

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor SOČ: 7. Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství**

**Inhibující prostředí potravinových hub**

**Jakub Krutský**

**Kraj: Praha**

**Praha 2015**



# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor SOČ: 7. Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství**

**Inhibující prostředí potravinových hub**

**Inhibiting environment of food fungal contaminants**

**Autor:** Jakub Krutský

**Škola:** Gymnázium, Praha 2, Botičská 1  
Botičská 1, 128 01 Praha 2

**Kraj:** Praha

**Konzultant:** Mgr. Petr Šíma  
Mgr. Ondřej Koukol, Ph.D.  
RNDr. Alena Kubátová, CSc.

**Praha 2015**



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze podklady (literaturu, projekty, SW atd.) uvedené v seznamu vloženém v práci SOČ.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Praze dne 18. 3. 2015

.....  
Jakub Krutský



## **Poděkování**

V první řadě děkuji svému školiteli Mgr. Petru Šímovi za trpělivou pomoc s tvorbou této práce. Dále externím školitelům z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze panu Mgr. Ondřeji Koukolovi, Ph.D., a paní RNDr. Aleně Kubátové, CSc., za odbornou pomoc a poskytnuté vybavení. Děkuji panu Mgr. Michalu Drápalíkovi za pomoc s angličtinou a v poslední řadě paní Haně Kváčové za poskytnutí pracovních prostor.





## **Anotace**

Cílem práce je ověřit vhodnost ochranných faktorů proti potravinovým houbám. V práci ověřuji vliv tří konzervačních látek, ale také teploty, na růst potravinových hub. Obecně lze říci, že většina ochranných faktorů splňuje svůj účel, avšak v některých případech konzervační látky spíše růst houby podpořily.

Klíčová slova: potravinové houby, konzervační látky

## **Annotation**

The aim of this work is to evaluate the effectiveness of protective measures used to prevent the fungal contamination of food. I compare the effectiveness of three preservatives, as well as temperature, in inhibiting the growth of such fungi. In general, the preservatives did indeed work however in several cases they actually stimulated the fungal growth.

Key words: food fungal contaminants, preservatives



## Obsah

Úvod .....	10
1 Přehled literatury .....	11
1.1 Houby na potravinách.....	11
1.2 Taxonomie .....	11
1.2.1 Ascomycota.....	11
1.2.2 Zygomycota.....	12
1.3 Stavba buněk hub .....	12
1.4 Rozmnožování .....	13
1.4.1 Pohlavní.....	13
1.4.2 Nepohlavní .....	14
1.5 Výskyt.....	14
1.5.1 Substrát .....	14
1.5.2 Prostředí .....	15
1.6 Význam pro člověka.....	16
2 Metodika.....	18
2.1 Houby .....	18
2.2 Zkoumané faktory .....	18
2.3 Provedení pokusu.....	18
3 Výsledky a diskuse .....	20
3.1 <i>Mucor plumbeus</i> .....	20
3.2 <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	21
3.3 <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	22
3.4 <i>Aspergillus acidus</i> .....	23
3.5 Vliv teploty a konzervačních látek .....	23
Závěr.....	25
Seznam použité literatury.....	26
Seznam obrázků.....	27
Seznam grafů.....	28
Seznam tabulek.....	29
Přílohy .....	30

## Úvod

Tato práce pojednává o vláknitých mikroskopických houbách kontaminujících potraviny. Tématem jsou podmínky pro růst těchto hub. Podstatné je zjistit, v jakých podmínkách jsou tyto houby ještě schopné růst. To nám umožní zjistit, jak a kde skladovat potraviny, abychom zabránili jejich kontaminaci houbami. Houby i v dnešní době znehodnocují potraviny, které člověk skladuje, proto je velmi důležité pochopit nároky těchto organismů a díky získaným vědomostem zabránit ztrátě potravin.

Toto téma jsem si vybral, neboť mě uchvacují mikroorganismy, které nesmírně ovlivňují život lidí a všech dalších organismů. Ačkoliv jsou poutavější kladné stránky těchto organismů, rozhodl jsem se zaměřit na stránku opačnou, jejímž pochopením lze pomoci lidem. Nechci věřit obecnému přesvědčení, že potraviny stačí uložit do ledničky, neboť si myslím, že život těchto organismů je mnohem složitější a že existuje mnoho faktorů, které ho ovlivňují.

Otestuji různé faktory na různých potravinových houbách, z čehož následně určím, jaké prostředky použít k maximální inhibici růstu hub na potravinách. Cílem práce je najít optimální konzervační látku a teplotní faktor, které povedou k největšímu potlačení růstu hub na potravinách.

# 1 Přehled literatury

## 1.1 Houby na potravinách

Mezi houby kontaminující potraviny obecně řadíme kvasinky a vláknité mikroskopické houby, což jsou heterotrofní eukaryotní mikroorganismy patřící do říše Fungi (houby). (1)

Houby patří mezi Opisthokonta. Jejich zařazení však bylo doposud velmi nejasné. Mají mnoho společných znaků s rostlinami, například buněčnou stěnu nebo nepohyblivost, díky čemuž byly dlouhou dobu řazeny mezi rostliny. Dnes je však na základě sekvenování rRNA prokázána větší příbuznost s živočichy, se kterými mají společnou zásobní látku glykogen nebo neschopnost fotosyntetizovat. (2)

## 1.2 Taxonomie

V následujícím přehledu jsou hlavní taxonomické skupiny se zástupci kontaminujícími potraviny. Veškerá taxonomická jména jsou převzata z internetové stránky Biolib. (3)

### 1.2.1 Ascomycota

V druhově nejpočetnějším oddělení Ascomycota (vřeckovýtrusé houby) nalezneme významné pododdělení Taphrinomycotina, s třídou Schizosaccharomycetes. Do této třídy patří významné kvasinky jako *Schizosaccharomyces octosporus* (kvasinka osmivýtrusá). (2)

Další pododdělení Saccharomycotina, obsahuje jedinou třídu Saccharomycetes, jejíž zástupce nazýváme právě kvasinky. (2)

Třetí největší pododdělení Pezizomycotina, zahrnuje velmi významnou třídu Eurotiomycetes. Do této třídy patří asi nejznámější houba *Penicillium* (štetičkovec), která se hojně využívá v potravinářství. Za zmínku stojí také rod *Aspergillus* (kropidlák), který způsobuje černou hnilobu a rod *Monilia*, jež způsobuje charakteristickou hnilobu jablek. (2)

Rod *Aspergillus* tvoří převážně černé, hnědé nebo žluté kolonie, u kterých můžeme sledovat dobře vyvinuté vegetativní mycelium a konidie (viz obrázek 6). Nepohlavní rozmnožovací struktury jsou tvořeny hlavicovými konidiemi (viz obrázek 2). Kromě nepohlavního stádia můžeme sledovat také pohlavní s askomaty. (4)

Rod *Penicillium* tvoří většinou zelené a bílé kolonie, které tvoří dobře vyvinuté vegetativní mycelium (viz obrázek 7). Stavba kolonií je převážně sametová.

Nepohlavní rozmnožovací struktury jsou tvořeny charakteristickými větvenými konidiofory, které produkují jednobuněčné oválné konidie (viz obrázek 1). (4)

### 1.2.2 Zygomycota

Oddělení Zygomycota (spájkivé houby) s řádem Mucorales, obsahuje další zástupce významných potravinových hub. Řád Mucorales zahrnuje asi 130 druhů, mezi které patří *Mucor mucedo* (plíseň hlavičková), která je primárně koprofilní, ale vyskytuje se také na dalších organických substrátech, které rozkládá. Hlavními kontaminanty potravin jsou rod *Rhizopus* (kropidlovec) a rod *Choanephora*, ve kterém najdeme fytopatologicky významný druh *C. cucurbitarum*. (2)

Řád Mucorales tvoří převážně bílé kolonie. I zde můžeme sledovat dobře vyvinuté vegetativní mycelium (viz obrázek 8 a 9). Charakteristická jsou mnohosporová sporangia rodu *Rhizopus* (viz obrázek 4) a rodu *Mucor* (viz obrázek 3). (4)

### 1.3 Stavba buněk hub

Voda tvoří 65 až 83 % buněčné hmoty kvasinek. Sušina kvasinek je tvořena hlavně bílkovinami (50 %), glykogenem (30 %) a zbytek tvoří nukleové kyseliny (10 %) a polysacharidy (8 %). U oxidačních kvasinek se místo glykogenu vyskytuje tuk, který tvoří až 60 % sušiny. Množství bílkovin a glykogenu lze v kvasinkách regulovat například snížením obsahu dusíkatých živin v prostředí. Zvýšením obsahu glykogenu, lze například zvětšit trvanlivost droždí, které se vyrábí ze *Saccharomyces cerevisiae*. Z významných organických sloučenin stojí za zmínku vitamíny skupiny B, provitamin D a u některých rodů kvasinek též vitamín A. Na tyto vitamíny jsou bohaté především pivovarské kvasnice. V popelovině najdeme nejvíce oxidu fosforečného, dále sloučeniny draslíku, zatímco sloučeniny obsahující hořčík, vápník a sodík jsou zde zastoupeny velmi málo. (1)

Buněčná stěna vláknitých hub je složená z polysacharidů. Kromě chitinu a chitosanu u hub najdeme také látky podobné ligninu. V buňkách najdeme také bílkoviny a značné množství lipidů. Kromě lipidů buněčná stěna hub obsahuje též vosky (estery mastných kyselin a vyšších alkoholů), které jsou také odpovědné za špatnou smáčitelnost hyf. Stěny konidií hub mají také vysoký obsah barviv, čímž získávají nápadnou barvu. Nejčastější je zelená a bílá barva u rodů *Penicillium* a *Aspergillus*, ale také například hnědá až černá barva též u rodu *Aspergillus*. Tyto barviva mohou fungovat také jako ochrana, neboť barviva v některých sporách dokážou pohlcovat ultrafialové záření, které by mohlo spory poškodit. Cytoplazmatická membrána vláknitých hub je podobná membráně kvasinek, stejně jako cytoplazma. Jediný rozdíl stojící za zmínku je rezervní látka, kterou jsou lipidy, které v buňkách tvoří kapičky. (1)

Základní tvar buňky je udán její buněčnou stěnou, pod kterou najdeme cytoplazmatickou membránu, která řídí průchod látek z a do buňky. Jádro hub bývá velmi malé. Může obsahovat jedno, nebo více jadérek. Pokud buňka obsahuje mitochondrie, tak jich bývá veliké množství. V buňkách najdeme pravé vakuoly, Golgiho komplex, ribozomy, endoplazmatické retikulum. Naopak plastidy úplně chybí. Chloroplasty, chromoplasty, leukoplasty ani stigmata a jiné podobné struktury u hub nenajdeme. Naprosto chybějí fotosyntetické pigmenty. Občas jsou přítomny pouze karoteny, nebo xantofyly, které jsou však odlišné od barviv známých u rostlin. (2)

Mnoho zástupců hub tvoří pouze jediná buňka, která však nikdy není améboidní. Tato buňka je nejčastěji jednojaderná, ale může být i vícejaderná. U většiny zástupců je však vegetativní stélka tvořena myceliem, tedy souborem houbových vláken (hyf). Vývojově nejpokročilejší houby mají toto mycelium přehrádkované, tedy jedno vlákno je tvořeno několika buňkami. Tyto přehrádky nebývají celistvé. V jejich středu ve většině případů vzniká pór, který umožňuje průchod organel, dokonce i jader buněk. (2)

## **1.4 Rozmnožování**

### **1.4.1 Pohlavní**

Jako u všech organismů, i u hub, je pohlavní rozmnožování spojeno s plazmogamií, karyogamií a meiózou. S výjimkou oddělení Chytridiomycota nenajdeme v procesu pohlavního rozmnožování aktivně se pohybující buňky (planogamety, bičíkaté buňky). (2)

Po pohlavním procesu vznikají pohlavní spory. Ačkoliv známe homothalické rody hub, které nejsou pohlavně rozlišeny, většina je heterothalická, takže každý druh má kmeny pohlavního typu + a -. U zástupců oddělení Chytridiomycota jsou samčí a samičí orgány dokonce morfologicky odlišeny. (1)

Zygospory vznikají po splynutí dvou pohlavně oddělených gametangií, u kterých dojde ke gametangiogamii (spájení). Vzniká zygospora, což je diploidní, silně obalená buňka. Při klíčení dojde k meióze. Jedno z jader se následně dělí mitózou, ostatní zanikají. Ze zygospory následně vyroste sporangiofor se sporangiem, ve kterém jsou nepohlavní haploidní spory. Zygospory a tento typ rozmnožování najdeme pouze u oddělení Zygomycota. (1)

Askospory vznikají po 8 ve vřecku (asku), které je ojedinelé u oddělení Ascomycota. Po srůstu dvou hyf dojde k tvorbě dikaryotických (dvoujaderných) hyf. V této dvoujaderné buňce dochází ke karyogamii za vzniku diploidního jádra, které se následně dělí meiózou. Vznikají 4 haploidní jádra, která se dělí mitózou,

čímž se vytvoří základ pro 8 askospor ve vřecku. Z druhotně srostlého pletiva (plektenchymu) vzniká plodnice, ve které jsou vřecky uložena v hymeniu. (1)

### **1.4.2 Nepohlavní**

Nepohlavní rozmnožování je velmi dominantní způsob reprodukce. Cyklus rozmnožení může proběhnout několikrát za vegetační sezonu, čímž vzniká mnoho jedinců, kteří jsou důležití hlavně u parazitických druhů. Za nepohlavní rozmnožování považujeme dělení buněk, fragmentaci hyf nebo stélky a hlavně tvorbu nepohlavních spor. Konidie jsou nejhojněji se vyskytující druh těchto spor. (2)

Dělení buněk je nejhojnější u kvasinek, které se vegetativně rozmnožují pučením (viz obrázek 5). Při pučení se mateřská buňka začne protahovat a vzniká pupen, což je vznikající dceřiná buňka. Dochází k dělení organel, které se rovnoměrně rozprostřou v cytoplazmě. Jádro se mitoticky rozdělí a mezi jádry se začne uzavírat kanálek cytoplazmatickou membránou. Přibližně po dvou hodinách se dceřiná buňka oddělí. V ojedinělých případech dceřiná buňka zůstává propojená s buňkou mateřskou a tvoří buněčné svazky. (1)

Nejčastěji nepohlavní rozmnožování probíhá prostřednictvím konidií, které dělíme na několik druhů. Hojný je thalický typ, při kterém spory (konidie) vznikají z již existujícího vlákna houby, které se rozdělí přehrádkami. Tyto přehrádky následně fragmentují a vznikají jednotlivé jednojaderné buňky. (2)

Druhým hojným druhem konidií je blastický typ, při kterém konidiofory vznikají pučením podobným procesem z hyfy. (4)

## **1.5 Výskyt**

### **1.5.1 Substrát**

Podle ekologie rozeznáváme houby mykorhizní, parazitické, saproparazitické a saprotrofní. Nejvýznamnější jsou houby saprotrofní. Veškerou organickou hmotu rozkládají na jednoduché látky, někdy dokonce až na základní anorganické sloučeniny. Štěpení jim umožňují enzymy, například celulázy štěpící celulózu, nebo ligninolytické enzymy štěpící lignin. Houby jsou jediné organismy schopné štěpit složitou vysokomolekulární látku – lignin. Proto si naši pozornost zaslouží houby způsobující bílou hnilobu, které se starají o rozklad dřeva. (5)

Houby jsou rozšířené po celém světě. Mohou žít v půdě, ve sladkých a dokonce i slaných vodách. Tabulka z knihy od profesora Ostrého (6) ukazuje některé zástupce hub, kteří rostou na různých substrátech, a poukazuje na substráty, na kterých těchto hub najdeme nejvíce. (2)



Tabulka 1: Základní ekologické skupiny mikroskopických hub (6)

SKUPINA	PODSKUPINA	ZÁSTUPCI
Půdní		V půdě najdeme zástupce oddělení Ascomycota, Zygomycota a Basidiomycota.
Na rostlinných zbytcích	Dřevní	Většina zástupců dřevních hub patří k oddělení Ascomycota a Basidiomycota.
	Na bylinných zbytcích	Houby z oddělení Basidiomycota a Ascomycota.
Se zvláštními ekologickými nároky	Koprofilní	Houby schopné růst pouze na exkrementech patří do oddělení Zygomycota a Ascomycota.
	Anthrakofilní	Pouze několik desítek hub z oddělení Ascomycota patří k zástupcům, kteří rostou výhradně na spáleništích.
	Keratofilní	Houby rozkládající keratin patří k zástupcům oddělení Ascomycota.
	Bez dostatku vody	Potravin, a to i suché, jsou vhodné k růstu mikroskopických hub. Významné zástupce najdeme v oddělení Ascomycota, Deuteromycota a Zygomycota.
Parazitické	Fytopatogenní	V oddělení Ascomycota a Basidiomycota najdeme zástupce, kteří vyvolávají choroby rostlin.
	Zoopatogenní	Houby z oddělení Ascomycota hojně parazitují na hmyzu a u člověka způsobují dermatomykózy (čeleď <i>Gymnoascaceae</i> ) a alergická onemocnění způsobené spory hub (rod <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i> ).
Žijící ve vodě		Chytridiomycota, nebo někteří zástupci oddělení Ascomycota mají část vývojového cyklu ve vodním prostředí.

### 1.5.2 Prostředí

Teplota prostředí je asi nejdůležitější faktor ovlivňující život hub. Ideální teplotu nelze určit, neboť každá houba je uzpůsobena jinému prostředí a jedna samotná houba může mít velice široké teplotní optimum potřebné k růstu, k množení nebo k tvorbě mykotoxinů. Většinou je smrtící teplota okolo 65 °C po dobu 10 minut, která zabíjí buňky a spory většiny hub. Tento proces nazýváme pasterizace. Naopak nízké teploty houby moc neusmrcují. Při pomalém zmrazení sice mohou vznikající krystalky vody poničit buňky hub, ale k jejich úplnému zničení

nedochází. Při teplotách okolo  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  dochází k zastavení metabolické aktivity hub, avšak po rozmrazení jsou opět schopné začít růst. (1)

Většina hub se vyskytuje v mírně kyselém prostředí. Přesto to jsou jedny z organismů, které mají nejširší rozmezí hodnot pH, v kterém jsou schopny růst (viz tabulka 2). (4)

Tabulka 2: Obecné charakteristiky pro růst mikromycetů a produkci mykotoxinů v potravinách (6)

Faktor	Růst	Produkce mykotoxinů
Teplota	$-12\text{ až }55\text{ }^{\circ}\text{C}$	$4\text{ až }40\text{ }^{\circ}\text{C}$
pH	1,7 až 10	2,5 až 8 optimálně: 5 až 7
Vliv solí	do 20 % NaCl	do 14 % NaCl
Vliv cukrů	do 50 % sacharózy	do 50 % sacharózy

Houby jsou organismy, jejichž potřeba vody je opět velmi rozdílná. Kvasinky většinou vyžadují velké množství vody, ačkoliv jsou známy druhy, které se bez ní obejdou (například kvasinka *S. cerevisiae*, která způsobuje kvašení medu). Vlákňité houby naopak nevyžadují moc vody, ačkoliv jsou známy druhy, které se bez velkého množství vody neobejdou (např. rod *Penicillium*). (1) (4)

Houby jsou také poměrně dosti odolné proti elektromagnetickému záření. Některé kvasinky díky karotenoidním barvivům odolávají účinkům ultrafialového světla. Proti silnému mutagennímu Roentgenovu záření a  $\gamma$  záření však odolné nejsou. Zvýšení tlaku na 10 až 20 MPa vede ke zpomalení rozmnožování, na 30 až 40 MPa k zastavení rozmnožování. (1)

## 1.6 Význam pro člověka

V přírodě mají saprotrofní houby nezastupitelný význam právě díky jejich schopnosti rozkládat organické látky na jednoduché nebo základní anorganické látky. Tím zajišťují koloběh látek v přírodě a umožňují obnovu humusu. (7)

Známe několik druhů přímo jedlých hub. V potravinářství se ale houby využívají i pro jiné účely. Kvasinky z třídy *Saccharomycetes* se využívají pro jejich schopnost zkvašovat cukry na etanol a oxid uhličitý. *Saccharomyces cerevisiae* se uplatňuje jako kvasinka pekařská, lihovarská a vinařská. Z třídy *Schizosaccharomycetes* stojí za zmínku kvasinka *Schizosaccharomyces octosporus*, která kvasí cukry ve vinných hroznech. K výrobě plísňových sýrů se využívají *Penicillium camemberti* a *Penicillium roqueforti*. Za průmyslovou produkcí kyseliny citronové stojí šlechtěné kmeny *Aspergillus niger*. Lidé využívají také další látky, které houby tvoří. Mezi nejproslulejší patří penicilín, který získáváme z houby *Penicillium*

*chrysogenum (notatum)*. Za objevem této látky stojí Alexandr Fleming a Howard Florey, jimž vděčíme za dodnes hojně používané antibiotikum. (1)

Houby však také způsobují problémy, jako jsou onemocnění rostlin, zvířat, ale i lidí. Mimo jiné způsobují materiálové škody, protože jejich enzymatické vybavení jim umožňuje využít k výživě substráty jako nábytek, podlahové krytiny, zdi a další. Výrazné je znehodnocování potravin. Buďto dojde ke snížení hodnoty potravy nebo k její kontaminaci a nepoživatelnosti. Za tím stojí sekundární metabolity hub - mykotoxiny. (6)

Dnes známe přibližně 300 mykotoxinů, produkované přibližně 350 druhy hub, které dělíme podle toxicity k cílovým orgánům. Mykotoxiny postihují hlavně játra, ledviny a nervovou soustavu. Mezi smrtelné mykotoxiny patří aflatoxiny, které jsou velmi nebezpečné také díky možnostem přenosu. Nejenom, že se dostanou do našeho těla přímo snědením potravy kontaminované houbou *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*, ale toxin nás může ohrožovat i druhotně, například vypitím mléka od krávy, která sežrala napadené krmivo. Aflatoxiny negativně působí na játra, ve kterých může dojít až k tvorbě karcinomů. Mezi další karcinogenní toxiny patří sterigmatocystin a fumonisiny. Běžně se setkáváme také s námelovými alkaloidy, nebo patulinem, který produkují houby *Penicillium patulinum* a *Penicillium expansum*, které se běžně vyskytují na ovoci a zelenině. (8)

## 2 Metodika

Cílem série pokusů bylo zjistit, jaká kombinace teploty a konzervační látky je nejlepší k ochraně před houbami kontaminujícími potraviny.

### 2.1 Houby

Pro svůj experiment jsem zvolil dva zástupce z oddělení Zygomycota a dva z oddělení Ascomycota. Všechny houby pocházejí ze Sbírký kultur hub CCF (Culture Collection of Fungi, Prague, Czech Republic). První houbou z oddělení Ascomycota byl *Aspergillus acidus* s číslem kmene CCF 3984 a druhou z tohoto oddělení bylo *Penicillium chrysogenum* s číslem kmene CCF 3209. Z oddělení Zygomycota jsem zkoumal *Mucor plumbeus* s číslem kmene CCF 2626 a *Rhizopus stolonifer* s číslem kmene CCF 3225. S každé z hub jsem vytvořil mikroskopický preparát s pomocí kyseliny mléčné a Melzerova činidla a pozoroval ho v mikroskopu Olympus BX51. Fotografie jsem pořizoval pomocí kamery Olympus DP72.

### 2.2 Zkoumané faktory

Každá z hub byla vystavena dvěma faktorům. Prvním byla teplota, která byla v prvním případě 8°C, což je průměrná teplota v lednici, v druhém případě byla 23 °C, jakožto běžná pokojová teplota. Druhým faktorem byla konzervační látka přidaná do malt extract agaru (MEA), tedy agaru se sladovým extraktem. První sada Petriho misek byla kontrolní, tedy bez přidané látky. Další tři sady obsahovaly buď cukr (sacharózu), sůl (chlorid sodný), nebo kyselinu benzoovou (E210).

Tyto tři konzervační látky jsem vybral jakožto velmi známé a využívané zástupce těchto látek. Sacharóza je významná konzervační látka marmelád, chlorid sodný se již dlouho využívá ke konzervaci masa, nebo zeleniny. Jako zástupce moderních konzervačních látek jsem zvolil kyselinu benzoovou. (8)

### 2.3 Provedení pokusu

V první řadě jsem připravil a popsal 160 Petriho misek (s průměrem 85 mm). Počet odpovídá všem kombinacím utvořeným ze 4 druhů hub, 2 teplot, 3 ošetření, 1 kontroly a každá z kombinací v 5 opakováních. Poté jsem připravil agarové půdy. Na kontrolní sadu misek byl použit čistý malt extract agar (MEA). Do druhé sady jsem přidal chlorid sodný o koncentraci 60 g/kg, což odpovídá koncentraci chloridu sodného v nakládané zelenině. Třetí sada obsahovala sacharózu, kterou jsem přidal v koncentraci 561 g/kg, což je celkové množství sacharózy v jahodové marmeládě. Samotný agar obsahuje také sacharózu, tudíž jsem do jednoho litru agaru přidával o 15 g cukru méně. Do poslední sady jsem přidal kyselinu benzoovou o koncentraci 150 mg/kg, u které jsem musel brát ohled na přípustné

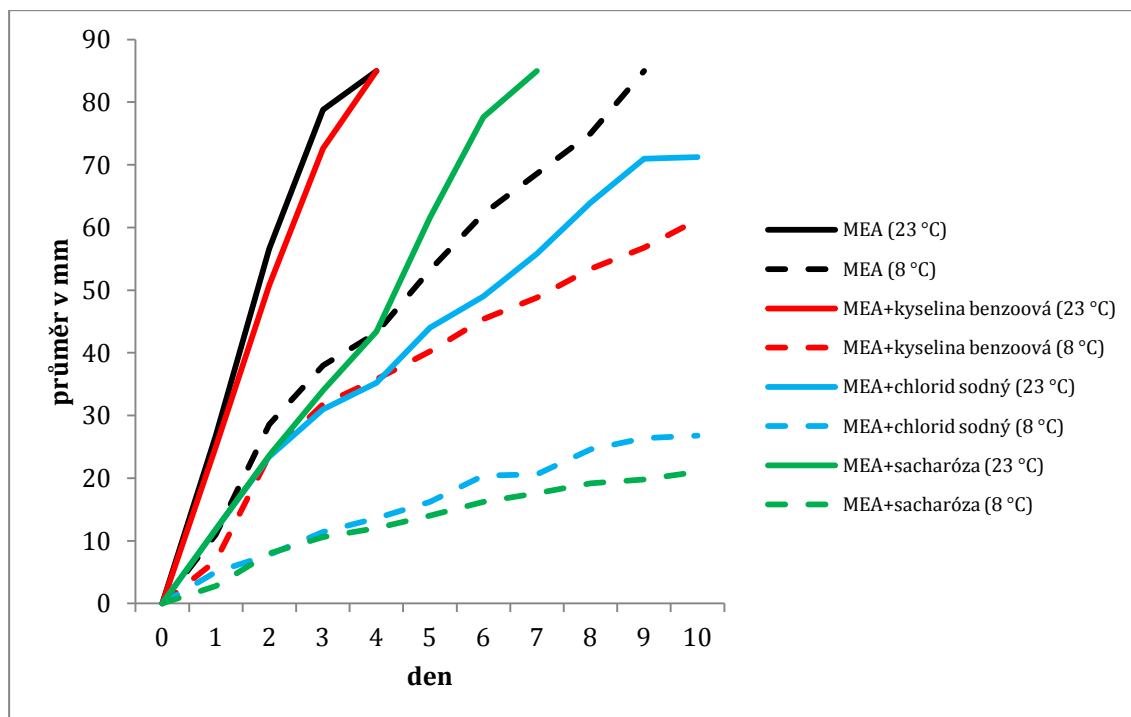
hodnoty v potravinách. Po ztuhnutí agarů v miskách, jsem ve 4 zkumavkách vytvořil suspenzi z řidšího agarů a spor hub. Tuto suspenzi jsem poté očkoval do středu každé misky, která byla pro danou houbu připravena. Polovinu misek jsem nechal při teplotě 23 °C a druhou jsem udržoval při teplotě 8 °C. Po dobu 50 dní jsem každý den měřil průměr kolonie (tabulka naměřených hodnot je na přiloženém CD). Po ukončení měření jsem zpracoval data jako závislost průměru kolonie na čase, z čehož jsem zjistil, jaké faktory ovlivňovaly houby nejvíce. (8)

### 3 Výsledky a diskuse

V první řadě je dobré všimnout si rychlosti růstu jednotlivých hub (v grafu je zobrazena průměrná hodnota z pěti opakování dané kombinace). Nejrychleji rostoucí houbou byl *Rhizopus stolonifer*. Většinou dorostl okraje misky během pěti dnů. Pouze v prostředí se solí a sníženou teplotou nedorostl okraje ani po 50 dnech. *Mucor plumbeus* dorůstal k okraji misky do 13 dnů. Pouze ve dvou případech nedorostl okraje misky po 50 dnech, ale na rozdíl od houby *Rhizopus stolonifer* byla kolonie výrazně blíže okraji misky. U houby *Penicillium chrysogenum* dorostly přibližně za 20 dnů k okraji misky pouze tři kolonie. Ostatní po 50 dnech zarostly přibližně polovinu Petriho misky. Nejrozdílnějších výsledků dosáhla houba *Aspergillus acidus*. Ve dvou případech dorostla k okraji do dvou dnů, v dalších dvou do 25 dnů a čtyři ostatní zůstaly od počátku růstu na 5 mm.

Snížení teploty se ukázalo jako nejvíce limitující faktor pro všechny houby. Ačkoliv najdeme příklady hub při 23 °C, které rostly pomaleji, většina z hub na sníženou teplotu reagovala nejvíce. Chlorid sodný se ve dvou případech ukázal jako limitující, ale ve dvou růst houby spíše podpořil. Sacharóza se opět ve většině případů ukázala jako limitující faktor, ale u houby *Penicillium chrysogenum* růst houby spíše podpořila. Kyselina benzoová limitovala většinu hub velmi mírně.

#### 3.1 *Mucor plumbeus*

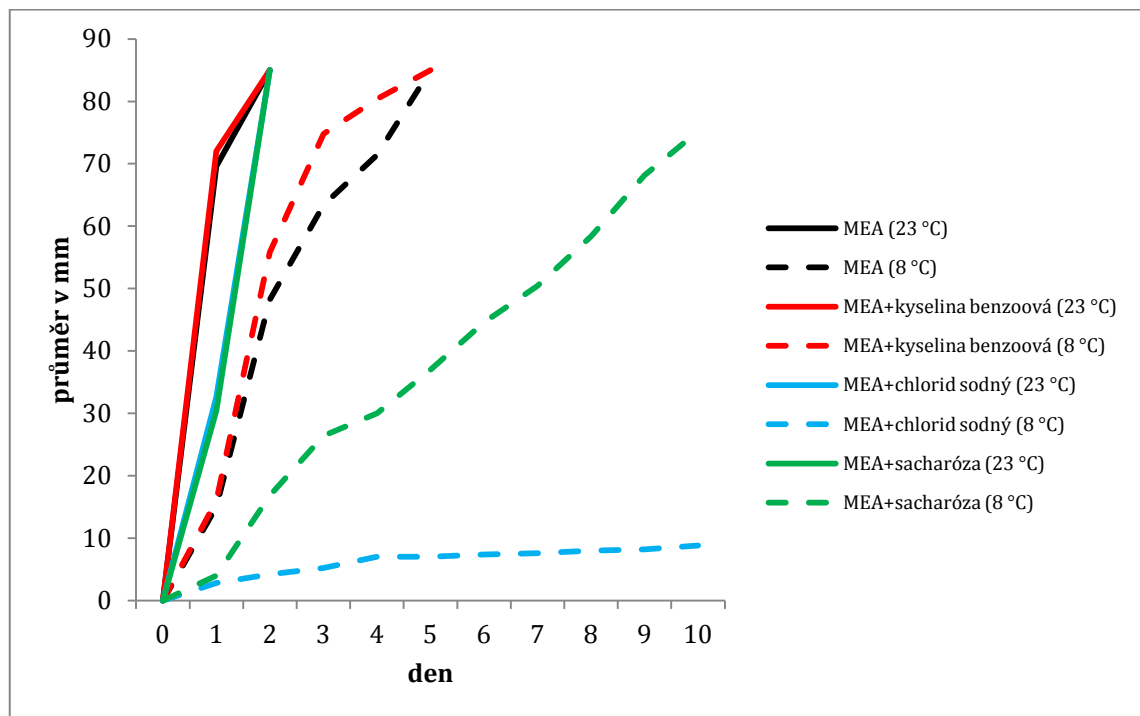


Graf 1: Vliv faktorů na houbu *Mucor plumbeus*

Snížená teplota se ukazuje jako nejvíce limitující faktor pro *Mucor plumbeus* (viz graf 1), ačkoliv chlorid sodný při 23 °C omezil houbu více, než kontrolu se sníženou

teplotou. Při 23 °C působily všechny přidané látky inhibičně, ačkoliv s kyselinou benzoovou nakonec houba dorostla k okraji misky stejně jako kontrola. Nejvíce limitující pro *Mucor plumbeus* byla kombinace sacharózy a teploty 8 °C.

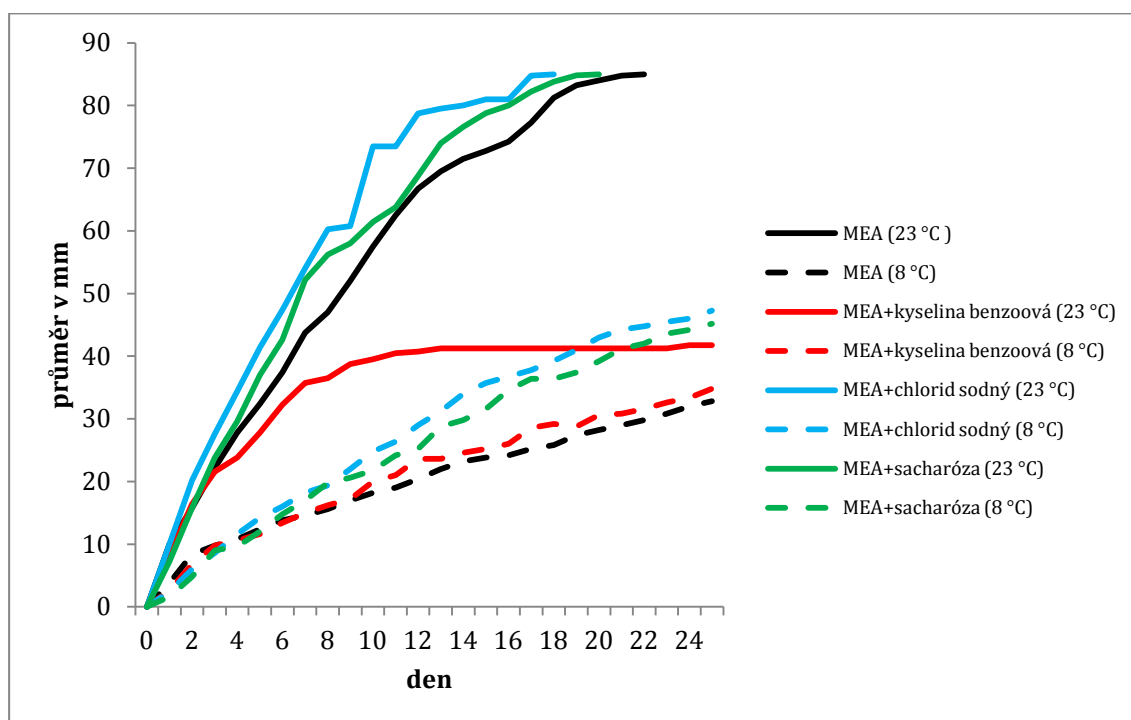
### 3.2 *Rhizopus stolonifer*



Graf 2: Vliv faktorů na houbu *Rhizopus stolonifer*

Na *Rhizopus stolonifer* má největší vliv snížená teplota (viz graf 2). Kyselina benzoová při teplotě 23 °C i 8 °C spíše růst houby podporuje. Nejvíce limitující pro *Rhizopus stolonifer* byla kombinace chloridu sodného a teploty 8 °C.

### 3.3 *Penicillium chrysogenum*

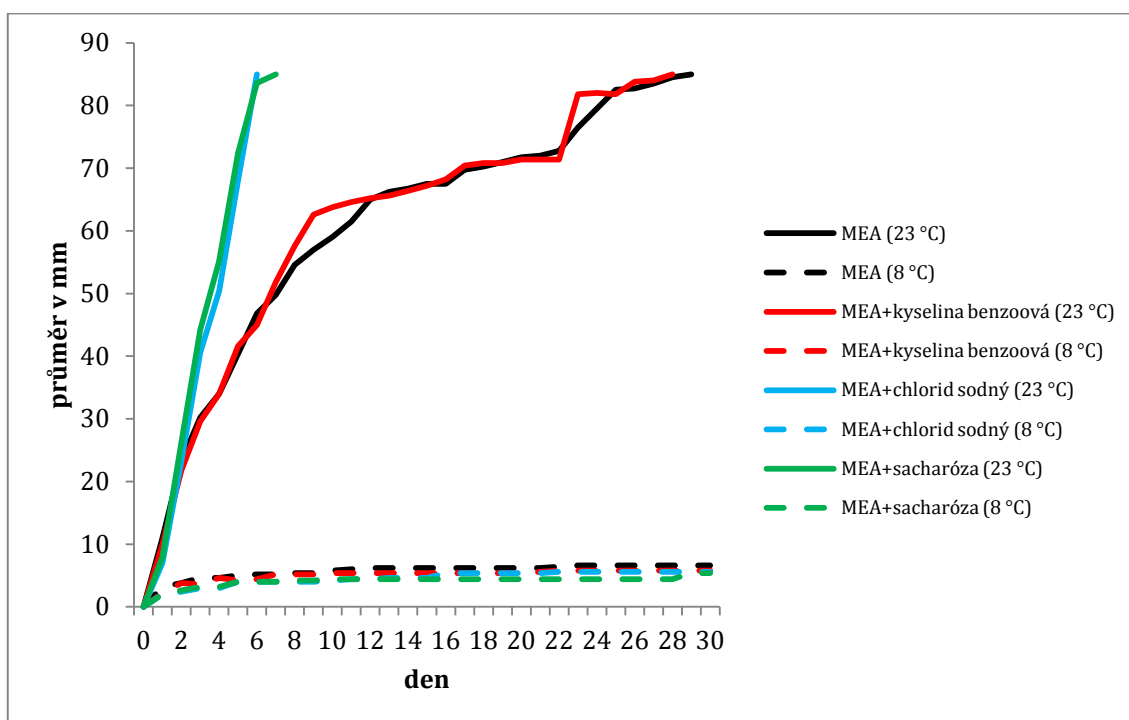


Graf 3: Vliv faktorů na houbu *Penicillium chrysogenum*

Největší vliv na růst houby *Penicillium chrysogenum* můžeme pozorovat v chladném prostředí (viz graf 3). Za zmínku ale stojí, že sacharóza, chlorid sodný i kyselina benzoová růst houby při 8 °C oproti kontrole urychlily, kyselina benzoová jen nepatrně. Při 23 °C je velmi inhibiční kyselina benzoová, která je dokonce účinnější než kombinace sacharóza při 8 °C a chlorid sodný při 8 °C. I při 23 °C sacharóza a chlorid sodný růst houby spíše urychlily. Nejvíce limitující pro *Penicillium chrysogenum* je snížená teplota. Ostatní konzervační látky růst překvapivě spíše urychlily.



### 3.4 *Aspergillus acidus*



Graf 4: Vliv faktorů na houbu *Aspergillus acidus*

Z grafu je patrné, že na houbu *Aspergillus acidus* má největší vliv snížená teplota (viz graf 4). Naopak chlorid sodný a sacharóza za pokojové teploty růst houby podpořily. Kyselina benzoová při 23 °C výrazný vliv na houbu neměla.

### 3.5 Vliv teploty a konzervačních látek

Snížená teplota výrazně ovlivňuje růst hub. Každá z hub má poměrně úzké rozmezí optimální teploty. Minimální a maximální teploty však mohou jít i do extrému, avšak houby v těchto případech rostou velmi pomalu a většinou neprodukují žádné mykotoxiny. (4)

Vliv kyseliny benzoové nelze jednoznačně potvrdit. Konzervační vlastnosti se projeví pouze u houby *Penicillium chrysogenum*, kde při 23 °C oproti kontrole kolonie s kyselinou benzoovou rostla výrazně pomaleji. Z literatury je patrné, že na *Aspergillus acidus* by tato koncentrace kyseliny benzoové neměla mít vliv, zatímco u ostatních by se nějaký vliv měl objevit. Inhibiční účinek by měla mít koncentrace 500 až 1000 mg/kg, což limit koncentrace v potravinách nezakazuje, ale chtěl jsem využít co nejmenší množství kyseliny. (8)

Vliv chloridu sodného je takový, že snižuje vodní aktivitu. Proto nelze určit koncentraci tak, aby inhiboval všechny houby, neboť potřeba vody jednotlivých druhů je rozdílná. V některých případech chlorid sodný snížil vodní aktivitu pod

optimální hranici, u některých hub ji mohl snížit na optimální hranici, čímž lze vysvětlit případy, kde houba s chloridem sodným rostla rychleji než kontrola. (8) (4)

I u sacharózy lze říci, že vliv dané koncentrace sacharózy bude u každého druhu houby rozdílný. Přesto jak píše Ostrý (6), koncentrace sacharózy nad 50 % by měla zpomalit růst všech hub. Tomu v mém pokusu neodpovídají výsledky u houby *Aspergillus acidus* a *Penicillium chrysogenum*.

## Závěr

V práci jsem zkoumal vliv teploty, chloridu sodného, sacharózy a kyseliny benzoové na růst hub *Aspergillus acidus*, *Penicillium chrysogenum*, *Mucor plumbeus* a *Rhizopus stolonifer*. Je patrné, že zásadní vliv na růst hub má teplota. V chladném prostředí (8 °C) se nejvíce zpomalil růst houby *Aspergillus acidus* o 95 % oproti kontrole za teploty 23 °C, nejméně u houby *Rhizopus stolonifer*, kde byl růst zpomalen pouze o 63 %. I přesto je skladování potravin v chladném prostředí velmi účinnou metodou ochrany proti houbám. Účinnost konzervačních látek je u jednotlivých hub velmi rozdílná. Chlorid sodný zpomalil růst v průměru o 48 %. Nejvíce u houby *Mucor plumbeus*, kde byl růst zpomalen o 71 % a nejméně u houby *Penicillium chrysogenum*, kde byl růst zpomalen pouze o 24 %. Sacharóza zpomalila růst v průměru o 45 %. Nejvíce u houby *Mucor plumbeus*, kde byl růst zpomalen o 67 % a nejméně u houby *Penicillium chrysogenum*, kde byl růst zpomalen o 25 %. Kyselina benzoová průměrně zpomalila růst o 44 %. Nejvíce u houby *Aspergillus acidus*, kde byl růst zpomalen o 71 % a nejméně u houby *Rhizopus stolonifer*, kde byl růst zpomalen pouze o 17 %.

Z výsledků je patrné, že nejvýraznější vliv má snížená teplota. V průměru je vliv snížené teploty 71 %. Konzervační látky působí na každou houbu v jiné míře. V průměru nejvíce inhibuje chlorid sodný, zatímco nejhorší výsledky má kyselina benzoová. Samotná konzervační látka nemá zásadní vliv na více druhů hub, proto je velmi výhodné kombinovat konzervační látky se sníženou teplotou, čímž můžeme konzervovat více druhů potravin, proti více druhům hub na delší dobu. Konzervační látku zvolíme jednoduše podle vhodnosti k dané potravíně.

## Seznam použité literatury

1. **Šilhánková, L.** *Mikrobiologie pro potravináře*. Praha : SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1983.
2. **Kalina, T. a Váňa, J.** *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Praha : Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1036-1.
3. **Zicha, O. a kol.** *BioLib*. [Online] 2014. [Citace: 26. 4. 2014.]  
<http://www.biolib.cz>.
4. **Malíř, F. a Ostrý, V. a kol.** *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno : Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003. ISBN 80-7013-395-3.
5. **Holec, J., Bielich, A. a Beran, M.** *Přehled hub střední Evropy*. Praha : Academia, 2012. ISBN 978-80-200-2077-2.
6. **Ostrý, V.** *Vláknité mikroskopické houby (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Praha : Státní zdravotní ústav, 1998. ISBN 80-7071-102-7.
7. **Baier, J.** *Co nevíme o houbách*. Praha : Artia a. s., 1993. ISBN 80-901443-4-9.
8. **Velíšek, J.** *Chemie potravin*. Tábor : OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-03-8.
9. **Masur.** *S. cerevisiae under DIC microscopy*. *Wikimedia Commons*. [Online] 2010. [Citace: 1. 1. 2014.]  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:S\\_cerevisiae\\_under\\_DIC\\_microscopy.jpg?uselang=cs](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:S_cerevisiae_under_DIC_microscopy.jpg?uselang=cs).
10. **Chumchalová, J., a další.** *Miniatlas mikroorganismů. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze*. [Online] 2008. [Citace: 18. 2. 2015.]  
<http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/obsah.htm>.

## Seznam obrázků

Obrázek 1: *Penicillium chrysogenum* (Melzerovo činidlo, 1600X zvětšeno, foto autora)

Obrázek 2: *Aspergillus acidus* (Melzerovo činidlo, 400X zvětšeno, foto autora)

Obrázek 3: *Mucor plumbeus* (kyselina mléčná, 1000X zvětšeno, foto autora)

Obrázek 4: *Rhizopus stolonifer* (kyselina mléčná, 100X zvětšeno, foto autora)

Obrázek 5: Kvasinka množící se pučením (9)

Obrázek 6: *Aspergillus niger* (CCF 1610, CYA, 5 dní, 25 °C) (10)

Obrázek 7: *Penicillium chrysogenum* (CCF 2878, CYA, 10 dní, 25 °C) (10)

Obrázek 8: *Mucor plumbeus* (CCF 2690, MEA, 6 dní, 25 °C) (10)

Obrázek 9: *Rhizopus stolonifer* (CCF 3225, MEA, 7 dní, 25 °C) (10)

## Seznam grafů

Graf 1: Vliv faktorů na houbu *Mucor plumbeus*

Graf 2: Vliv faktorů na houbu *Rhizopus stolonifer*

Graf 3: Vliv faktorů na houbu *Penicillium chrysogenum*

Graf 4: Vliv faktorů na houbu *Aspergillus acidus*

## **Seznam tabulek**

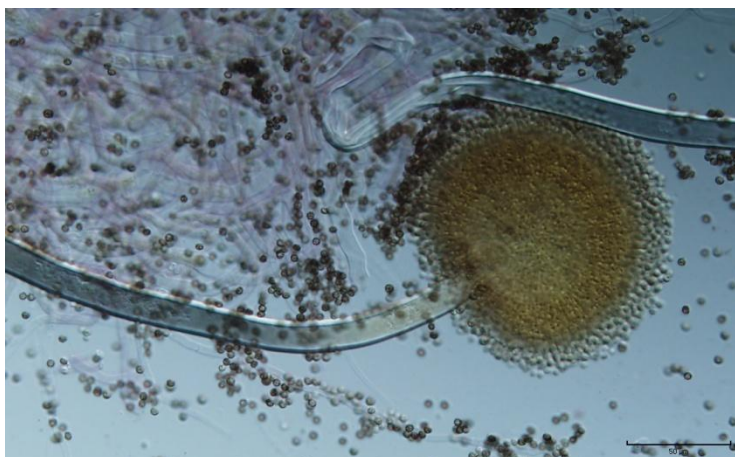
Tabulka 1: Základní ekologické skupiny mikroskopických hub (6)

Tabulka 2: Obecné charakteristiky pro růst mikromycetů a produkci mykotoxinů v potravinách (6)

## Přílohy



Obrázek 1: *Penicillium chrysogenum* (Melzerovo činidlo, 1600X zvětšeno, foto autora)



Obrázek 2: *Aspergillus acidus* (Melzerovo činidlo, 400X zvětšeno, foto autora)

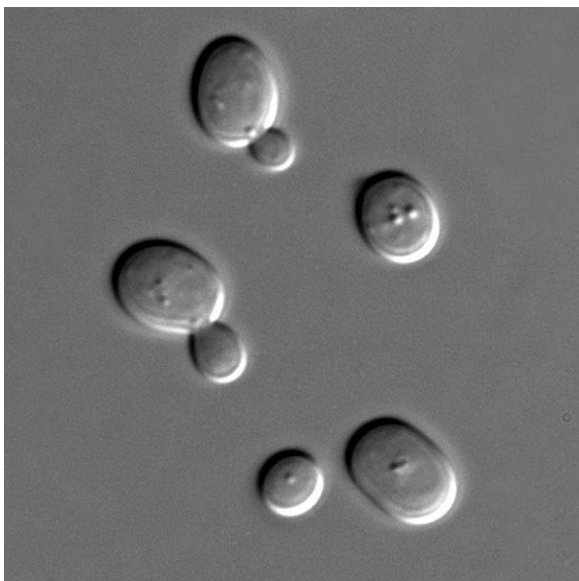


Obrázek 3: *Mucor plumbeus* (kyselina mléčná, 1000X zvětšeno, foto autora)

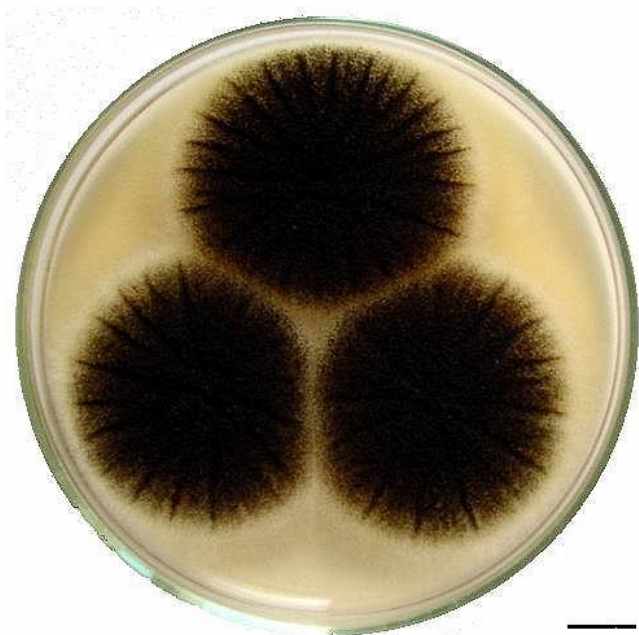




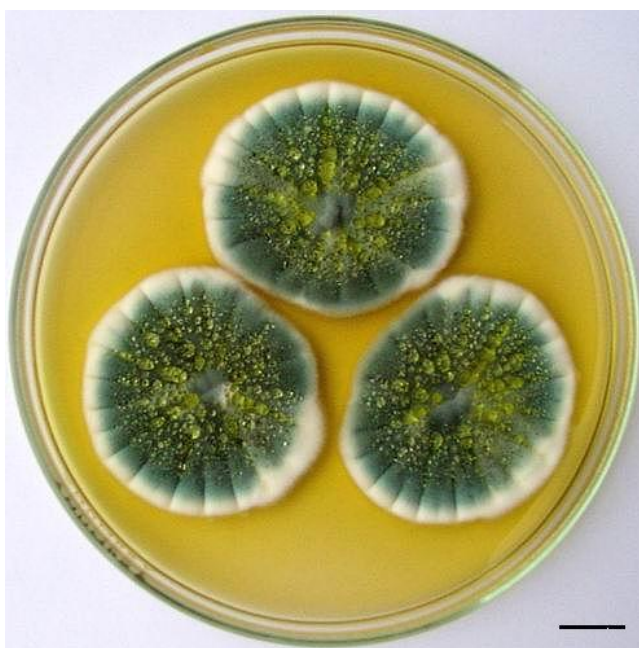
Obrázek 4: *Rhizopus stolonifer* (kyselina mléčná, 100X zvětšeno, foto autora)



Obrázek 5: Kvasinka množící se pučením (9)



Obrázek 6: *Aspergillus niger* (CCF 1610, CYA, 5 dní, 25 °C) (10)



Obrázek 7: *Penicillium chrysogenum* (CCF 2878, CYA, 10 dní, 25 °C) (10)



Obrázek 8: *Mucor plumbeus* (CCF 2690, MEA, 6 dní, 25 °C) (10)



Obrázek 9: *Rhizopus stolonifer* (CCF 3225, MEA, 7 dní, 25 °C) (10)