

Zmnožování psychrofilních a slizotvorných mikroorganismů ve slazených nealkoholických nápojích

RNDr. LIBUŠE ŠVORCOVÁ, Výzkumný ústav balneologický v Mariánských Lázních

Do redakce došlo 20. května 1973

Ve slazených minerálních vodách i jiných nealkoholických nápojích se při skladování zmnožují psychrofilní zárodky, mezi nimi i slizotvorné bakterie. Saprophytické psychrofilní zárodky jsou rozšířeny všeobecně a nápoj se může kontaminovat nejen špatnou technologií, nedostatečnou hygienou, nýbrž i přímo ze vzduchu.

Jako psychrofilní bakterie označil *Etilinger* mikroby schopné růst při teplotě 0 °C i nižší, podle *Ingrahama* tvoří tyto zárodky při 0 °C během 14 dnů viditelné kolonie. Podle definice mezinárodní organizace IDF (International Dairy Federation) jsou nazývány psychrofilními mikroby organismy, které se rozmnožují ještě při teplotě 7 °C nebo nižší, a to nezávisle na jejich tepelném optimu. *Lott* rozdělil mikroorganismy podle citlivosti k teplotě do tří skupin:

	minimum	optimum
mezofilní	+5 až +10 °C	+35 až +45 °C,
termofilní	+20 až +40 °C	+45 až +60 °C,
psychofilní	kolem 0	+15 až +20 °C

Obligátně psychofilní jsou mikroorganismy, jejichž maximální růstová teplota je +25 °C a optimální růstová teplota +15 až +20 °C. Jako fakultativně psychofilní se označují mikroorganismy, jejichž teplotní optimum leží výše. Podle *Böhlmann*a se mohou psychofilní zárodky v materiálech bohatých na živiny v krátké době i bez provzdušnění prudce rozmnožovat. Mnohé z nich se vyznačují zvláštní rezistencí vůči různým dezinfekčním prostředkům. Podle *Smidta* a *Lorenze* není 0 °C pro psychofilní zárodky minimální teplotou. Mnohé chladnomilné organismy se mohou rozmnožovat při teplotách ještě hluboko pod bodem mrazu. Pokud je dosud známo, leží teplotní minimum pro rozmnožování psychofilních bakterií v rozsahu -5 až -10 °C, pro psychofilní kvasinky -10 až -12 °C a pro psychofilní plísň -15 až -18 °C. U plísni byl zjištěn růst ještě při -45 °C. Grampozitivní bakterie jsou podstatně rezistentnější proti chladu než gramnegativní. Z gramnegativních jsou to především pseudomonády, které se mohou rozmnožovat za chladu.

Účelem naší práce bylo prokázat možnost rozmnožování psychofilních mikrobů při skladování slazených nealkoholických nápojů za různých teplot i teplot nízkých a vliv organických látek a kyslíku na rychlost množení.

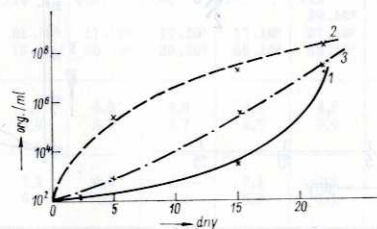
EXPERIMENTY A DISKUSE

Laboratorní experimenty jsme provedli tak, že do transfúzních lahví s roztokem sacharózy, peptonů a lepidla jsme naočkovali směs slizotvorných a psychofilních zárodků umytých sterilním Butterfioldovým roztokem ze sacharózového a živného agaru. Vzorky jsme inkubovali při teplotě 1, 10, 17 a 25 °C aerobně i anaerobně. V určitých časových intervalech jsme vyočkovali 1 ml vzorku

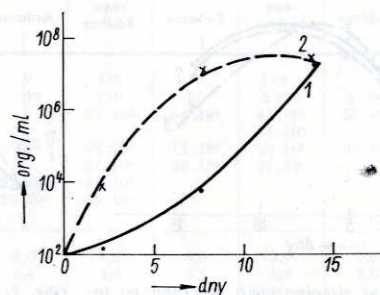
nebo jeho ředění na živný agar a inkubovali při teplotě 22 a 25 °C.

I. Inkubace slizotvorných mikrobů

Jak je patrné z tabulek 1–4 a grafů 1–7, pomnožovaly se slizotvorné mikroby za všech inkubačních teplot a maximálně dosahovaná množství byla ve všech vzorcích zhruba stejná: až 10^7 buněk v 1 ml.



Obr. 1. Výskyt slizotvorných mikrobů po inkubaci v aerobním prostředí při teplotě 10 °C. 1 — prostý cukerný roztok 2 — — — cukr + peptony 3 — — — cukr + lepidlo



Obr. 2. Výskyt slizotvorných mikrobů po inkubaci v aerobním prostředí při teplotě 17 °C. 1 — prostý cukerný roztok 2 — — — cukr + lepidlo.

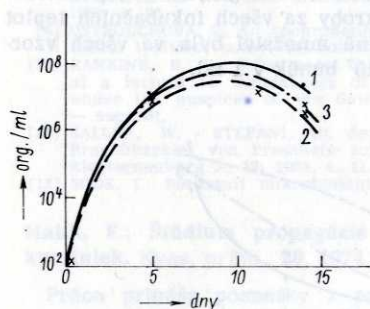
Za inkubace při 10 °C (tab. 2, obr. 1, 4) byla lag fáze delší a výskytová křivka měla pozvolnější průběh. Maximální množství živých bakterií byla zjišťována 22. den inkubace 1, 8–6, $1 \cdot 10^7$, největší množství vůbec $1,4 \cdot 10^8$ bakterií v 1 ml 22. den inkubace za přítomnosti organických látek. Mezi aerobní a anaerobní kultivací nebyl pozorován podstatný rozdíl. Šlo tedy zřejmě o obligátně anaerobní druhy. Ve vzorcích se mírně zvyšovalo pH, refrakce se částečně snižovala za anaerobní inkubace.

Za inkubace vzorků při 17 °C (tab. 3, obr. 2, 5) byla dosahovaná maxima téměř stejná jako při inkubaci při 10 °C, prudké rozmnožování bakterií však nastalo již okolo 5. dne inkubace, hodnot 10^7 bylo dosaženo za pří-

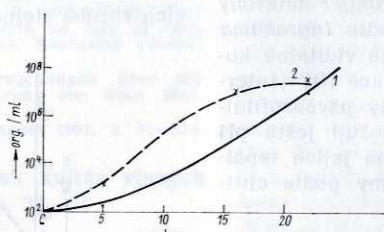
Tabulka 1. Počet slizotvorných mikrobů v 1 ml po inkubaci v umělém médiu za různých teplot

Den inkubace	10 °C		17 °C		25 °C	
	aerobně	anaerobně	aerobně	anaerobně	aerobně	anaerobně
0	196	138	188	135	190	121
5	10 · 10 ⁴	2 · 10 ³	8 · 10 ³	8,5 · 10 ³	17 · 10 ³	21 · 10 ³
8	22 · 10 ⁶	8 · 10 ⁶	50 · 10 ⁶	30 · 10 ⁶	25 · 10 ⁶	30 · 10 ⁶
15	17 · 10 ⁶	17 · 10 ⁷	30 · 10 ⁶	30 · 10 ⁶		
mikroskopicky 15. den: baktérie kvasinky	10 · 10 ⁵ 11 · 10 ⁴	26 · 10 ⁴ 56 · 10 ³	76 · 10 ⁴ 58 · 10 ³	60 · 10 ⁴ 30 · 10 ³	41 · 10 ⁵ 14 · 10 ³	50 · 10 ⁴ 75 · 10 ³
pH ihned pH 15. den	4,0 4,3	4,0 4,1	4,0 3,8	4,0 3,6	4,0 3,7	4,0 3,9
Rf ^o Bg ihned 15. den	7,1 7,1	7,8 6,8	7,8 7,4	7,8 6,8	7,1 7,3	7,3 6,6

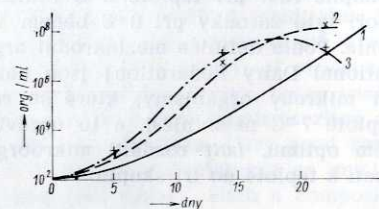
tomnosti peptonů již 8. den, maximální množství 10 · 10⁸ buněk v 1 ml za aerobní kultivace a obsahu 600 ppm peptonů 14. den. Při inkubaci při 10 i 17 °C se jasně projevil stimulační účinek organických látek na rychlost množení (viz obr. 1, 2, 4, 5). I když při teplotě 10 °C nebyl pozorován rozdíl mezi aerobní a anaerobní kultivací, nerozmnožovaly se mikroorganismy (baktérie) za přítomnosti lepidla při teplotě 17 °C za aerobních podmínek. Stalo se tak pravděpodobně proto, že byl vzorek kontaminován plísněmi, jejichž mycelium se v láhvi rozrostlo a vylučované toxiny potom zabránily rozmnožování slizotvorných mikrobů. Při anaerobní kultivaci s lepidlem a drceným papírem dosáhl počet mikrobů maximální hodnoty 10⁷ v 1 ml 14. den inkubace. Za aerobních podmínek nastal v prostém cukerném roztoku i za přítomnosti peptonů značný pokles pH za zřetelného snížení refrakce, což znamená, že byly intenzivně metabolizovány organické látky, především cukry až na kysličník uhličitý, čímž se druhotně snižovalo pH. Za přítomnosti lepidla se pH mírně zvýšilo, pokles refrakce byl nepatrný podobně jako při teplotě 10 °C.



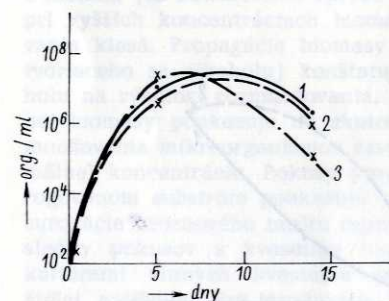
Obr. 3. Výskyt slizotvorných mikrobů po inkubaci v aerobním prostředí při teplotě 25 °C. 1 — sacharóza, 2 — sacharóza + pepton 3 — sacharóza + lepidlo.



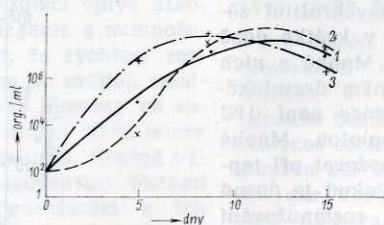
Obr. 4. Výskyt slizotvorných mikrobů po inkubaci v anaerobním prostředí při teplotě 10 °C. 1 — prostý cukerný roztok. 2 — cukr + peptony.



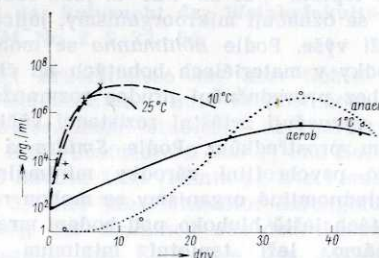
Obr. 5. Výskyt slizotvorných mikrobů po inkubaci v anaerobním prostředí při teplotě 17 °C. 1 — sacharóza, 2 — sacharóza + pepton 3 — sacharóza + lepidlo.



Obr. 6. Výskyt slizotvorných mikrobů po inkubaci v anaerobním prostředí při teplotě 25 °C. 1 — sacharóza, 2 — cukr + pepton 3 — cukr + lepidlo.



Obr. 7. Zmnožování psychrofilních mikrobů slizotvorných za aerobní i anaerobní kultivace. 1 — 10 °C 2 — 17 °C, 3 — 25 °C.



Obr. 8. Zmnožování psychrofilních mikrobů po inkubaci v aerobním i anaerobním prostředí za různých teplot.

Tabulka 2. Výskyt slizotvorných mikrobů v umělém médiu za inkubace při 10 °C

Den inkubace	Sacharóza		Sacharóza + pepton v ppm								Sacharóza + lepidlo %					
	aerob.	anaerob.	aerobní prostředí				anaerobní prostředí				aerobní prostředí			anaerobní prostředí		
			6	60	600	průměr	6	60	600	průměr	0,6	6	průměr	0,6	6	průměr
0	230	132	195	155	170	170	132	100	130	120	220	200	210	132	135	134
2	100	11	100	140	110	120	21	10	55	29	100	130	115	3	22	12
5	24 · 10 ²	260	nespoč.	43 · 10 ⁴	nespoč.	43 · 10 ⁴	420	16 · 10 ²	10 · 10 ²	10 · 10 ²	120	18 · 10 ²	960	11 · 10 ²	28 · 10 ²	15 · 10 ²
15	40 · 10 ²	32 · 10 ⁴	22 · 10 ⁶	22 · 10 ⁶	75 · 10 ⁵	17 · 10 ⁶	38 · 10 ⁵	31 · 10 ⁶	17 · 10 ⁶	31 · 10 ⁶	19 · 10 ⁶	23 · 10 ⁶	21 · 10 ⁶	61 · 10 ⁶	42 · 10 ⁶	52 · 10 ⁶
22	22 · 10 ⁶	18 · 10 ⁶	14 · 10 ⁷		25 · 10 ⁵	14 · 10 ⁷	22 · 10 ⁶		41 · 10 ⁶							
pH ₀	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
pH ₂₂	3,2	4,2	4,0	4,2	4,3	4,2	4,2		4,1	4,1	4,2	4,3	4,2	4,1	4,2	4,1
Rf ₀	6,8	7,7	7,0	7,5	7,0	7,2	7,8	8,2	7,6	7,9	7,1	7,2	7,1	7,5	8,6	7,7
Rf ₂₂	6,8	7,0	7,0	7,3	7,0	7,0	7,1		6,5	7,0	7,0	7,2	7,1	6,8	7,2	7,0

Tabulka 3. Výskyt slizotvorných mikrobů po inkubaci v umělém médiu při teplotě 17 °C

Den inkubace	Sacharóza		Sacharóza + pepton v ppm								Sacharóza + lepidlo %					
	aerob.	anaerob.	aerobní prostředí				anaerobní prostředí				aerobní prostředí			anaerobní prostředí		
			6	60	600	průměr	6	60	600	průměr	0,6	6	průměr	0,6	6	průměr
0	200	140	120	185	300	200	110	155	130	130	180	140	160	130	110	120
2	3	15	200	110	250	220	11	16	40	22	78	110	95	11	16	14
5	nesp.	19.10 ⁵	nesp.	69.10 ⁵	nesp.	—	13.10 ⁵	nesp.	nesp.	—	8	1100	—	25.10 ⁵	31.10 ⁵	28.10 ⁵
8	53.10 ⁵	18.10 ⁵	63.10 ⁵	19.10 ⁵	66.10 ⁵	50.10 ⁵	19.10 ⁵	21.10 ⁵	10.10 ⁵	43.10 ⁵	0	0	0	12.10 ⁵	14.10 ⁵	13.10 ⁵
14		96.10 ⁵	45.10 ⁵	10.10 ⁵	10.10 ⁵	22.10 ⁵	12.10 ⁷	76.10 ⁵	35.10 ⁵	77.10 ⁵				35.10 ⁵	50.10 ⁵	42.10 ⁵
22																
pH ₀	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
pH ₂₂	3,9	3,5	3,8	3,8	3,8	3,9	3,5	3,5	3,7	3,6	4,2	4,3	4,1	3,9	3,9	3,9
Rf ₀ Bg	7,9	7,9	8,8	7,8	7,6	8,1	8,8	7,8	7,9	7,9	8,1	7,9	8,0	7,1	7,9	7,5
Rf ₂₂	7,1	6,9	7,1	7,0	7,0	7,0	7,5	6,4	6,6	6,8	7,7	7,7	7,7	6,5	6,9	6,7

Tabulka 4. Výskyt slizotvorných mikrobů po inkubaci v umělém médiu při teplotě 25 °C
Počet v 1 ml

Den inkubace	Sacharóza		Sacharóza + pepton v ppm								Sacharóza + lepidlo v%					
	aerob.	anaerob.	aerobní prostředí				anaerobní prostředí				aerobní prostředí			anaerobní prostředí		
			6	60	600	průměr	6	60	600	průměr	0,6	6	průměr	0,6	6,0	průměr
0	150	160	150	280	250	220	120	120	110	116	130	180	155	115	90	100
2	22.10 ⁵	nesp.	20.10 ⁵	21.10 ⁵	28.10 ⁵	23.10 ⁵	nesp.	14.10 ⁵	nesp.	23.10 ⁵	21.10 ⁵	17.10 ⁵	17.10 ⁵	39.10 ⁵	20.10 ⁵	30.10 ⁵
5	17.10 ⁵	17.10 ⁵	21.10 ⁵	21.10 ⁵	20.10 ⁵	20.10 ⁵	20.10 ⁵	20.10 ⁵	20.10 ⁵	16.10 ⁵	17.10 ⁵	17.10 ⁵	17.10 ⁵	27.10 ⁵	17.10 ⁵	23.10 ⁵
14	41.10 ⁵	53.10 ⁵	26.10 ⁵	21.10 ⁵	20.10 ⁵	20.10 ⁵	20.10 ⁵	16.10 ⁵	40.10 ⁵	13.10 ⁵	20.10 ⁵	20.10 ⁵	60.10 ⁵	50.10 ⁵	30.10 ⁵	26.10 ⁵
pH ₀	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
pH ₁₄	3,7	3,9	3,6	3,6	3,7	3,6	3,7	3,8	3,9	3,8	3,7	3,7	3,7	3,9	3,9	3,9
Rf ₀ Bg	7,4	7,9	6,7	7,2	7,5	7,2	7,5	6,9	7,0	7,1	6,7	7,5	7,1	7,2	7,3	7,2
Rf ₁₄	7,5	6,5	6,7	7,2	7,5	7,2	6,5	6,8	6,5	6,6	6,7	7,2	6,9	7,1	6,7	6,9

Za inkubace při teplotě 25 °C (tab. 4, obr. 3 a 6), nastalo již do druhého dne prudké zmnožení buněk, což jsme nepředpokládali, a nezachytili jsme tedy dostatečným ředěním kvantitativní množství bakterií. Maximální množství 10⁷ buněk bylo zjištěno již 5. den inkubace, 14. den byl již pozorován zřetelný pokles. Za této optimální teploty se u inkubovaného kmene neprojevil vliv organických látek a lepidla, jasně patrný vždy v lag a log fázi, neboť jsme tyto fáze již 2. den kvantitativně nezachytili. Nebyl pozorován rovněž rozdíl mezi aerobní a anaerobní inkubací, což opět potvrzuje, že jde o obligátně anaerobní druhy s optimum kolem 25 °C.

Přesto však všechny pokusy prokázaly, že směs slizotvorných mikrobů, smytá ze sacharózového agarů obsahovala druhy schopné množit se za nepříznivých podmínek při teplotě 10 °C, i když jejich množení bylo pomalejší, neboť maximální hodnoty buněk byly získány až 22. den proti inkubaci při teplotě 25 °C.

II. Inkubace psychrofilních mikrobů

Se směsí psychrofilních mikrobů, smytých ze živného agarů inkubovaného při teplotě 22 °C, byl proveden obdobný pokus jako se slizotvornými mikroby. Suspenze těchto mikrobů v Butterfioldově roztoku byla naočkována do transfúzních lahví s 7–9 % obsahem sacharózy a různým množstvím peptonů a lepidla s rozdrčeným papírem. Vzorke se inkubovaly aerobně i anaerobně při teplotě 1, 10 a 25 °C. V určitých časových intervalech se vyočkovával 1 ml vzorku nebo jeho ředění na živný agar. Plotny byly kultivovány při teplotě 22 °C po dobu 48 hodin.

K prověření možnosti množení mikrobů při chladírenské teplotě uchovávali jsme vzorky při teplotě 1 °C v chladničce (tab. 6, obr. 7, 8, 9, 12). Přesto i za této teploty za anaerobních podmínek dosáhlo množství bak-

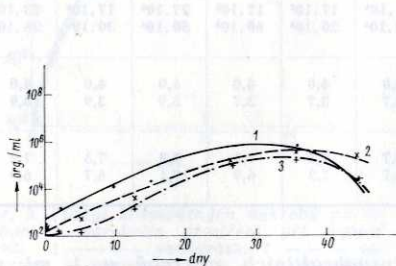
Tabulka 5. Počet psychrofilních mikrobů v 1 ml po inkubaci v umělém médiu za různých teplot

Den inkubace	1 °C		10 °C		25 °C	
	aerobně	anaerobně	aerobně	anaerobně	aerobně	anaerobně
0	9	230	7	130	6	160
2	9	250	25	2 500	8 500	
5	5	73.10 ⁵	64.10 ⁵	41.10 ⁵	55.10 ⁵	63.10 ⁵
7				14.10 ⁵		
13	43	25.10 ⁵	13.10 ⁵	56.10 ⁵	30.10 ⁵	30.10 ⁵
23		37.10 ⁵	50.10 ⁵	31.10 ⁵		
36	87.10 ⁵	66.10 ⁵				
44	35.10 ⁴	30.10 ⁴				
pH ihned	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
23. den	3,4	3,6	3,5	3,9	3,5	3,6
Rf ₀ Bg						
ihned	9,8	7,2	9,9	7,1	9,9	7,1
23. den	9,3	6,2	7,4	6,3	8,6	6,1

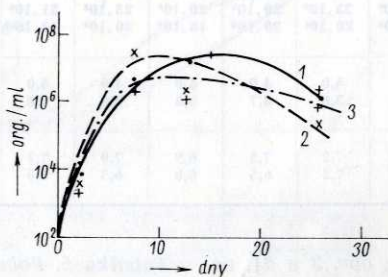
terií v pouhém cukerném roztoku již druhý den inkubace většího počtu než 1000 buněk v 1 ml, 5. den hodnot 10⁴. Maximální počet buněk 8.10⁵ byl zjištěn 36. den inkubace, zhruba stejný počet jako za přítomnosti lepidla v kyslíkatém prostředí. Při obsahu peptonu bylo maximální množství dosahované 36. den o 1 až 2 řády vyšší. Tyto výsledky souhlasí s poznatky autorů uvedených na začátku práce i s výsledky pokusů *Bronella*, *Arpae*, *Ogaty*, *Bockelmann*, *Kunrata* a *Grüna*. Za aerobních podmínek se rozrostlo v cukerném roztoku a vzorcích s obsahem lepidla mycelium plísni, vzorky získaly typický plísňový, lékařský až fenolový pach, a toxiny plísni zabránily rozmnožování mikroorganismů. Mikroskopicky bylo v těchto vzorcích zjištěno malé

Tabulka 6. Výskyt psychrofilních mikrobů po inkubaci v umělém médiu při teplotě 1 °C
Počet mikrobů v 1 ml

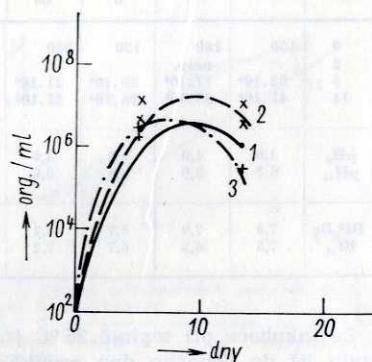
Den inkubace	Sacharóza		Sacharóza + pepton v ppm								Sacharóza + lepidlo v%					
	aerob.	ne aerob.	aerobní prostředí				anaerobní prostředí				aerobní prostředí			anaerobní prostředí		
			6	60	600	průměr	6	60	600	průměr	0,6	6	průměr	0,6	6	průměr
0	7	400	9	12	11	11	250	320	220	260	3	10	6	90	100	95
2	7	1 100	8	6	2	5	240	110	11	120	2	19	10	27	11	19
5	5	42.10 ³	4	11	5	7	1 600	80	25	570	4	7	5	13	6	10
13	19	29	29	29	29	29	nesp.	nesp.	21.10 ²	—	6	0	3	53.10 ²	150	2 700
26	4	33.10 ³	27.10 ³	40.10 ³	nesp.	—	nesp.	nesp.	—	—	3	18	11	nesp.	12.10 ⁴	—
36	19	80.10 ⁴	27.10 ³	18.10 ⁴	55.10 ³	87.10 ⁴	90.10 ⁴	15.10 ⁵	14.10 ⁴	85.10 ⁴	8	16.10 ³	80.10 ²	15.10 ⁴	35.10 ⁴	25.10 ⁴
44	2	11.10 ³	60.10 ⁴	—	—	—	14.10 ⁵	21.10 ⁴	11.10 ⁴	59.10 ⁴	410	52.10 ²	26.10 ²	22.10 ³	40.10 ³	31.10 ³
pH ₀	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
pH ₄	3,3	3,7	3,5	3,6	3,5	3,5	3,8	4,5	4,1	4,1	3,8	3,4	3,6	3,3	3,3	3,3
Rf ₀ Bg	9,6	8,5	9,7	9,8	9,8	9,8	7,2	7,7	6,8	7,2	9,9	10,1	10,0	6,5	6,6	6,5
Rf ₄₄	9,5	6,8	9,2	9,1	8,6	9,0	6,2	6,5	5,8	6,2	9,7	9,9	9,8	6,0	6,0	6,0
mikro-skop. kvas.		80.10 ³ plísňe mycelium	19.10 ⁴ zkal. zkvaš.	39.10 ⁴ zkal. zkvaš.	29.10 ⁴ zákal zkvaš.	29.10 ⁴ zákal zkvaš.	76.10 ³ zákal zkvaš.	12.10 ⁴ zákal zkvaš.	12.10 ⁴ zákal zkvaš.	10.10 ⁴ zákal zkvaš.	1 000 plísňe kvas.	550. plísňe zkvaš.	800 plísňe zkvaš.	12.10 ⁴ zákal zkvaš.	52.10 ³ zákal zkvaš.	86.10 ³ zákal zkvaš.



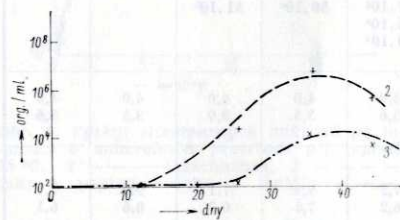
Obr. 9. Výskyt psychrofilů při anaerobní kultivaci při teplotě 1 °C. 1 — cukr, 2 — cukr + pepton, 3 — cukr + lepidlo.



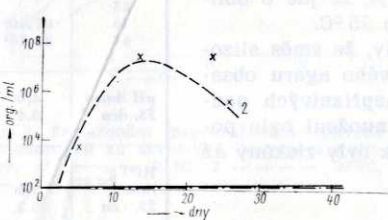
Obr. 10. Výskyt psychrofilů při anaerobní kultivaci při teplotě 10 °C. 1 — cukr, 2 — cukr + pepton, 3 — cukr + lepidlo.



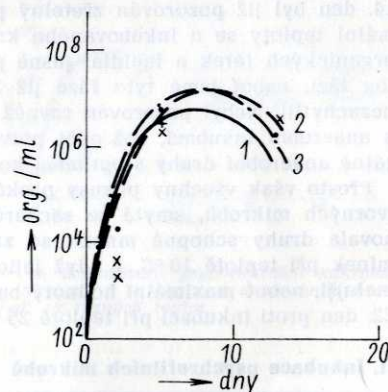
Obr. 11. Výskyt psychrofilů za anaerobní kultivace při teplotě 25 °C. 1 — cukr, 2 — cukr + pepton, 3 — cukr + lepidlo.



Obr. 12. Výskyt psychrofilů za aerobní kultivace při teplotě 1 °C. 1 — cukr, 2 — cukr + pepton, 3 — cukr + lepidlo.



Obr. 13. Výskyt psychrofilů za aerobní kultivace při teplotě 10 °C. 1 — cukr, 2 — cukr + pepton, 3 — cukr + lepidlo.



Obr. 14. Výskyt psychrofilů za aerobní kultivace při teplotě 25 °C. 1 — cukr, 2 — cukr + pepton, 3 — cukr + lepidlo.

množství kvasinek. Za aerobních podmínek a obsahu bílkovinných organických látek byla dosahována téměř stejná maxima jako za podmínek anaerobních. Mikroskopicky jsme zjistili, že se množily převážně kvasinky, jejichž množství na konci pokusu dosahovalo hodnoty 10^5 buněk v 1 ml. Tyto mikroorganismy využívaly pro svůj metabolismus složité organické látky včetně cukrů a ty přeměňovaly až na konečný produkt, kysličník uhličitý, který druhotně snižoval pH. Naproti tomu při anaerobní kultivaci pravděpodobně rozklad organických

látek neproběhl až do konce, takže i při větším snížení refrakce zůstalo pH za obsahu peptonů stejné, nebo se dokonce zvýšilo. Pokud se ve vzorcích rozrůstalo mycelium plísňí, refrakce se téměř nezměnila, tzn., že cukry byly jen nepatrně využívány.

K asimilaci byly tedy využívány ostatní organické látky, konečným produktem potom byly organické kyseliny, které snižovaly pH.

Za inkubace při 10 °C (tab. 7, obr. 10 a 13), tedy při teplotě značně nižší, než povoluje norma pro skladování

Tabulka 7. Výskyt psychrofilních mikrobů po inkubaci v umělém médiu při teplotě 10 °C
Počet mikrobů v 1 ml

Den inkubace	Sacharóza		Sacharóza + pepton v ppm								Sacharóza + lepidlo ‰					
	aerob.	anaerob.	aerobní prostředí				anaerobní prostředí				aerobní prostředí			anaerobní prostředí		
			6	60	600	průměr	6	60	600	průměr	0,6	6	průměr	0,6	6	průměr
0	9	48	6	10	5	7	30	340	230	200	11	5	8	140	5	70
2	14	9.10 ³	13	15	26	18	56.10 ²	150	230	2 000	11	9	10	150	39	95
5	110	70.10 ⁴	25.10 ³	68.10 ³	12.10 ²	12.10 ²	nesp.	nesp.	nesp.	nesp.	17	4	10	—	45.10 ³	—
7		74.10 ⁵					49.10 ⁵	11.10 ⁶	50.10 ⁶	11.10 ⁶				58.10 ⁵	72.10 ⁵	65
13	7	14.10 ⁶	13.10 ⁶	25.10 ⁶	19.10 ⁴	13.10 ⁶	26.10 ⁵	62.10 ⁵	86.10 ⁵	58.10 ⁵				14.10 ⁵	85.10 ⁴	11
26	3	13.10 ⁴	60.10 ⁴	46.10 ⁵	43.10 ⁵	50.10 ⁵	25.10 ⁴	28.10 ⁴	41.10 ⁴	31.10 ⁴		1	—	90.10 ⁴	42.10 ⁵	26
pH ₀	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
pH ₂₆	3,8	3,7	3,5	3,4	3,1	3,3	3,8	3,7	4,0	3,8	3,3	3,6	3,4	3,9	4,3	4,1
Rf ₀ Bg	9,7	7,7	9,6	9,8	9,8	9,7	7,4	7,9	6,2	7,2	10,1	9,9	10,0	6,7	6,6	6,7
Rf ₂₆	7,0	7,0	8,2	7,8	7,8	7,9	6,3	6,5	6,0	6,3	9,1	9,7	9,4	6,0	6,1	6,1
mikroskop. kvasinky		98.10 ³	26.10 ⁴	3.10 ⁵	38.10 ⁴	31.10 ⁴	58.10 ³	64.10 ³	70.10 ³	64.10 ³	20.10 ⁴	12.10 ³	10.10 ⁴	56.10 ³	96.10 ³	76.10 ³
baktérie		38.10 ³														
pach pl.		plísňe ojedín. zkvaš.	ojedín. zkvaš.	ojedín. zkvaš.	ojedín. zkvaš.	ojedín. zkvaš.	ojedín. zkvaš.	ojedín. zkvaš.	ojedín. zkvaš.	ojedín. zkvaš.	plísňe zkvaš.	plísňe zkvaš.	plísňe zkvaš.	80.10 ³ zkvaš.	64.10 ³ zkvaš.	72.10 ³ zkvaš.

slazených minerálních vod, množovaly se mikroorganismy za anaerobních podmínek již 2. den inkubace v cukerném roztoku i s obsahem peptonů. Maximálně dosažené množství bylo 10⁴ buněk v 1 ml, 5. den inkubace 10⁵, sedmý den 10⁶ buněk v 1 ml. Po delší lag fázi nastalo množování i za aerobních podmínek ve vzorcích s peptony, avšak v pouhém cukerném roztoku a za přítomnosti lepidla, stejně jako při inkubační teplotě 1 °C se rozrostlo mycelium plísni, jejichž toxiny opět zabránily rozmnožení ostatních mikroorganismů. Tyto vzorky získaly opět lékárenský až fenolový pach, zatímco vzorky se množeny baktériemi pach kyselý, se množeny kvasinkami pach zkvašený. Zdá se tedy, že bílkoviny za nepříznivých teplotních podmínek stimulují množování baktérií a kvasinek. Ve vzorcích s plísňovým myceliem pokleslo pH nepatrně oproti ostatním vzorkům, v nichž se množovaly baktérie a kvasinky, které intenzivně asimilovaly cukry, za aerobních i anaerobních podmínek. Tento proces se projevil značným snížením refrakce a vlivem uvolňovaných kyselin i kysličníku uhlíkatého i poklesem pH. V některých případech působily polypeptidy a aminokyseliny jako pufr, takže se pH tolik nesnížilo.

Za inkubace při teplotě optimální pro tyto mikroorganismy +25 °C (obr. 11 a 14) bylo již 2. den zjištěno 10³ až nespočetné množství mikroorganismů, maxima dosáhly všechny výskytové křivky za aerobní i anaerobní inkubace již 5. den skladování. Dosahovaná množství byla stejná jako za inkubace při nižších teplotách, i když je možno připustit názor Grüna a Konstantinidou, že šlo o jiné druhy mikroorganismů. Byla totiž vočkována směsná kultura, jejíž druhy jsme blíže neurčovali. Přesto se nám podařilo prokázat, že se mikroorganismy množují ve slazených nealkoholických nápojích, za nízkých teplot. Při teplotě 25 °C se v žádném vzorku nerozrostly plísňe. Baktérie a kvasinky, pro něž byla tato teplota optimální, zřejmě potlačovaly růst mycelia, neboť i v tomto případě byl mezi oběma těmito skupinami pozorován jakýsi antagonismus. Po skončení pokusu, 13. den, byly mikroskopicky prokázány kvasinky v množství 10⁴—10⁵ a baktérie v množství 10³. V aerobním cukerném roztoku a za přítomnosti lepidla nastal větší pokles pH než ve vzorcích inkubovaných anaerobně, kde zřejmě oxidace vlivem nedostatku kyslíku nemohla proběhnout až do konce, za anaerobní kultivace se více snížila refrakce pravděpodobně proto, že muselo být pro životní činnost rozloženo podstatně větší

množství živin. Ve všech vzorcích byl pozorován silný zákal a kyselý až zkvašený pach.

Závěr

1. V umělém sacharózovém médiu i v tomto médiu obohaceném peptony a lepidlem se za inkubace při teplotách 25, 17, 10 i 1 °C pomnožovaly slizotvorné a psychrofilní mikrobi.

2. Nižší teplota inkubace vzorků se projevila prodloužením lag a log fáze výskytových křivek. Při teplotách 25 a 17 °C měly výskytové křivky téměř stejný průběh, při teplotě 10 °C bylo maxima dosaženo o 2 dny později, tj. 7. den inkubace. Při teplotě 1 °C bylo množství buněk 10⁴ dosaženo mezi 5. až 13. dnem inkubace, množství 10⁶ v 1 ml až 36. den inkubace.

3. Při nízkých teplotách se množovaly pravděpodobně jiné druhy psychrofilních mikrobů, v několika vzorcích se rozrostlo mycelium plísni. Druhy se neurčovaly.

4. Mezi plísněmi a ostatními mikroorganismy byl pozorován jakýsi antagonismus, buď vlivem jedovatosti vylučovaných toxinů do prostředí, nebo spotřebováním organických živin. Ve vzorcích s rozrostlým plísňovým myceliem se nemnožovaly ostatní mikroorganismy a naopak.

5. Vliv organických látek a lepidla se projevil hlavně při inkubaci za nepříznivých podmínek, tj. při nízké inkubační teplotě. Při teplotě optimální mezi jednotlivými vzorky nebyl pozorován rozdíl.

6. Rovněž rozdíl mezi inkubací za aerobních a anaerobních podmínek byl zřetelnější při teplotách 1 a 10 °C, kdy se za aerobních podmínek rozrůstalo mycelium plísni. V roztoku se mírně snižovala refrakce i pH.

7. Ve vzorcích se značně snižovala refrakce vlivem asimilace cukrů psychrofilními mikroorganismy. Jestliže metabolismus proběhl až do konce, tj. až na kysličník uhlíčitý, který se prudce uvolňoval ze vzorků, nebo byl-li konečným produktem některé organické kyseliny, snižovalo se druhotně pH až o 0,9. V některých pokusech vzorcích se refrakce nesnižovala, byly tedy využívány ostatní organické látky z prostředí.

8. Rozrostlo-li se ve vzorcích plísňové mycelium, byl jasně patrný plísňový, lékárenský až fenolový pach, při množení baktérií pach kyselý, při množení kvasinek zřetelně patrný pach zkvašený.

9. Organické látky, které mohou ulpět i při špatném výplachu na stěnách lahví a dostat se tak do nápoje, umožňují a podporují zvláště při skladování za nepříznivých

vých podmínek rozmnožování mikroorganismů, kterými byl nápoj kontaminován.

10. Z uvedených sledování vyplývá, že teplota 18 °C nemůže být hraniční teplotou pro skladování minerálních vod, neboť i při teplotě nižší, tj. 10 a 1 °C se množují mikroorganismy, kterými byl vzorek kontaminován.

11. Potlačení výskytu a množování mikroorganismů lze dosáhnout jedině důsledným dodržováním hygienických podmínek v provozech a dokonalou čistotou lahví.

Literatura

- [1] ARPAL, J.: Růst mikroorganismů v potravinách za chladu. Čs. hygiena, **9**, 1964, s. 129—139.
- [2] ARPAL, J.: O vplyve psychrofilních mikroorganizmov na akost potravín. Průmysl potr. **15**, 1964, s. 574—76.
- [3] ARPAL, J.: Ergebnisse von Untersuchungen über den Einfluss tiefer Temperaturen auf Hefen und Schimmelpilzen aus Fruchtsäften. Kälte, **18**, 1965, s. 173—177.
- [4] BOCKELMANN, L.: Gesamtkeimzahl der psychrophilen Bakterien in tiefgekühlter Milch. Milchwiss. **21**, 1966, s. 275—78.
- [5] DROMELIE, L. E.: Effect of some environmental factors on psychrophilic microbacteria. J. Appl. Bact. **29**, 1966, s. 447—453.
- [6] BÜHLMANN, Y.: z publikace F. Schura 1969
- [7] ETLINGER, L.: z publikace F. Schura 1969
- [8] GRÜM, L. - KONSTANT INIDOU, A.: Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in kühlgelagerter Rohmilch. Milchwiss. **26**, 1971, s. 413—415.
- [9] HARDER, W. - VELKAMP, H.: Growth temperature relationship in psychrophilic bacteria. J. Microbiol. Serc. **34**, 1968, s. 244.
- [10] INGRAHAM, J. L.: z publikace F. Schura 1969
- [11] KUNDRAT, W.: Die Bedeutung der kältetoleranten Keime für die Milchwirtschaft. Alimenta **1970**, s. 14—17.
- [12] LOTT, C.: z publikace F. Schura 1969
- [13] OGATA, K.: Studies on the low temperature fermentation. I. Isolation and characterization of psychrophilic bacteria. Agr. Biol. Chem. **33**, 1969, s. 704—709.
- [14] ROTHER, H.: Schädliche Veränderungen von süßen, alkoholfreien Erfrischungsgetränken. Naturbrunnen, **19**, 1969, s. 370 až 378.
- [15] SCHMIDT, W. - LORENZ.: z publikace F. Schura 1969.
- [16] SCHUR, F.: Die Bedeutung kälteliebender Bakterien für die Lebensmittelindustrie. Schweiz. Brau. Rdch. **80**, 1969, s. 305 až 308.
- [17] ŠVORCOVÁ, L.: Změna kvality minerálních vod během skladování. Záv. zpráva VÚB 1970 s. 44.
- [18] ŠVORCOVÁ, L.: Kvalita minerálních vod a její změny během plnění a skladování. Fyz. věst. **49**, 1971, s. 223—26.
- [19] ŠVORCOVÁ, L.: Studium příčin množování kvasinek v nealkoholických nápojích. Kvas. prům. v tisku.

Švorcová, L.: Zmnožování psychrofilních a slizotvorných mikroorganismů ve slazených nealkoholických nápojích. Kvas. prům. **20**, 1974, č. 2, s. 35—41.

Bylo sledováno množování psychrofilních a slizotvorných mikrobů v sacharózovém prostředí i v tomto prostředí obohaceném organickými látkami za aerobních i anaerobních podmínek a teplot 1, 10, 17, 25 °C. Ve všech případech docházelo ke množování bakterií. Nižší teploty se projevovaly prodloužením lag a log fáze výskytové křivky. Jejich průběh byl při teplotách 25 a 17 °C téměř stejný, při teplotě 10 °C bylo maxima dosaženo o 2 dny později, tj. 7. den inkubace, při teplotě 1 °C bylo dosaženo množství o 2 řády nižší, mezi 5. a 13. dnem inkubace, maxima, tj. 10⁶ buněk bylo dosaženo teprve 36. den inkubace. Vliv organických látek se projevil při inkubaci za nepříznivých podmínek, tj. při nízkých inkubačních teplotách. Při teplotě optimální nebyl pozorován rozdíl mezi jednotlivými vzorky. Rozdíl mezi anaerobní a aerobní kultivací byl zřetelný při teplotách 1 a 10 °C, kdy se v anaerobním prostředí rozrůstalo mycelium plísni, které zřejmě zabránilo množování ostatních mikrobů. V roztoku se mírně snižovala refrakce a pH. V ostatních vzorcích se snižovala refrakce a pH dostatečně rychleji, zřejmě vlivem asimilace cukrů psychrofilními mikrobi. Jestliže metabolismus proběhl až do konce, snížilo se pH až o 0,9. Rozrostlo-li se ve vzorcích plísňové mycelium, byl jasně patrný lékárenský až fenolový pach, při množení bakterií pach kyselý, při výskytu kvasinek zřetelný pach zkvašený. Organické látky bílkovinného charakteru, které ulpěly na stěnách lahví, mohou zvláště při skladování za nízkých teplot podpořovat rozmnožování mikroorganismů.

Rozmnožování psychrofilních mikrobů lze omezit důsledným dodržováním hygieny při plnění slazených minerálních vod a dokonalou čistotou lahví. Z uvedených

pozorování vyplývá, že teplota 18 °C nemůže být hraniční teplotou pro skladování slazených minerálních vod, neboť i při teplotě 17 a 10 °C, dokonce i při 1 °C docházelo ke množování bakterií.

Шворцова, Л.: Размножение холодолюбивых и слизееобразующих микроорганизмов в подслащенных безалкогольных напитках. Квас. прум. **20**, 1974, № 2, стр. 35—41.

В статье приводятся результаты изучения интенсивности размножения холодолюбивых и слизееобразующих микроорганизмов в подслащенной среде в разных условиях, т. е. аэробных и анаэробных, в присутствии разных органических веществ и при температурах 1, 10, 17 и 25 °C. Размножение микроорганизмов наблюдалось в той или иной мере при всех экспериментах. Низкая температура влияет на увеличение длительности как первоначальной стадии покоя, так и стадии развития. Между кривыми размножения при температурах 17 и 25 °C нет большой разницы. При температуре 10 °C максимум наступил на два дня позже, т. е. на 7-ой день инкубации. При температуре 1 °C размножение достигало своего максимума, т. е. 10⁶ клеток лишь на 36-ой день инкубации. В период с 5-го до 13-го дня число микроорганизмов было при указанной температуре, т. е. 1 °C, на два порядка меньше чем при других температурах. Присутствие органических веществ влияло на инкубацию лишь при низких температурах. При более высоких температурах влияние не наблюдалось. Различия между аэробными и анаэробными условиями обнаружили при температурах 1 и 10 °C. При 10 °C быстро разрастался мицелий плесени, препятствовавший размножению других микробов. В образцах с мицелием уменьшалась несколько рефракция и pH. В остальных образцах рефракция и pH падали более резко, повидимому под влиянием ассимиляции сахара холодолюбивыми микробами. В образцах с законченным метаболизмом pH уменьшалось даже на 0,9. Присутствие плесневого мицелия придавало среде феноловый запах, присутствие бактерий обнаруживалось кислым запахом, а присутствие дрожжей типичным запахом брожения. Органические вещества белкового характера, оставшиеся на стенках бутылок, могут при низких температурах складирования напитков способствовать размножению микроорганизмов.

Размножение холодолюбивых микроорганизмов можно ограничить точным соблюдением гигиенических правил при разливе и закупорке напитков а также тщательной мойкой бутылок. Из результатов исследования следует, что температуру 18 °C нельзя считать вполне достаточной для хранения подслащенной минеральной воды, так как размножение микроорганизмов наблюдалось при более низких температурах, т. е. 17, 10 и даже 1 °C.

Švorcová, L.: Propagation of Psychrophilous and Mucoid Microorganisms in Sweetened Non-alkoholic Beverages. Kvas. prům. **20**, 1974, No 2, pp. 35—41.

The authoress presents the results of her study into the propagation of psychrophilous and mucoid microorganisms in sweetened medium under different conditions, viz. aerobic and anaerobic, in the presence of organic substances, and at various temperatures i. e. 1, 10, 17 and 25 °C. Propagation of microorganisms was observed irrespectively of the created conditions. Low temperatures protract the lag and log phases of the propagation curves. Between the forms of curves for 25 and 17 °C is only slight difference, at 10 °C maximum level is reached by 2 days later, i. e. on the 7th day of incubation, at 1 °C in the period lasting from the 5th to 13th day the number of microorganisms is by two orders lower than at higher temperatures and maximum, i. e. 10⁶ of cells is reached on the 36th day

of incubation. The presence of organic substances has a certain effect at low temperatures, whereas at higher temperatures, more favourable for propagation, no marked difference can be observed. The difference between aerobic and anaerobic conditions is pronounced at 1°C and 10°C, since under anaerobic conditions mycelium of moulds grows very vigorously and restricts propagation of other microorganisms. Refraction and pH are under such conditions slightly lower. In other samples the decrease of refraction and pH is far more rapid which is apparently due to the assimilation of sugar by psychrophilous microbes. If metabolism is allowed to run to end pH may be lower by as much as 0.9. Mould mycelium gives the medium phenolic odour, bacteria acidic odour and yeast typical odour of fermentation. Organic substances of albumin character sticking to the bottle walls may enhance propagation of microorganisms, especially at low storage temperatures.

Propagation of psychrophilous microorganisms can be efficiently restricted by washing thoroughly bottles and by adhering strictly to hygienic rules in bottling plants. From the results of experiments follows that 18°C cannot be accepted as an optimum storage temperature for sweetened mineral water, since propagation of microorganisms continues at lower temperatures, i. e. 17, 10 and even at 1°C.

Švorcová, L.: Vermehrung der psychrophilen und schleimbildenden Mikroorganismen in gesüßten alkoholfreien Getränken. Kvas. prům. 20, 1974, No. 2, S. 35—41.

Es wurde die Vermehrung der psychrophilen und schleimbildenden Mikroben im Saccharose-haltigen Milieu und in diesem mit organischen Substanzen bereicherten Milieu unter aeroben sowie auch anaeroben Bedingungen und bei den Temperaturen von 1, 10, 17, 25°C verfolgt. Die Vermehrung der Bakterien wurde in allen Fällen festgestellt. Die niedrigeren Temperaturen hatten eine Verlängerung der lag- und log-Phase der Häufigkeitskurve zu Folge. Ihr Verlauf war bei den Temperaturen von 25 und 17°C fast gleich, bei 10°C

wurde das Maximum zwei Tage später, d. i. am 7. Tag der Inkubation erreicht, bei der Temperatur von 1°C war die erreichte Menge um zwei Zahlenorden geringer, zwischen dem 5. und 13. Tag der Inkubation und das Maximum — 10^6 Zellen — wurde erst am 36. Tag der Inkubation erreicht. Der Einfluss der organischen Substanzen machte sich bei der Inkubation unter ungünstigen Bedingungen, d. h. bei niedrigen Inkubationstemperaturen, geltend. Bei der optimalen Temperatur wurde kein Unterschied zwischen den einzelnen Proben beobachtet. Der Unterschied zwischen der aeroben und anaeroben Kultivation zeigte sich deutlich bei den Temperaturen von 1 und 10°C; in dem anaeroben Milieu wuchs das Schimmelpilz-Mycelium, wodurch offensichtlich die Vermehrung der sonstigen Mikroben verhindert wurde. In der Lösung wurde eine mässige Senkung der Refraktion und des pH festgestellt. In den übrigen Proben verlief das Absinken der Refraktion und des pH wesentlich schneller, was offensichtlich durch den Einfluss der Assimilation der Zucker durch die psychrophilen Mikrobe verursacht wurde. Wenn der Metabolismus bis zu Ende verlief, wurde eine pH-Absenkung bis um 0,9 festgestellt. Bei dem ausgedehnten Wachstum des Schimmelpilz-Myceliums in den Proben wurde ein Apotheken- bis Phenolgeruch deutlich, bei Vermehrung der Bakterien ein saurer Geruch, beim Auftreten von Hefen ein Geruch nach Gärung. Die organischen Substanzen von Eiweisscharakter, die an den Flaschenwänden haftenbleiben, können besonders während der Lagerung bei niedrigen Temperaturen die Vermehrung der Mikroorganismen fördern.

Die Vermehrung der psychrophilen Bakterien kann durch die konsequente Einhaltung der Hygiene bei der Abfüllung des gesüßten Mineralwassers und durch die vollkommene Reinheit der Flaschen gehemmt werden. Aus den beschriebenen Versuchen und Untersuchungen resultiert der Schluss, dass die Temperatur von 18°C nicht als Grenztemperatur für die Lagerung gesüßter Mineralwässer betrachtet werden kann, denn auch noch bei den Temperaturen von 17 und 10°C und sogar auch 1°C wurde die Vermehrung von Bakterien festgestellt.