáda vývoje spor bezprostředně po vyklíčení vede za určitých podmínek k přestavbě buňky v silnostěnnou, světlolomnou, impermeabilní buněčnou formu podobnou cystě [68, 69].

Substerilizační inaktivace spor *Bacillus cereus* gama-zářením (dávka 0,4 Mrad) „zabije“ (podle počtu kolonií) asi 95 % spor. Při subkultivaci



Obr. 2. — Klíčení ozářených (300 Krad, 90 % inaktivace) a neožářených spor *Bacillus cereus* NCIB 8122 na baktopenonovém tekutém mediu při 5°C a 30°C. 1 — ozářené spory, 5°C; 2 — neožářené spory, 5°C; 3 — neožářené spory, 30°C; 4 — ozářené spory, 30°C.



Obr. 3. — Příklad aktivace spor tepelným šokem. A — Aktivace spor *Bacillus steaerothermophilus* zahříváných při teplotě 73,5°C v destilované vodě. (Při zahřívání ve fosfátovém pufru o pH 7 dosáhla aktivace maxima už po 100 hodinách). (56). B — Aktivace spor *Clostridium welchii* NCTC 8798 při 85°C v destilované vodě. Detekce počtu kolonií provedena na komplexním mediu s thioglykolátem sodným (17).

v živném tekutém mediu o vhodném pH (7.0-8.0) dochází nejen k vyklíčení, ale i k postgerminačnímu vývoji až k rozdělení buňky. Po 3 hodinách je v kultuře asi 10 % tmavých a bobtnajících spor, 10 % buněk v dalších stadiích postgerminace a asi 70 % nerozdělených vegetativních buněk. Zbytek tvoří nevyklíčené a dělící se buňky. Vývoj spor byl tedy ozářením zastaven až v období, kdy v buňce dochází k replikaci deoxyribonukleové kyseliny [70]. Subletální ozáření spor *Bacillus megaterium* (0,1 Mrad) opozdí jen začátek postgerminačního vývoje [12]. Ozařování spor *Bacillus subtilis* deuterony a alfa-částicemi s různou energií umožň-

nilo sledovat frekvenci tvorby atypických buněčných forem vzniklých po vyklíčení spor [71]. I když z aerobních sporulujících mikrobů mohou být též některé příčinou toxicity potravin, na příklad *Bacillus cereus* [72, 73], největší pozornost byla vždy věnována anaerobům, zvláště jejich nejobávanějším reprezentantům, jednotlivým typům *Clostridium botulinum*. Hlavním jejich nebezpečím v potravinářském průmyslu je produkce botulotoxinu při aktivním růstu. Pro zajímavost lze uvést, že smrtelná dávka čistého botulotoxinu pro člověka je odhadována na 1×10^{-8} g [74, 75], letální dávka pro myš je 1×10^{-10} g [76]. Volný toxin i toxin vázaný ve vegetativních buňkách je termolabilní [77, 78]. Toxin zabíjený ve sporách je termostabilní; začíná se inaktivovat při zahřívání na 90 °C po 120. minutě, při 80 °C až po 240. minutě [79]. Intrasporální toxin přežívá i dávku gama-ozáření, které spolehlivě zabíjí spory (až 5.0 Mrad) [80, 78]. Ionizujícím zářením se destruuje jen pozvolna [81]. Po sterilizačním ozáření masa v konzervách, záměrně kontaminovaného spory *Clostridium botulinum*, dochází ke zvyšování toxicity [80].

Vliv záření na permeabilitu spor byl již diskutován výše. Některé studie ukazují, že faktory zvyšující buněčnou permeabilitu zvyšují též titr botulotoxinu [82]. Termostabilní intrasporální toxin je polymér o molekulové váze 600 000. Dissociuje na podjednotky o molekulové váze 300 000, tedy fragmenty, které podle našich dosavadních znalostí již mohou sporovým pláštěm procházet [79, 83]. Botulotoxin se však může vlivem pH nebo proteáz rozpadnout až na fragmenty o molekulové váze 12 000 — 16 000, které si též zachovávají toxicitu [84]. Jedním z problémů spor *Clostridium botulinum* je tedy možnost labilizace a exkrece ze spory toxických fragmentů botulotoxinu, původně termostabilního a vysokomolekulárního. Druhým problémem je otázka, zda mohou spory „zabité“ ozářením (= testováno počtem kolonií) syntetizovat po vyklíčení nové makromolekuly, mezi nimi toxin. Enzymy spor *Clostridium botulinum* nejsou ovlivněny ani vyššími dávkami záření (1,25 Mrad). Ozáření spory metabolizují po vyklíčení řadu jednoduchých substrátů. Citlivost některých z těchto biochemických reakcí vůči chloramfenikolu nasvědčuje, že i po této dávce ozáření jsou buňky schopny syntetizovat nové proteiny [14]. Podobný případ omezených metabolických aktivit, klíčení a vývoje abortivní buňky vegetativní ze spor *Clostridium botulinum* inaktivovaných radiací popsali i jiní autoři [85]. Fernandez se spoluautory [86] prokázal zvyšující se titr toxinu v mase z konserv, které bylo inokulováno spory *Clostridium botulinum* a ozářeno dávkou 4 Mrad. Titr toxinu se během následné kultivace při 30 °C zvýšil do 2—4 měsíců 3—5-krát. V tomto případě mohlo být zvýšení hladiny toxinu způsobeno syntésou de novo vyklíčenými spory; není však vyloučena možnost, že toxin byl uvolněn do media lysou spor, aktivací nebo fragmentací preexistujících sporových molekul toxinu. Naštěstí není nebezpečí vlastního sporového toxinu, díky nepříteli velké primární kontaminaci potravinářských surovin a produktů spory, závažné. Zůstává však nebezpečí tam, kde substerilizačními zásahy je narušena jen část postgerminálního vývoje a může dojít k výrazným metabolickým aktivitám, včetně syntézy toxinu de novo.

Jednou z běžně užívaných možností, jak omezit syntetické aktivity vyklíčených spor (a ostatně všech mikroorganismů), je uchovávání potravinářských surovin a produktů v chladu. U mesofilních sporulantů je růst silně omezen nebo prakticky zastaven již při teplotě $+ 5^{\circ}\text{C}$. Jak mezi zástupci rodu *Bacillus* tak *Clostridium* je však mnoho fakultativních i obligátních psychofilů. Jejich spory jsou schopny vyklíčit i za poměrně nízké teploty. Při $+ 5^{\circ}\text{C}$ vyklíčí během několika dnů spory některých kmenů *Clostridium botulinum* i řady dalších klostridií (87, 88), při $+ 4^{\circ}\text{C}$ byla zjištěna po vyklíčení spor do 4 týdnů i tvorba toxinu (89). Při stejné teplotě jsou schopny klíčit spory některých kmenů *Bacillus subtilis* (90). V rozmezí teplot 0°C až $+ 4^{\circ}\text{C}$ bylo prokázáno klíčení, růst, po případě i tvorba toxinu u řady dalších klostridií (91, 92, 93, 94). U některých aerobních a anaerobních sporulantů může však dojít k vyklíčení spor i při nižších teplotách, na příklad při $- 1^{\circ}\text{C}$ (95), $- 2^{\circ}\text{C}$ (96), i za teploty $- 6^{\circ}\text{C}$ (97). Pokud v některých z těchto případech byl zjištěn růst, trvalo zdvojnásobení buněk od 3 do 7 dnů. Při dlouhodobějším skladování potravinářských produktů v chladu je však nutno brát v úvahu i tento, i když pomalý, růst a vývoj populace. Uchovávání surovin i produktů při nízkých teplotách je nicméně hlavním a značně účinným zásahem, který podstatně omezí metabolické aktivity a růst většiny mikroorganismů.

V tomto článku jsem uvedl některé příklady, jak mohou být různými jednoduchými zásahy ovlivněny vlastnosti spor, zvláště jejich germinabilita a další postgerminanční vývoj. Uvedl jsem hlavně méně drastické faktory, které nezruší zcela možnost přežití nebo schopnost metabolických aktivit. Vlastností spor zásadní důležitosti je enormně vysoká resistance. Hlavním cílem základního i aplikovaného výzkumu spor zůstává detailní analýsa podstaty resistance spor a možností jednorázově nebo kombinovanými inaktivačními postupy porušit dormantní spory natolik, aby nebyly zdrojem nejen nové populace, ale ani nežádoucích metabolických aktivit.

S o u h r n

V článku je podána stručná charakteristika vývoje kultury sporulujících bakterií od germinačních změn spory i bezprostředních postgerminačních aktivit až k vytvoření prolifерující populace a po vyčerpání živin, ke sporogenese. Jsou diskutovány některé vlastnosti spor, hlavně stav kryptobiosy a vysoká odolnost spor vůči inaktivačním faktorům. Z možností, jak ovlivnit germinabilitu a postgerminanční vývoj spor, je uvedeno několik příkladů: 1. Aktivace spor a ovlivnění jejich klíčení termálním šokem, subletální iradiací a jinými faktory. 2. Změny periferních vrstev spory a jejich vlastností indukované aktivačními zásahy. 3. Závislost detekce spor tvorbou kolonie na faktorech aktivujících spory. 4. Realizace nežádoucích postgerminačních aktivit za podmínek, kdy a) spory byly ochrnuty předchozím subletálním zásahem, a b) kdy podmínky, např. nízká teplota nebo limitace živin, inhibovaly syntetickou činnost. 5. Možnost tvorby toxinu de novo naklíčenými sporami *Clostridium botulinum*, případně exkrece preexistujícího toxinu ze spor po inaktivač-

ních a aktivačních zásazích. Uvedené jevy jsou diskutovány jak s hlediska základního výzkumu, tak s přihlédnutím k potřebám praxe.

Literatura

1. Curran H. R. a Evans F. R., J. Bacteriol. 49: 335, 1945.
2. Keynan A., Murrell W. G. a Halvorson H. O., Nature 192: 1211, 1961.
3. Keynan A., Evenchik Z., Halvorson H. O. a Hastings W. J., Bacteriol. 88: 313, 1964.
4. Gibbs P. A., J. gen. Microbiol. 46: 285, 1966.
5. Powell J. F. a Hunter J. R., J. gen. Microbiol. 13: 59, 1955.
6. Levinson H. S. a Hyatt M. T., J. Bacteriol. 70: 368, 1955.
7. Splittstoesser D. F. a Steinkraus K. H., J. Bacteriol. 84: 278, 1962.
8. Keynan A. a Evenchik Z., V knize „The Bacterial Spore“ (ed. G. W. Gould a A. Hurst), Academic Press. Str. 359, 1969.
9. Holmes P. K., Nags E. H. a Levinson H. S., J. Bacteriol. 90: 828, 1965.
10. Finley N. a Fields M. L., Appl. Microbiol. 10: 231, 1962.
11. Hermier J., Compt. rend. Acad. Sci. 249: 195, 1959.
12. Levinson H. S. a Hyatt M. T., J. Bacteriol. 80: 441, 1960.
13. Williams-Walls N. J., Appl. Microbiol. 17: 128, 1969.
14. Costilow R. N., J. Bacteriol. 84: 1268, 1962.
15. Kempe L. L. a Graikoski J. T., Bacteriol. Proc., str. 57, 1961.
16. Gould G. W. a Ordal Z. J., J. gen. Microbiol. 50: 77, 1968.
17. Roberts T. A., J. appl. Bact. 31: 133, 1968.
18. Levinson H. S. a Hyatt M. T., J. Bacteriol. 72: 176, 1956.
19. Church B. D. a Halvorson H. O., J. Bacteriol. 73: 470, 1957.
20. Falcone G., Salvatore G. a Covelli I., Biochem. Biophys. Acta 36: 390, 1959.
21. O'Connor R. J. a Halvorson H. O., J. Bacteriol. 82: 706, 1961.
22. Lee W. H. a Ordal Z. J., J. Bacteriol. 85: 207, 1963.
23. Nelson D. L., Spudich J. A., Bensen P. P. M., Bertsch L. L. a Kornberg A., V knize „Spores IV“ (ed. L. L. Campbell), American Society for Microbiology, str. 59, 1969.
24. Vinter V., Fol. microbiol. 5: 217, 1960.
25. Vinter V., V knize „Spores II“ (ed. H. D. Halvorson), Burgess Publishing Co., USA. Str. 127, 1961.
26. Gould G. W. a Hitchins A. D., J. gen. Microbiol. 33: 413, 1963.
27. Hitchins A. D., King W. L. a Gould G. W., J. appl. Bact. 29: 505, 1966.
28. Lewis J. C., Snell N. S. a Alderton G., V knize „Spores III“ (ed. L. L. Campbell a H. O. Halvorson), American Society for Microbiology, str. 47, 1965.
29. Issahary G., Evenchik Z. a Keynan A., J. Bacteriol. 101: 418, 1970.
30. Freese E. a Cashel M., V knize „Spores III“ (ed. L. L. Campbell a H. O. Halvorson), American Society for Microbiology. Str. 144, 1965.
31. Vinter V., Šťastná J. a Čáslavská J., V knize „Spores IV“ (ed. L. L. Campbell), American Society for Microbiology, str. 289, 1969.
32. Levinson H. S. a Hyatt M. T., V knize „Spores IV“ (ed. L. L. Campbell) American Society for Microbiology. Str. 262, 1969.
33. Šťastná J. a Vinter V., Fol. microbiol. 15: 103, 1970.
34. Vinter V., Publikace International Atomic Energy Agency, FAO, No. 653 207, PL-151/9. 1965.
35. Gould G. W., V knize „The Bacterial Spore“ (ed. Gould G. W. a A. Hurst), Academic Press. Str. 397, 1969.
36. Sussman A. S. a Halvorson, H. O., Spores: Their Dormancy and Germination“. Harper & Row, Publishers, New York and London, 1966.
37. Rode L. J. a Foster J. W., Arch. Mikrobiol. 43: 183, 1962.
38. Rode L. J. a Foster J. W., Nature 194: 1300, 1962.
39. Rode L. J. a Foster J. W., Arch. Mikrobiol. 36: 67, 1960.

40. Riemann H., V knize „Spores II“ (ed. H. O. Halvorson). Burgess Publishing Co., USA, str. 24, 1961.
41. Riemann H. a Ordal Z. J., Science 133: 1703, 1961.
42. Fleming H. P. a Ordal Z. J., J. Bacteriol. 88: 1529, 1964.
43. Sierra G., Can. J. Microbiol. 9: 643, 1963.
44. Sierra G., Can. J. Microbiol. 10: 929, 1964.
45. Rode L. J. a Foster J. W., J. Bacteriol. 79: 650, 1960.
46. Rode L. J. a Foster J. W., Proc. Natl. Acad. Sci. 46: 118, 1960.
47. Knaysi G. a Curran H. R., J. Bacteriol. 32: 691, 1961.
48. Sacks L. E., Percell P. B., Thomas R. S. a Bailey G. F., J. Bacteriol. 87: 952, 1964.
49. Clouston J. G. a Wills P. A., J. Bacteriol. 97: 684, 1969.
50. Vinter V., Proc. Internat. Symp. „Physiology, Ecology and Biochemistry of Germination“, Greifswald, NDR. Sekce Cal, 1963.
51. Vinter V., J. appl. Bact. 33: 50, 1970.
52. Vinter V., Fol. microbiol. 10: 230, 1965.
53. Vinter V., Fol. microbiol. 10: 288, 1965.
54. Vinter V., v knize „Spores III“ (ed. L. L. Campbell a H. O. Halvorson), American Society for Microbiology. Str. 25, 1965.
55. Murrell W. G., v knize „Microbial Reaction to Environment“ (ed. G. G. Meynell a H. Gooder). Cambridge University Press, str. 100, 1961.
56. Cook A. M. a Brown M. R. W., J. Pharm Pharmacol. 16: 725, 1964.
57. Cook A. M. a Brown M. R. W., J. a appl. Bact. 28: 361, 1965.
58. Schmidt C. F., v knize „Antiseptics, Disinfectants, Fungicides and Chemical and Physical Sterilization“ (ed. G. F. Reddish). 1955.
59. Schmidt C. F., Ann. Rev. Microbiol. 9: 387, 1955.
60. Olsen A. M. a Scott W. J., Austr. J. Sci. Res. 3: 129, 1950.
61. Futter B. V. a Richardson G., J. appl. Bact. 33: 321, 1970.
62. Futter B. V. a Richardson G., J. appl. Bact. 33: 331, 1970.
63. Ashton D. H., Appl. Microbiol. 21: 39, 1971.
64. Hersom A. C. a Hulland E. D., V knize „Canned Foods: An Introduction to their Microbiology“ (Baumgartner). London: J. A. Churchill, Ltd. 1963.
65. Gould G. W., Jones A. a Wrighton C., J. appl. Bact. 31: 357, 1968.
66. Vinter V. a Slepecky R. A., J. Bacteriol. 90: 803, 1965.
67. Vinter V. a Chaloupka J., Acta. Fac. Med. Univ. Brun. 29: 63, 1967.
68. Vinter V., Chaloupka J. a Štastná J., Souhrny „Internat. Conf. on Genetic and Biochemical Regulation of Dormancy“, Kyoto. Str. 31, 1970.
69. Vinter V., Chaloupka J., Štastná J. a Čáslavská J., V knize „Spores V“ (ed. L. L. Campbell). American Society for Microbiology. V tisku. 1972.
70. Farkas J., Kiss I. a Andrassy E., Symposium on Radiosterilization of Medical Products. Budapest. 1967.
71. Donnellan J. E. Jr. a Morowitz H. J., Radiation Res. 12: 67, 1960.
72. Nygren B., Acta pathol. microb. Scand., Suppl. No 160: 1, 1962.
73. Hauge S., J. appl. Bact. 18: 591, 1955.
74. Meyer K. F. a Eddie B., Z. Hyg. 133: 255, 1951.
75. Gordon R. A. a Murrell W. G., CSIRO Food Preserv. Q. 27: 6, 1967.
76. Lamanna C., Science 130: 763, 1959.
77. Cartwright T. E. a Laufer M. A., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98: 327, 1958.
78. Grecz N. a Lin C. A., Symposium „Botulism 1966“, Moskva 1966. Chapman & Hall Ltd., London. Str. 302, 1967.
79. Grecz N., Lin C. A., Tang T., So W. L. a Sekgal L. R., Japan. J. Microbiol. 11: 384, 1967.
80. Kempe L. L. a Graikoski J. T., Appl. Microbiol. 10: 31, 1962.
81. Wagenaar R. O. a Dack G. M., Food Res. 25: 279, 1960.
82. Bonventre P. F. a Kempe L. L., J. Bacteriol. 79: 24, 1960.
83. Gerhardt P. a Black S. H., V knize „Spores II“ (ed. H. O. Halvorson). Burgess Publishing Co., USA. Str. 218, 1961.
84. Boroff D. A., Dasgupta B. R. a Fleck P., Japan. J. Microbiol. 11: 371, 1967.

85. Rowley D. B., Feeherry F. a El-Bisi M. M., Bacteriol. Proc. str. 96, 1968.
86. Fernandez F., Tang T. a Grecz N., J. gen. Microbiol. 56: 15, 1969.
87. Roberts T. A. a Hobbs G., J. appl. Bact. 31: 75, 1968.
88. Mundt J. O., Mayhew C. J. a Stewart G., Fd Technol., Champaign, 8: 435, 1954.
89. Ajmal M., J. appl. Bact. 31: 120, 1968.
90. Williams D. J., Clegg L. F. L. a Wolf J., J. appl. Bact. 20: 167, 1957.
91. Schmidt C. F., Lechowich R. V. a Folinazzo J. F., J. Fd. Sci. 26: 626, 1961.
92. Eklund M. W., Wieler D. I. a Poysky F. T., J. Bacteriol. 93: 1461, 1967.
93. Abrahamsson K., Gullmar B. a Molin N., Can. J. Microbiol. 12: 385, 1966.
94. Sinclair N. A. a Stokes J. L., J. Bacteriol. 87: 562, 1964.
95. Knaysi G., J. Bacteriol. 87: 619, 1964.
96. Larkin J. M. a Stokes J. L., J. Bacteriol. 91: 1667, 1966.
97. Halvorson H. O., Wolf J. a Srinivasan V. R., Proc. Low Temp. Microbiol. Symp., Camden, New Jersey. Str. 27, 1961.

Возможности воздействия на герминацию и постгерминационные синтетические активности бактериальных спор и их практическое значение

Резюме

В статье дается короткая характеристика развития культуры спорилующих бактерий от герминационных изменений споры и прямых постгерминационных активностей вплоть до создания пролиферирующей популяции и до исчерпания питательских веществ, к спорогенезису. Отождествляются некоторые свойства спор, главным образом состояние криптобиоза и высокая устойчивость спор против инактивационным факторам. Из ряда возможностей влияния на герминабилитет и постгерминационное развитие спор, приведено несколько примеров:

1. Активизация спор и влияние на их прорастание термальным шоком, сублетальной иррадиацией и другими факторами.
2. Изменения периферийных слоев споры и их свойства, индуцированные из активационными вмешательствами.
3. Зависимость детекции спор созданием колонии на факторах, активизирующих споры.
4. Реализация нежелательных постгерминационных активностей в условиях когда
 - а) споры были парализованы предшествующим сублетальным вмешательством, и
 - б) когда условия, например низкая температура или недостаток питательных веществ, тормозили синтетическую деятельность.
5. Возможность создания токсина проросшими спорами *Clostridium botulinum* или экскретия существующего токсина из спор после инактивизирующих и активизирующих вмешательств. Приведенные явления разобраны как с точки зрения основного исследования, так и с точки зрения практического употребления.

The possibility to influence the germination and the postgerminative activity of bacterial spores and its practical sense

Summary

This article gives a brief characteristic of the development of sporeformer bacteria from the germinative change of the spores and the immediate postgerminative activity until arising of proliferate population and after spending of all nutriments, towards

sporulation. There are discussed some characteristics of spores, mainly the kryptobiotic state and the high resistance of spores against inactivated factors. For the possibility how to influence the germinative ability and the postgerminative development of spores, there are mentioned some examples:

1. The activation of spores and influence of their germination by means of thermal shocks, by sublethal irradiation and by other factors.

2. Change of the peripheral layers of the spores and their properties induced by means of activating interference.

3. Dependence of the detection of spores by producing colonies on spore activity factors.

4. Realisation of undesirable postgerminative activity under conditions when

- a) the spore become paralysed by foregoing sublethal interference, and

- b) when the conditions for example low temperature or limitation of nutrients inhibited the synthetic activity.

5. The possibility of toxin production by de novo germinated spores *Clostridium botulinum*, or for example excretion of preexisting toxins from spores after inactivative and activating interference. The above stated phenomenons are discussed for the point of view of basic research and also in account of the requirements in the practice.