

Izolace a charakterizace sporotvorných tyčinek z potravin nepodporujících rozvoj mikroorganismů

Bc. Kristýna Floriánová

Diplomová práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Kristýna Floriánová
Osobní číslo: T22412
Studijní program: N0721A210004 Technologie potravin
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Izolace a charakterizace sporotvorných tyčinek z potravin nepodporujících rozvoj mikroorganismů

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

Vypracujte literární rešerši zaměřenou na výskyt mikroorganismů v potravinách nepříznivých pro jejich růst, zaměřte se na sporotvorné tyčinky a faktory, které mohou ovlivňovat jejich růst.

II. Praktická část

Z mikrobiologicky nerizikových potravin izolujte a dostupnými metodami identifikujte sporotvorné bakterie.

Provedte charakterizaci vybraných identifikovaných sporotvorných tyčinek.

Výsledky vyhodnoťte, diskutujte a formulujte závěry práce.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] BOURDICHON, F., BETTS, R. et al. Processing environment monitoring in low moisture food production facilities: Are we looking for the right microorganisms? *Food Microbiology*, 356: 109351. 2021
- [2] CHITRAKAR, B., ZHANG, M., ADHIKARI, B. Dehydrated foods: Are they microbiologically safe? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59: 2734-2745. 2019
- [3] ALP, D., BULANTEKIN, O. The microbial quality of various foods dried by applying different drying methods: a review. *European Food Research and Technology*, 247: 1333-1343. 2021
- [4] LE MARC, Y., POSTOLLEC F. et al. Modelling the thermal inactivation of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. *International Journal of Microbiology*, 368: 109607. 2022
- [5] ICMSF – International Commission on Microbiological Specification for Foods. *Microorganisms in foods* 6. 2nd ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 2005
- [6] Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **1. ledna 2024**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 10. února 2024

PROHLÁŠENÍ AUTORKY DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Sporotvorné bakterie se běžně vyskytují v prostředí, odkud se mohou dostat i do potravin. Díky své schopnosti tvorby spor a přežívání nepříznivých podmínek mohou představovat významný kontaminant potravin a zároveň způsobovat alimentární onemocnění. Práce je zaměřena na problematiku výskytu sporotvorných bakterií v potravinách nepodporujících růst mikroorganismů, zejména v masových pomazánkách a lyofilizovaném ovoci. Uvedena je také problematika podmínek ovlivňujících růst, včetně faktorů virulence a antibiotické rezistence.

Cílem této práce bylo identifikovat mikroorganismy izolované z vybraných vzorků potravin. U všech sporotvorných tyčinek byla následně provedena jejich charakterizace.

V rámci této práce byly identifikovány grampozitivní tyčinky rodů *Bacillus*, *Cytobacillus*, *Fictibacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Priestia* či *Psychrobacillus*. Většina testovaných sporulátů rostla v teplotních podmínkách 25–40 °C. Izoláty často vykazovaly rezistenci k antibiotikům, zejména penicilinu, nicméně přítomnost genů rezistence k antibiotikům byla nižší, než se očekávalo. Nejčastěji detekovaným genem antibiotické rezistence pomocí PCR byl gen *norA*. Stejnou metodou byla u analyzovaných kmenů *B. cereus* zjištěna častá přítomnost genů virulence, zejména komplexů *nhe* a *cer*. Modifikovanou Christensenovou metodou byla také prokázána produkce biofilmu u většiny sporotvorných tyčinek.

Tato práce prokázala, že sporotvorné tyčinky jsou přítomné i v potravinářských výrobcích považovaných za mikrobiologicky nerizikové. Nesprávná manipulace s těmito potravinami tak může představovat potenciální riziko pro zdraví konzumenta.

Klíčová slova: sporotvorné tyčinky, masové pomazánky, lyofilizované ovoce, biofilm, antibiotická rezistence, faktory virulence

ABSTRACT

Sporotrophic bacteria are mainly found in the environment but can also enter food. Due to their ability to form spores, they can be a significant contaminant of food and cause alimentary diseases. This work focuses on the occurrence of spore-forming bacteria in foods that do not support growth, in particular meat spreads and freeze-dried fruit. Issues of conditions affecting growth, including virulence factors and antibiotic resistance, are also presented.

The aim of this work was to identify microorganisms isolated from selected food samples. Characterization was subsequently carried out for all the sporocarcinogenic rods.

The genera identified in this work were *Bacillus*, *Cytobacillus*, *Fictibacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Priestia* or *Psychrobacillus*. Most of the spore-forming bacteria tested grew under temperature conditions of 25-40 °C. The isolates often showed resistance to antibiotics, especially penicillin. The presence of antibiotic resistance genes was lower than expected. The most frequently detected antibiotic resistance gene by PCR was *norA*. The same method was used to detect the frequent presence of virulence genes. In the *B. cereus* strains were especially analysed the *nhe* and *cer* complexes. Biofilm production was also detected in most rods by the modified Christensen method.

This work demonstrated that spores are present also in food products considered to be microbiologically unsafe. Improper handling of these foods may therefore pose a potential risk to the health of the consumer.

Keywords: spores, meat spreads, freeze-dried fruit, biofilm, antibiotics, virulence factors

Ráda bych touto cestou poděkovala mé vedoucí paní prof. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za možnost zabývat se tématem, které mě zajímá a cenné rady, které mi pomohly při zpracování této diplomové práce. Ráda bych také poděkovala zaměstnancům mikrobiologické laboratoře Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za asistenci a vytvoření příznivého pracovního prostředí při praktickém zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, příteli, jeho rodině a přátelům, kteří mi byli velkou oporou nejen při psaní mé diplomové práce, ale i během celého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH SPOROTVORNÝCH MIKROORGANISMŮ	12
1.1 <i>BACILLUS</i> SPP.....	12
1.2 <i>CYTOBACILLUS</i> SPP.....	13
1.3 <i>FICTIBACILLUS</i> SPP.....	14
1.4 <i>LYSINIBACILLUS</i> SPP.....	14
1.5 <i>PAENIBACILLUS</i> SPP.....	15
1.6 <i>PRIESTIA</i> SPP.....	16
1.7 <i>PSYCHROBACILLUS</i> SPP.....	17
2 CHARAKTERISTIKA POTRAVIN NEPODPORUJÍCÍCH RŮST MIKROORGANISMŮ	18
2.1 TEPELNĚ OPRACOVANÉ MASNÉ VÝROBKY.....	18
2.1.1 Tepelné ošetření	18
2.2 SUŠENÉ OVOCE.....	20
2.2.1 Sušení	21
2.3 VLIV KONZERVACE NA MIKROORGANISMY.....	22
2.4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ BAKTERIÁLNÍ INAKTIVACI TEPEM.....	24
2.5 MECHANISMY PŘEŽITÍ NEPŘÍZNIVÝCH PODMÍNEK.....	26
2.6 VIRULENCE <i>BACILLUS CEREUS</i>	31
2.6.1 Toxiny	31
2.6.2 Antibiotická rezistence.....	34
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	35
CÍLE PRÁCE.....	36
3 MATERIÁL A METODIKA	37
3.1 POPIS VZORKŮ.....	37
3.2 POMŮCKY, ZAŘÍZENÍ A POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	37
3.3 PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ A ROZTOKŮ	39
3.4 IZOLACE A IDENTIFIKACE	40
3.4.1 Zhodnocení čistoty kultur	40
3.4.2 Izolace DNA.....	40
3.4.3 Amplifikace DNA genů pro sekvenaci 16S rRNA	41
3.4.4 Vizualizace DNA	42
3.4.5 Purifikace	42
3.4.6 Identifikace izolovaných mikroorganismů sekvenací produktů PCR.....	43

3.5	TESTOVÁNÍ Vlivu Působení Teploty na Růst.....	43
3.6	TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI NA ANTIBIOTIKA.....	44
3.6.1	Disková difúzní metoda	44
3.6.2	Detekce genů antimikrobiální rezistence pomocí PCR.....	45
3.7	DETEKCE GENŮ VIRULENCE POMOCÍ PCR.....	48
3.8	TESTOVÁNÍ TVORBY BIOFILMU.....	50
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	52
4.1	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ POMOCÍ SEKVENACE BAZÍ	52
4.2	TESTOVÁNÍ Vlivu Působení Teploty na Růst.....	53
4.3	TESTOVÁNÍ CITLIVOSTI NA ANTIBIOTIKA.....	61
4.3.1	Disková difuzní metoda	61
4.3.2	Detekce genů antimikrobiální rezistence pomocí PCR.....	70
4.3.3	Srovnání použitých metod testování antibiotické rezistence	74
4.4	DETEKCE GENŮ VIRULENCE	75
4.5	TESTOVÁNÍ TVORBY BIOFILMU.....	79
	ZÁVĚR	82
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	84
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	94
	SEZNAM OBRÁZKŮ	95
	SEZNAM TABULEK.....	96

ÚVOD

Čeď *Bacillaceae* začleňuje všudypřítomné aerobní či fakultativně aerobní, tyčinkovité, endospory produkující grampozitivní bakterie. Tyto sporotvorné tyčinky jsou široce rozšířeny v půdě, vodě a rostlinách, odkud se snadno šíří do potravin rostlinného původu a křížovou kontaminací do jiných potravin, jako je mléko, maso a masné výrobky. Tato rozmanitá skupina zahrnuje neškodné environmentální ale i patogenní druhy, kdy *B. cereus* je uváděn jako nejběžněji se vyskytující (Algammal et al., 2024; Osman et al., 2018).

Zároveň mají potenciál tvořit biofilmy v potrubí a zařízení z nerezové oceli, což představuje nebezpečí pro potravinářský průmysl jako hlavní zdroj kontaminace zařízení během zpracování potravin. Bakterie v biofilmu vykazují zvýšenou odolnost vůči antibiotikům a dezinfekčním prostředkům, což ztěžuje jejich eliminaci. Z tohoto důvodu je důležité při výrobě potravin dodržovat pravidla správné výrobní praxe a platné hygienické předpisy (Osman et al., 2018).

Zájem o studium grampozitivních sporotvorných tyčinek se významně zvýšil, zejména v důsledku rostoucího výskytu alimentárních nákaz. Nicméně většina kmenů *Bacillus* spp. nejsou pro člověka patogenní, ale některé mohou člověka infikovat náhodně. Patogenitu podporují především různé virulentní faktory a toxiny kódované odpovídajícími geny (Adamski et al., 2023). Enterotoxiny *B. cereus* byly spojovány s nejvyšším počtem alimentárních ohnisek mezi bakteriálními toxiny v Evropské unii, převyšujícími i ohniska způsobená *Clostridium perfringens* a *Staphylococcus aureus* (EFSA a ECDC, 2023). Nejčastěji jsou tyto nákazy spojeny s gastrointestinálním onemocněním projevujícím se jako zvracení (Algammal et al., 2024).

Stále rostoucím problémem je i vznik a šíření rezistence na antibiotika, což Světové zdravotnické organizace označily za jednu z hlavních zdravotních výzev 21. století. *Bacillus cereus* je typicky rezistentní na penicilin a další β -laktamová antibiotika a může dále získat rezistenci na běžně používaná antibiotika, jako je ciprofloxacin, cloxacilin, erythromycin, tetracyklin a streptomycin. Zvyšující se podíl těchto sporulátů odolných vůči antibiotikům velmi znesnadňuje léčbu (Fiedler et al. 2019).

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH SPOROTVORNÝCH MIKROORGANISMŮ

Tato kapitola se zabývá charakteristikou rodů grampozitivních sporotvorných tyčinek se zaměřením na rody, se kterými jsem pracovala v praktické části této diplomové práce. Všechny tyto rody spadají do domény Bakterie, kmenu *Bacillota*, třídy *Bacilli*, řádu *Bacillales* a čeledi *Bacillaceae*.

1.1 *Bacillus* spp.

Mnoho druhů, které byly původně popsány jako příslušníci rodu *Bacillus*, jsou nyní překlasifikovány do různých rodů a čeledí, jako jsou například *Alkalibacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* či *Virgibacillus* (Borriss, 2020). V současnosti existuje 105 uznaných druhů v rodu *Bacillus* a typovým druhem je *Bacillus subtilis* (LPSN 2023).

Bakterie *Bacillus* spp. mají buňky tyčinkovitého tvaru s určitými druhově specifickými rozdíly ve velikosti od 0,4 do 0,5 μm až 1,8 μm v průměru a délce od 0,9 do 10,0 μm . Vyskytují se jednotlivě, ve dvojicích anebo mohou buňky vytvářet řetězce různé délky. Jsou často pohyblivé pomocí peritrichních bičíků, některé druhy jsou nepohyblivé jako například *Bacillus anthracis* a *Bacillus mycoides*. Tvoří endospory, které jsou velmi odolné vůči mnoha nepříznivým podmínkám, jako jsou vysoké teploty, UV záření a toxické chemické látky (Logan et al., 2016; Borriss, 2020).

Tvorba spor umožňuje přežití během zpracování potravin (např. pasterace mléka nebo šňávy, příprava jídel domácí kuchyně), spory pak mohou vyklíčit, pokud je potravina ponechána při okolní teplotě (McKillip et al., 2000). Endospory se tvoří na konci exponenciální růstové fáze a na indukci sporulace se podílí několik faktorů prostředí. Jedním spouštěčem je nutriční deprivace, například když se aktivně rostoucí kultura přenesne z bohatého do chudého růstového média. Mezi další faktory které ovlivňují tvorbu endospor, patří teplota růstu, pH prostředí, obsah kyslíku, přítomnost určitých minerálních látek a zdrojů uhlíku, dusíku a fosforu včetně jejich koncentrace. Dalším vlivem je hustota populace (Logan et al., 2016).

Morfologie a velikost kolonie je velmi variabilní mezi druhy i v rámci nich. Samozřejmě velký vliv má také složení média a další inkubační podmínky. Navzdory této rozmanitosti však není obecně obtížné rozpoznat kolonie *Bacillus* spp. na běžných médiích (Logan et al., 2016). Nejdůležitější kulturní techniky pro izolaci a stanovení počtu druhů skupiny *B. cereus* jsou řízeny normami Mezinárodní organizace pro standardizaci (ISO) ISO 7932 a ISO 218714 a Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Při standardním postupu se používají média mannitol – vaječný žloutek – polymyxin (MYP) a polymyxin – vaječný žloutek – mannitol – bromthymolová modř (PEMBA).

Na MYP a PEMBA jsou typické kolonie kmenů skupiny *B. cereus* rozpoznány podle precipitační zóny v důsledku hydrolyzy vaječného žloutku, resp. jsou zbarvené růžovou barvou nebo paví modří (Pontieri, 2016).

Bakterie rodu *Bacillus* vykazují širokou škálu fyziologických schopností, od psychrofilních po termofilní a od acidofilních po alkalifilní. Některé kmeny jsou odolné vůči solím, tedy halofilní. Většina druhů roste na běžných médiích, jako je živný agar a krevní agar. Ty, které nerostou, jsou alkalifilní, tzn. že nebudou růst při pH nižším než pH 7,0 (Borriss, 2020).

Většina druhů má malý nebo žádný patogenní potenciál a zřídka jsou spojovány s onemocněním lidí nebo jiných zvířat. Výjimkou je *Bacillus anthracis*, původce antraxu, několik dalších druhů může způsobit otravu jídlem a oportunní infekce (např. *Bacillus cereus*) a kmeny *Bacillus thuringiensis*, který je patogenní pro bezobratlé (Logan et al., 2016).

1.2 *Cytobacillus* spp.

Na základě analýz provedených v roce 2020, případně následujících letech, byly překlasifikovány některé druhy rodu *Bacillus* do nového rodu *Cytobacillus* kvůli odlišným sekvencím proteinů. Název vzniklého rodu byl odvozen z latinského příslovce *cytos*, což v biologii znamená buňka; tedy tyčinkovitá buňka. V současnosti existuje 16 uznaných druhů tohoto rodu. Typovým druhem je *Cytobacillus firmus* (LPSN, 2023; Patel a Gupta, 2020).

Jedná se o bakterie tyčinkovitého tvaru o průměru mezi 0,8-0,9 μm vyskytující se jednotlivě, v párech nebo příležitostně v krátkých řetězcích. Vykazují se grampozitivním barvením a většina druhů je pohyblivá. Tvorba endospor byla pozorována u všech studovaných kmenů za nepříznivých podmínek prostředí nebo výživy. Endospory jsou elipsoidní nebo cylindrické, leží subterminálně, paracentrálně nebo centrálně a sporangia mohou mírně bobtnat. Izolované jsou z různých prostředí včetně půdy či lidských střev (Logan et al., 2016).

Růst probíhá v rozmezí teplot 10–45 °C, s optimální teplotou růstu mezi 25–37 °C. Některé druhy jsou středně odolné vůči soli a mohou také tolerovat vysokou zásaditost. Například pro typový druh je optimálním pH pro růst 7,0-9,0. Minimální inhibiční hodnota je pH 6,0-7,0, naopak maximální se pohybuje mezi 11 a 11,5. Také roste v přítomnosti 7% NaCl (Patel a Gupta, 2020).

Metabolismus je aerobní nebo fakultativně anaerobní. Jsou kataláza pozitivní. Kasein a škrob jsou schopni hydrolyzovat, síla reakce se u jednotlivých kmenů liší. Podobné je to u redukce dusičnanů. *C. firmus* neprodukuje sirovodík, ureázu, tryptofandeaminázu, indol arginindihydrolázu, lysin-dekarboxylázu či ornitindekarboxylázu. Citrát a propionát nejsou využívány (Logan et al., 2016).

1.3 *Fictibacillus* spp.

Název nového rodu *Fictibacillus* je odvozen od adjektiva *fictus* nebo *false*, tedy falešný. V současnosti existuje 12 uznaných druhů rodu *Fictibacillus* a typovým druhem je *Fictibacillus barbaricus* (LPSN 2023).

Bakterie *Fictibacillus* spp. jsou grampozitivní nepohyblivé a mají tvar tyčinek o velikosti $0,5\text{--}1 \times 2\text{--}5 \mu\text{m}$. Často se vyskytující v řetězcích. Spory jsou kulovité až elipsoidní a umístěné buď centrálně nebo terminálně, někdy subterminálně. Jejich tvorba může být velmi řídká (Kämpfer & Glaeser, 2023)

K optimálnímu růstu u typového druhu rodu *Fictibacillus* dochází při teplotách od 18 do 37 °C, neroste při teplotě <4 nebo >47 °C. Je alkalitolerantní, slabě rostou při pH 6,0, silně při pH 7,2, 8,0 a 9,5. Naopak nerostou při pH 11,0. Slabý růst nastává v přítomnosti 2 % NaCl a růst je inhibován při 5% obsahu NaCl (Gupta et al., 2020).

Také je fakultativně anaerobní, kataláza, oxidáza a ureáza negativní. Zároveň neredukuje dusičnany a netvoří indol ani H₂S. Hipurát se rozkládá, eskulin není hydrolyzován. Při metabolismu nevyužívá citrát a kyselina se vytváří z D-glukózy, N-acetyl-glukosaminu, maltózy, trehalózy, škrobu a glykogenu (Gupta et al., 2020).

1.4 *Lysinibacillus* spp.

Všichni zástupci rodu *Lysinibacillus* mají buněčnou stěnu typu L-Lys-D-Asp (A4α), což je jedna z primárních vlastností pro odlišení od jiných blízce příbuzných rodů. Zároveň je od této vlastnosti odvozen název rodu, tedy lysine bacillus (Failor et al., 2016). V současnosti existuje 21 uznaných druhů rodu *Lysinibacillus*. (LPSN 2023)

Buňky *Lysinibacillus* spp. mají tvar tyčinky a jsou velké $0,3\text{--}1,5 \mu\text{m} \times 0,5\text{--}14,0 \mu\text{m}$. Buňky některých druhů mohou tvořit dlouhá vlákna. Například *L. meyeri* v tekuté kultuře může tvořit vlákna dlouhá 10–100 μm a *L. varians* až 466 μm . Většina druhů je pohyblivá a má peritrichní bičíky. Výjimky tvoří *L. manganicus*, který má bičíky laterální, *L. acetophenoni* a *L. tabacifolii*, který jsou nepohyblivé. Endospory *Lysinibacillus* spp. jsou elipsoidní nebo kulovité. Na jednu buňku se nevytvoří více než jedna spora. Tento rod je primárně grampozitivní, výjimkou je gramnegativní *L. massiliensis*. U *L. contaminans* a *L. macroides* metoda Gramova barvení nefunguje, proto se označují jako gram–variabilní (Failor et al., 2016).

Většina druhů roste při neutrálním pH mezi 6,0 a 8,0, přičemž optimálně při pH 7,0. Většina druhů má také nízkou toleranci k NaCl, s výjimkou *L. halotolerans* a *L. telephonicus*. Pro *L. halotolerans* je optimální koncentrace NaCl 3 % (w/v). Několik dalších druhů má zvýšené optimální koncentrace soli, včetně *L. mangiferihumi* (0–2 % (w/v)), *L. meyeri* a *L. saudi massiliensis* (0,5 % (w/v)) (Ahmed et al., 2007).

Bakterie rodu *Lysinibacillus* jsou aerobní. Všechny druhy jsou kataláza-pozitivní, nemohou redukovat dusičnany a nejsou schopny produkovat indol, jelikož vykazují negativní reakci na tryptofanázu. Všechny druhy nejsou schopny využít 2-ketoglukonát, kyselinu kaprinovou, D-arabinózu, gentiobiózu, indol, myo-inositol, stachyózu, škrob, β -gentiobiózu a β -methyl-xylosid. Tři druhy (*L. boronitolerans*, *L. cresolivorans* a *L. xylanilyticus*) jsou schopny degradovat m-kresol. Kmeny jsou typicky citlivé na penicilin G. (Failor et al., 2016).

1.5 *Paenibacillus* spp.

Paenibacillus spp. byl původně zahrnut do rodu *Bacillus* na základě společných morfologických charakteristik s typovým druhem *Bacillus subtilis*. Díky pozdějším fylogenetickým analýzám došlo k řadě úprav a v roce 1993 byly některé mikroorganismy přerazeny do nového rodu *Paenibacillus*. Název vzniklého rodu je odvozen z latinského příslovce *paene*, což znamená téměř, tedy téměř *Bacillus* (Pandey et. al, 2022). V současnosti existuje 292 druhů rodu *Paenibacillus* a typovým druhem je *Paenibacillus polymyxa* (LPSN 2023).

Paenibacillus spp. mají tvar tyčinek a obvykle měří 2-5 μm na délku a 0,5-0,8 μm na šířku. Dle struktury buněčné stěny se řadí mezi grampozitivní bakterie, nicméně se mohou barvit různě nebo negativně, zejména pokud se jedná o starší kultury. Všechny druhy produkují endospory, které mají obvykle větší průměr než mateřská buňka nebo sporangium, jelikož se tvoří jejím rozšířením. Většina druhů je pohyblivá pomocí peritrichních bičičků, ačkoli v několika případech může být pohyblivost omezena (např. u *P. popilliae*) nebo bičičky úplně chybí (např. u *P. lentimorbus*). Některé druhy vytvářejí za vhodných podmínek kapsulu (např. *P. polymyxa*) a některé druhy produkují extracelulární polysacharid. S-vrstvy jsou pravděpodobně přítomny u většiny druhů, ačkoli byly zaznamenány jen u relativně malého počtu bakterií (např. u *P. alvei* a *P. polymyxa*) (Whitman et al., 2015).

Většina druhů roste optimálně při teplotě kolem 30 °C. Výjimkou je *P. macquariensis*, který je psychrofilní a roste při maximální teplotě 25 °C a *P. cineris*, který má velmi široký teplotní rozsah pro růst (0–50 °C). Optimální růst probíhá také při neutrálním pH (7,0 - 8,0), ačkoli některé druhy

jsou alkalofilní a nerostou při pH nižším než pH 7,5 (např. *P. cookii* a *P. cineris*). Růst je inhibován 10% NaCl (Pandey et. al, 2022).

Jsou fakultativně anaerobní nebo striktně aerobní. Většina druhů je kataláza pozitivní. Druhy *Paenibacillus* jsou známé svou schopností hydrolyzovat různé sacharidy jako je karboxymethylcelulóza, chitin, chondroitin, kurdlan (β -1,3-glukan), pustulan (β -1,6-glukan), β -1,4-glukan, pullulan (maltotriózové jednotky spojené α -1,6-glykosidickými vazby), škrob a xylan. *P. naftalenovorans* a *P. validus* jsou atypické svou schopností degradovat uhlovodíky. *P. polymyxa* během katabolismu cukru produkuje 2,3-butandiol, zejména při nízkém pH (Whitman et al., 2015).

Mnoho druhů *Paenibacillus* produkuje antimikrobiální sloučeniny, které jsou využívány v lékařství, v zemědělství jako pesticidy, či pro bioremediaci. Některé hydrolytické enzymy mohou napadnout buněčné stěny konkurentů hub a oomycet (Grady et al., 2016). *P. polymyxa* produkuje potenciálně užitečné látky, včetně lipopeptidového polymyxinu, fusaricidinu, paenilipoheptinu, paenilanu a tridekaptinu účinné proti rostlinným i lidským mikrobiálním patogenům (Pandey et. al, 2022).

Některé kmeny jsou patogeny hmyzu. *P. larvae* způsobují hnilobu larev včely medonosné (*Apis mellifera*). *P. lentimorbus* a *P. popilliae* způsobují onemocnění u larev brouků z čeledi vrubounovitých (*Scarabaeidae*) (Whitman et al., 2015).

1.6 *Priestia* spp.

Nový rod *Priestia* vzniklý v roce 2020 byl pojmenován po britském mikrobiologovi prof. Fergusu G. Priestovi za jeho četné příspěvky k systematice a využití zástupců rodu *Bacillus*. V současnosti existuje 10 uznaných druhů v tomto rodu, typovým druhem je *Priestia megatarium* (Gupta et al., 2020; LPSN, 2023).

Jedná se o grampozitivní, tyčinkovité buňky o velikosti cca 1,2-1,5 x 2,0-5,0 μ m, vyskytující se jednotlivě i v párech a řetězcích. Většinou jsou pohyblivé a schopné tvořit elipsoidní anebo kulovité endospory. Byly izolovány z různých zdrojů, včetně výkalů, půdy, atmosféry, vnitřních tkání bavlníkových rostlin, mořského sedimentu a rhizosféry kořenů vrb (Gupta et al., 2020).

Teplotní rozsah pro růst je 5–48 °C s optimálním rozmezím mezi 28–37 °C. Byly nalezeny i izoláty z vody antarktického geotermálního ostrova, kde teplota růstu byla mezi 17–63 °C. Většina roste v přítomnosti 7% NaCl a neroste při 10 % NaCl (Gupta et al., 2020).

Typový druh, *Pr. megaterium*, je aerobní a kataláza pozitivní. Kasein, želatina a škrob jsou hydrolyzovány. Většina kmenů deaminuje fenylalanin, degradace tyrosinu je různá. Citrát je využíván jako jediný zdroj uhlíku a většina bakterií neredukuje dusičnany. Z glukózy a široké škály dalších sacharidů vytváří kyselinu bez vzniku plynu (Logan et al., 2016).

Pr. aryabhattai je průmyslově důležitý druh, protože je odolný vůči arsenu a UV záření, což umožňuje dostupnou alternativu ke konvenčním, nákladným technologiím sanace kovů (Logan et al., 2016).

1.7 *Psychrobacillus* spp.

Název rodu je odvozen od slova *psychros* neboli studený, lze přeložit jako chlad milující bacil. V rodu *Psychrobacillus* v současnosti existuje 8 uznaných druhů. Typovým druhem je *Psychrobacillus insolitus* (Krishnamurthi et al., 2010; LPSN, 2023).

Buňky jsou grampozitivní, tyčinkovité, pohyblivé a endospory tvořící. Spory jsou koncové, mohou být kulaté nebo válcovité. Optimální teplota růstu je kolem 20 °C, minimální teplota, kdy už nejsou schopny růstu, je nižší než 0 °C, naopak maximální je 25 °C. Sporulace a klíčení jsou schopny i při 0 °C. Tolerance 2 % NaCl je druhově různá, koncentraci 4 % NaCl již netoleruje (Logan et al., 2016).

Jsou přísně aerobní. Vykazují negativní reakce ohledně využití citrátu jako zdroje uhlíku, redukce dusičnanů, hydrolýzy želatiny a škrobu a produkce indolu a ureázy. Typový druh je také negativní na produkci alkalické fosfatázy, esterázy, leucinarylamidázy, valinové arylamidázy, trypsinu, α -chymotrypsinu a eskulinu. Nicméně je kataláza a oxidáza pozitivní (Krishnamurthi et al., 2010; Logan et al., 2016).

2 CHARAKTERISTIKA POTRAVIN NEPODPORUJÍCÍCH RŮST MIKROORGANISMŮ

Tato kapitola se zabývá charakteristikou potravin, ze kterých byly v rámci praktické části této diplomové práce vyizolovány grampozitivní sporotvorné tyčinky. Jednalo se zejména o tepelně opracované masné výrobky a sušené ovoce.

Tyto potraviny se obecně považují za méně rizikové, zejména kvůli vytvoření nepříznivých podmínek pro růst mikroorganismů, v případě masných výrobků je to použití vysoké teploty a u sušeného ovoce snížení vodní aktivity (Cebrián et al., 2017; Chitrakar et al., 2019).

2.1 Tepelně opracované masné výrobky

Maso je nedílnou součástí lidské stravy a v posledních letech se spotřeba masa ve většině částí světa značně zvýšila. Konzumace masa přispívá k příjmu řady vitaminů a minerálních látek, jako jsou vitamin B, vitamin A, zinek a železo. Je také důležitým zdrojem bílkovin poskytujících esenciální aminokyseliny. Také je však bohaté na nasycené tuky a cholesterol. Kvůli této rozmanitosti živin, se jedná o potravinu, která podléhá rychlé zkáze a má krátkou trvanlivost. Hlavními příčinami kažení je přítomnost mikroorganismů, oxidace lipidů a autolytické enzymatické kažení. K předcházení ztráty charakteristické struktury, barvy a výživové hodnoty masa, se stalo nezbytným používání konzervace. Mezi tradiční metody patří sušení, uzení, solení a tepelné opracování (Addis, 2015; Rohrmann et al., 2016).

Sortiment masových konzerv představuje oblíbený a relativně levný výrobek vyráběný ve všech světových regionech. Paštika je emulgovaný, tepelně zpracovaný masný výrobek. Hlavními složkami používanými při výrobě paštiky jsou játra, maso, tuk, sůl, voda a malé množství přídatných látek v závislosti na technologických listech jednotlivých zpracovatelů. Přestože játra patří do kategorie jatečných vedlejších produktů, nejsou kvalitativně horší, protože obsahují významné množství vitaminů a minerálních látek. Stejně jako většina emulgovaných masných výrobků mají však vysoký obsah tuku, což je významnou nutriční nevýhodou (Ciobanu et al., 2021; Rezler et al., 2021).

2.1.1 Tepelné ošetření

Teplota se široce používá v potravinářském průmyslu pro své konzervační účinky, protože zvýšená teplota je schopna inaktivovat většinu mikroorganismů a enzymů přítomných v potravinách. Tepelná úprava je proto metodou, která může současně zaručit bezpečnost a stabilitu potravin.

Současně ale vede ke snížení nutriční hodnoty a někdy i organoleptických vlastností (zejména ke změně vzhledu). Jako první jsou obvykle ovlivněny živiny citlivé na teplo, tedy složky jako vitaminy, následně jsou degradovány barva, chuť a sacharidy, a to v závislosti na mnoha parametrech (Cebrián et al., 2017; Chiozzy et al., 2022).

Tepelná ošetření lze rozdělit do dvou skupin v závislosti na jejich intenzitě a účelu: pasterační a sterilační ošetření. Pasterační ošetření má za cíl inaktivovat vegetativní buňky patogenních druhů mikroorganismů přítomných v potravinách. Také prodlužuje trvanlivost, pokud jsou potraviny skladovány v chladírenských podmínkách. Sterilační ošetření se používá, aby byla zaručena stabilita potravinářského produktu při pokojové teplotě, což je cíl, který ve většině případů vyžaduje použití teplot vyšších než 100 °C (v závislosti na pH potraviny). Taková intenzivní ošetření jsou schopna inaktivovat mikrobiální spory, stejně jako mnoho enzymů a toxinů přítomných v potravinách, ale mohou také vážně změnit jejich organoleptické a nutriční vlastnosti (Cebrián et al., 2017).

Typ inaktivovaného mikroorganismu samozřejmě závisí na intenzitě ošetření a dalších podmínkách prostředí potraviny. Pro porovnání relativní tepelné odolnosti různých mikroorganismů se tepelná odolnost běžně vyjadřuje parametrem D , kdy D odpovídá době expozice při dané teplotě, která je potřebná ke snížení bakteriální populace o jeden řád (\log_{10}). D je tedy čas potřebný k inaktivaci 90 % bakteriální populace. Tento parametr nebo křivky přežití jsou dostupné v publikacích, technických zprávách nebo databázích, např. databáze Lemgo (<https://ldzbase.de/>).

Stupeň tepelné odolnosti různých mikrobiálních skupin se velmi liší v důsledku jejich odlišné struktury a složení a také mechanismů rezistence, které jsou schopny vyvinout. Nejviditelnějším příkladem této široké variace je rozdíl v tepelné odolnosti mezi vegetativními buňkami a sporami stejného bakteriálního druhu. Bakteriální spory jsou tedy jednou z nejúčinnějších rezistentních struktur v přírodě, jelikož jsou schopny odolat i pasteračnímu ošetření (hodnoty D často nad 1 min při 100 °C) (Cebrián et al., 2017; Le Marc et al., 2022). V důsledku nedostatečné intenzity sterilizace často dochází ke kažení potravin a otravám z potravin. Více než 70 % případů otravy potravinami způsobují mikroorganismy, zejména sporo tvorné bakterie (Xin et al., 2023).

Zejména moderní spotřebitelské trendy učinily z již úspěšného zajištění bezpečnosti a stability výrobku po celou dobu jeho trvanlivosti mnohem větší výzvu pro potravinářský průmysl. Spotřebitelé vyžadují více kvalitních, bezpečných, ale mírně zpracovaných potravin bez konzervačních látek s prodlouženou dobou trvanlivosti. To může například znamenat, že potraviny musí být ošetřovány při teplotách mírné pasterace namísto sterilace (Chiozzy et al., 2022; Rawat et al., 2015). Také vysoký potenciál netepelných technologií byl opakovaně prokázán atraktivním pro širokou škálu aplikací, nejen pro zajištění bezpečnosti a kvality potravin. Kromě netepelné výhody posilují tuto perspektivu

další výhody, včetně ekologických a ekonomických. Vzhledem k jejich mírnější povaze ve srovnání s tradičními tepelnými úpravami je však zásadní zajistit plnou inaktivaci přítomných mikroorganismů (Impe et al., 2018).

2.2 Sušené ovoce

Čerstvé potraviny jako ovoce, zelenina, maso, ryby a další zemědělské produkty jsou bohaté na vodu a jejich vodní aktivita se obecně pohybuje mezi 0,98 a 0,99, což je vhodné pro růst široké škály mikroorganismů. Sušení čerstvých potravin pomáhá prodloužit trvanlivost a zároveň snižuje požadavky na balení a přepravní hmotnost (Chitrakar et al., 2019).

Sušené potraviny mají obvykle nízkou aktivitu vody v rozmezí od 0,03 - 0,70. Mezi nejběžnější produkty v této kategorii patří sušené ovoce a zelenina, čaj, káva, sušené houby, sušené masné výrobky, obilná zrna a mouka, koření a bylinky, luštěniny, ořechy, sušené mléko a prášková kojenecká výživa. Vzhledem k tomu, že tyto produkty mají nízký obsah zbytkové vlhkosti, inhibují růst mikroorganismů a jsou obecně považovány za bezpečné před patogenními bakteriemi přenášenými potravinami. Zároveň existuje obecná mylná představa, že bakterie nejsou schopny přežít a růst v těchto potravinách, což není pravda. Navzdory inhibičnímu účinku nízké aktivity vody, nejsou potraviny s nízkou aktivitou vody sterilní a mohou tak zůstat prostředkem pro přežití alimentárních patogenních mikroorganismů (Chitrakar et al., 2019; Wang et al., 2023). Mnoho ohnisek alimentárních onemocnění je způsobeno právě konzumací sušených potravin kontaminovaných *Bacillus* spp., *Cronobacter sakazakii* (dříve *Enterobacter sakazakii*), *Clostridium* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* atd. Některé z těchto alimentárních patogenů mohou přežívat v potravinách s nízkou aktivitou vody a v prostředích pro zpracování potravin měsíce nebo dokonce roky. Ačkoli jsou některé alimentární patogeny (např. *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* a *Clostridium botulinum*) schopny přežít v těchto potravinách, musí se nejprve rozmnožit na relativně vysoké populace, než jsou schopny produkovat toxiny způsobující onemocnění (Beuchat et al., 2013; Sánchez-Maldonado et al., 2018).

Obecně se tedy uznává, že sušené potraviny zpomalují nebo zabraňují růstu mikroorganismů, ale pokud je po sušení přítomen dostatečný počet patogenních mikroorganismů, může to představovat hrozbu pro spotřebitele. Navíc, když se sušené materiály používají k přípravě potravin s vysokou konečnou vodní aktivitou, může být podporován růst přeživších organismů. To může vést k rychlejšímu znehodnocení a/nebo vyššímu riziku nákazy spotřebitele (Beuchat et al., 2013).

2.2.1 Sušení

Dehydratace potravin je jednou z nejstarších metod konzervace potravin. Procesem sušení se snižuje aktivita vody a obsah vlhkosti v potravinách, takže je do značné míry zabráněno růstu mikroorganismů v potravinách. Při konvenčním sušení potravin se teplý vzduch používá k ohřevu potravin a k odvádění par vlhkosti z materiálu, který je vystaven sušení. Vývoj technologií průmyslové dehydratace potravin dosáhl několika změn. Jako první se využívalo sušení na slunci, poté skříňové a postelové sušičky, následně rozprašovací a bubnové sušičky. Další pokrok zahrnovaly vymrazovací sušičky (lyofilizace) a osmotická dehydratace. Nejnovější technologie dehydratace, také nazývané nové technologie sušení, zahrnují použití vysokého vakua, poklesu tlaku (LPSSD), infračervené záření (IR), radiofrekvenční (RF), elektrohydrodynamické, ultrazvukové sušení, či sušení superkritickým CO₂ (ScCO₂). Některé z těchto nových technologií (tabulka 1) dosahují velmi dobrých výsledků sušení a mikrobiální inaktivace, nicméně jsou omezeny složitými sušicími systémy a vysokými investičními náklady (Alp et al., 2021; Chitrakar et al., 2019; Wang et al., 2023).

Lyofilizace je dobře známá technika sušení díky produkci vysoce kvalitních sušených produktů. Výhodou je zachování barvy, struktury, chuti a výživové hodnoty. Není však zas tak spolehlivou metodou při inaktivaci nežádoucích mikroorganismů. Technika sušení mrazem je ve skutečnosti vynikajícím způsobem konzervace a často se právě používá k sušení kmenů a probiotik, aby se minimalizovala jejich biologická aktivita pro dlouhodobé skladování. Lyofilizace má nejnižší teplotu mezi technologiemi netepelného sušení a teplota prostředí sušení se obecně pohybuje kolem -50 °C. Právě zmrznutí i nízká aktivita vody mohou zvýšit odolnost buněk (Wang et al., 2023).

Tabulka 1 Nové technologie sušení potravin (Wang et al., 2023).

Technika sušení	Výhody	Nevýhody	Mechanismy mikrobiální inaktivace
Lyofilizace	Potraviny si zachovávají tvar, strukturu, barvu, nutrienty a chuť	Nákladné zařízení, náročné na čas a energii	Použití pro dlouhodobé skladování bakteriálních kmenů, horší schopnost mikrobiální inaktivace
Sušení ve vakuu	Nízká teplota sušení, vysoká účinnost sušení a dobrá konzervace komponent	Tepelná energie poskytována prostřednictvím kontaktních desek, mikrovln	Nízká teplota vede k neúplné inaktivaci; rychlé odpařování vodní páry ve vakuu, podobné sterilaci suchým teplem
LPSSD	citlivých na teplo a kyslík	Komplexní systém sušícího zařízení, velké investice	Dobrá efekt sterilace vlhkým teplem pomocí přehřáté vodní páry
Sušení ScCO₂	Bez povrchového napětí kapalné fáze, vnitřní struktura produktu zůstává nedotčena. Při nízkých teplotách udržitelnost využití CO ₂	Velmi nákladné a složité vybavení	Superkritický CO ₂ může změnit permeabilitu membrán mikrobiálních buněk
Mikrovlnné sušení	Objemový ohřev, vysoká účinnost sušení, krátká doba sušení	Nerovnoměrná distribuce mikrovln, studená místa, nestejná kvalita produktu, bezpečnost mikrovlnného záření	Mechanismus sterilace tepelným efektem, mikrovlny denaturují fyziologicky aktivní látky, jako jsou nukleové kyseliny a proteiny
RF sušení	Objemový ohřev, hluboká penetrace, dobrá rovnoměrnost produktu	Nelze rovnoměrně ohřívát potraviny složitějšího tvaru, RF záření, nízká účinnost ohřevu	Mechanismus tepelné sterilace, selektivní netepelný sterilizační mechanismus pro inaktivaci buněk
IR sušení	Vysoká účinnost sušení, bezpečné	Povrchové ohřátí, obecně vhodné pro materiály s vysokým obsahem vody a tenkovrstvé materiály	Mechanismus sterilace tepelným efektem

2.3 Vliv konzervace na mikroorganismy

Hlavním cílem konzervace potravin je modifikovat bakteriální buňky tak, aby byly inaktivovány, jinými slovy, aby ztratily schopnost se množit. Tato modifikace spočívá ve změně jedné nebo více buněčných struktur nebo funkcí. Obecně platí, že se jedná o složku, jejíž zničení vede k buněčné smrti, což znamená, že musí splňovat dva požadavky: musí být nepostradatelná

pro samoúdržbu a replikaci buňky a je nenahraditelná. Za nejčastěji ovlivněné buněčné struktury jsou považovány vnější a vnitřní membrána, peptidoglykan buněčné stěny, nukleoid, buněčná RNA, ribozomy a různé enzymy, například enzymy cyklu kyseliny citronové zapojené do buněčného metabolismu (Cebrián et al., 2017; Chitrakar et al., 2019).

Bakteriální buněčná stěna je nezbytná pro udržení tvaru buňky a nesení zátěže prostředí. Gram-pozitivní buněčná stěna se skládá ze síťovitého peptidoglykanu a kovalentně vázaných polymerů kyseliny teichoové a kyseliny lipoteichoové. Množství polymerů kyseliny teichoové buněčného povrchu je podstatně sníženo při vysokých teplotách. Následně se zvyšuje i koncentrace peptidoglykan hydrolázy, enzymu štěpícího glykosidické vazby mezi cukernými jednotkami v peptidoglykanu, což způsobuje jeho úbytek (Sakahara et al., 2016).

Úlohou cytoplazmatické membrány je řada důležitých a/nebo základních funkcí. Membrána obsahuje hlavní hranici vymežující buněčnou cytoplazmu a řídí transport a difúzi malých molekul a vylučovaných proteinů mezi intracelulárním a extracelulárním prostorem. Je složena ze zhruba stejných podílů proteinů a lipidů, kdy hlavními lipidovými složkami jsou fosfolipidy, které určují vlastnosti membrány, jako je tekutost a náboj, a modulují interakce s proteiny asociovanými s membránou (Strahl et al., 2017). Při stresových situacích bývá popsána tvorba membránových vezikul a úbytek materiálu membrány, včetně jednoho nebo více proteinů. Membrána se tedy stává tenčí a hladší než původní, což může vyvolat změnu fyziologického stavu vegetativních buněk. Její částečná ztráta funkčnosti úzce souvisí s následnou ztrátou vnitřní homeostázy. Jedná se o změny v transportu látek, ztrátu respirační aktivity, osmotickou a pH homeostázu. Ztráta intracytoplazmatického materiálu, jako jsou ionty (např. draslíkové), aminokyseliny a proteiny také zvyšuje poškození buňky, jelikož tyto látky mohou být důležité při její reparaci. Porucha integrity membrány bývá prokázána barvením propidiumjodidem, což je nejrozšířenější marker integrity membrány, jelikož barvivo proniká pouze do buněk s poškozenými membránami (Cebrián et al., 2017; LV et al., 2019; Smelt et al., 2014).

V případě tepelných úprav se ukázalo, že DNA je jednou z buněčných složek s nejvyšší termostabilitou, a k její denaturaci dochází až při sterilačních teplotách. Zároveň teplo vyvolává poškození v molekule DNA, která však mohou být opravitelná. Daleko účinnější jsou tedy inaktivace jinými technologiemi, například využívající ionizující záření a UV světla (Cebrián et al., 2017). Denaturaci může způsobit i kyselé prostředí, jehož vlivem dochází ke štěpení fosfodiesterové vazby v DNA (Duport, et al., 2016).

RNA je citlivější na působení vyšších teplot než DNA, díky tomu je denaturace RNA považována za jeden z nejzjevnějších důsledků vystavení bakteriálních buněk teplu (Cebrián et al., 2017).

Proteiny jsou distribuovány v bakteriálních buňkách téměř ve všech buněčných strukturách, buď jako strukturální proteiny (např. proteiny podílející se na transportu látek) nebo jako enzymy. Velmi důležitou roli hrají například detoxikační enzymy, jako je kataláza či superoxidodismutáza, které chrání buňky před oxidačním stresem způsobeným reaktivními formami kyslíku nebo enzymy opravujícími DNA, které jsou nepostradatelné při procesu pozdější obnovy. Tepelné zpracování způsobuje denaturaci a agregaci proteinů v bakteriálních buňkách, což může vést ke ztrátě funkčnosti (Cebrián et al., 2017; Tuipulotu et al., 2021).

Vzhledem k tomu, že ribozomy se skládají převážně z RNA a proteinů, lze předpokládat, že by mohly být také důležitým místem denaturace. Ve většině případů k nevratné denaturaci ribozomů dochází při teplotách blízkých teplotám inaktivace bakterií. V souvislosti se stabilitou ribozomů je důležitá úloha iontů hořčíku, o kterých je známo, že jsou nezbytné pro udržení podjednotek vázaných k sobě navzájem. Zároveň inhibují aktivitu ribonukleázy, což je enzym, který umožňuje hydrolytické štěpení řetězce RNA. Je tedy rozumné předpokládat, že vyčerpání hořčíku z buňky, například jako sekundární důsledek poškození membrány, by mohlo způsobit destabilizaci ribozomů, což by přispělo k buněčné smrti (Cebrián et al., 2017; Smelt et al., 2014).

Působení tepla také indukuje oxidační stres, který vzniká v důsledku nerovnováhy mezi produkcí reaktivních forem kyslíku a dostupnou antioxidační obranou buňky proti nim. Tyto reaktivní formy kyslíku pocházejí z metabolismu kyslíku jako vedlejší produkty buněčného dýchání a jsou nepřetržitě produkovány ve všech aerobních organismech. Důsledkem je oxidační poškození proteinů, lipidů, polysacharidů a DNA, narušení mitochondriální homeostázy a snížení buněčných funkcí, což zvyšuje rychlost odumírání buňky. V důsledku reakce na tepelný šok buňky nedokáží opravit poškozené proteiny, ani zastavit šíření oxidativního poškození, proto není překvapivé, že tepelný stres je obvykle spojen s apoptózou a nekrózou (Belhadj et al., 2014).

2.4 Faktory ovlivňující bakteriální inaktivaci teplem

Na tepelnou odolnost daného mikroorganismu má vliv celá řada dalších faktorů, přičemž vliv těch nejdůležitějších je popsán níže.

Aktivita vody v médiu

Tento faktor je velmi důležitý, protože pokles aktivita vody výrazně zvyšuje hodnoty D v působení na mikroorganismy. Obecně je suché teplo méně účinné než vlhké teplo, protože buněčné proteiny, které jsou důležitou složkou pro udržení životaschopnosti buněk, jsou stabilnější v suchém stavu. Například při aktivitě vody mezi 0,2 a 0,4 jsou spory i vegetativní buňky odolnější vůči tepelnému stresu (Cebrián et al., 2017; Chitrakar et al., 2019).

pH ošetrovacího média

Tento faktor byl podrobně studován ve vegetativních buňkách i ve sporách. Obecně jsou buňky odolnější vůči vyšším teplotám při pH blízkém neutrálnímu, nad a pod tímto optimem tepelná odolnost klesá. Zároveň jsou buňky i spory citlivější k zahřívání v kyselém prostředí (při nižším pH). Spory nemohou v důsledku nízkého pH klíčit ve vegetativní buňky. Z praktického hlediska se okyselování potravin dlouho používá jako strategie ke zvýšení účinnosti tepelných úprav za účelem získání bezpečných a stabilních potravin (Alp et al., 2021; Cebrián et al., 2017).

Složení ošetrovacího média

Kromě vnitřního účinku pH a aktivity vody mají složky ošetrovacího média také vliv na přežití buněk. Obecně se předpokládá, že komplexní média, která obsahují hodně cukrů, polypeptidů, polyalkoholů, aminokyselin či glycerolu, chrání buňky před tepelnou inaktivací. Také přítomnost některých iontů v kultivačním médiu má tendenci zvyšovat odolnost bakterií vůči zvýšené teplotě. Příkladem jsou dvojmocné kationty Ca^{2+} a Mg^{2+} , o kterých je známo, že stabilizují molekuly a/nebo buněčné struktury včetně ribozomů, vnější membrány a molekuly DNA. Naopak soli jako fosforečnany, polyfosforečnany a dusitany mají tendenci snižovat tepelnou odolnost. Etanol a přírodní antimikrobiální látky, jako jsou éterické oleje nebo nisin, také snižují tepelnou odolnost bakterií. Předpokládá se, že narušují integritu vnější a cytoplazmatické membrány (Cebrián et al., 2017; Chitrakar et al., 2019).

Fáze růstu

Exponenciálně rostoucí buňky jsou obvykle citlivější na teplo než buňky ve stacionární fázi růstu. Tato skutečnost se často vysvětluje zvýšením exprese alternativních sigma faktorů po vstupu do stacionární fáze. Tyto alternativní sigma faktory řídí transkripci podskupiny genů zapojených do odolnosti vůči stresu takovým způsobem, že některé z těchto genů mohou hrát roli při přežití v teple, například geny zapojené do stabilizace a opravy DNA, proteázy a katalázy. Zároveň sporotvorné bakterie na konci exponenciální růstové fáze začínají tvořit endospory (Cebrián et al., 2017; Logan et al., 2016).

Růstová teplota

Obecně se předpokládá, že termofilní mikroorganismy jsou odolnější vůči zvýšené teplotě než mikroorganismy mezofilní či psychofilní. Důvodem je jejich odlišné chemické a strukturální složení některých buněčných struktur. Nejobecnějším vysvětlením tepelné tolerance vegetativních bakteriálních buněk je modifikace složení mastných kyselin a proteinů membrány, čímž upravují její fluiditu (tekutost) tak, aby byla zachována stejná permeabilita při rozdílných teplotách. Například delší délka mastného acylového řetězce a zvýšený podíl mastných kyselin s přímým řetězcem snižují fluiditu membrány. Navíc u mikroorganismů rostoucích při vyšších teplotách byl zjištěn vyšší obsah proteinů tepelného šoku (heat shock proteins). Tyto proteiny vykonávají různé buněčné funkce, včetně správného skládání, eliminace nebo opravy proteinů, které mohly být poškozeny teplem, ale také termostabilizaci některých struktur, jako je membrána (Cebrián et al., 2017; Hellman, 2016).

Koncentrace kyslíku

Snížení obsahu kyslíku a živin vede zpravidla ke snížení metabolické aktivity bakterií a zastavení růstu bakterií (Pagán & García-Gonzalo, 2015). Nicméně buňky vystavené tepelnému stresu se lépe zotavují za anaerobních podmínek, za podmínek s nízkým redoxním potenciálem nebo za přítomnosti antioxidantů fungujících jako zhášče reaktivních forem kyslíku. Toto je pravděpodobně způsobeno právě účinnější kontrolou produkce těchto nestabilních molekul a poškozeními takto způsobenými. Tepelné úpravy mohou zvýšit úroveň intracelulárního oxidačního stresu mnoha způsoby. Může to být například tepelná inaktivace detoxikačních enzymů (např. katalázy, superoxidodismutázy, alkylperoxidázy), ztráta významných redukovaných thiolů (např. glutationu) účastnících se přenosu přes permeabilizovanou membránu, nebo to mohou být poruchy fyziologické funkce elektrontransportního řetězce s následným zvýšením produkovaných ROS (Cebrián et al., 2017).

Mezi další působící faktory lze zařadit teplotu obnovy nebo složení regeneračního média. Pokud se sušené potraviny používají k přípravě potravin s vysokou konečnou vodní aktivitou, může být během regenerace podpořen růst subletálně poškozených mikroorganismů, což může představovat riziko nákazy. Typickým příkladem může být dehydratovaná kojenecká výživa, případně další potraviny (Cebrián et al., 2017; Chitrakar et al., 2019).

2.5 Mechanismy přežití nepříznivých podmínek

V prostředí s nepříznivými podmínkami většina organismů aktivuje mechanismy stresové reakce v důsledku suboptimálních podmínek, jako je např. hladovění, subletální tepelné podmínky, suboptimální pH, osmotický stres nebo přítomnost organických kyselin či dalších látek s možností

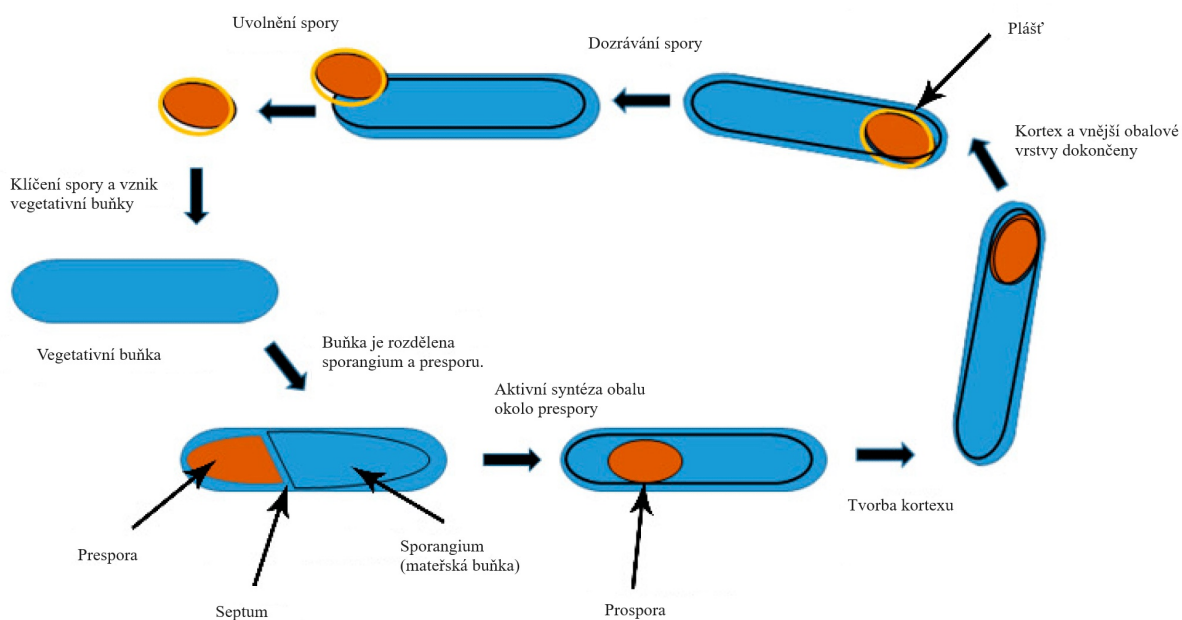
inhibice růstu a množení. Reakce na buněčný stres jsou složité a zahrnují rozsáhlé propojené transkriptomické, enzymatické a metabolické úpravy k zajištění přežití za jinak nepříznivých podmínek. Zároveň dochází k přechodnému zastavení růstu a poklesu intracelulárního pH. Za určitým bodem už buňka nezvládá stres a dojde k jejímu poškození. Poraněné buňky potřebují čas na opravu, zotavení za suboptimálních podmínek je však obtížnější. V důsledku toho se mnoho poškozených buněk již nemůže zotavit. Pokud nejsou schopny tvořit kolonie, lze je považovat za mrtvé. Některé buňky se však mohou zotavit, což může vést ke vzniku křížové rezistence, tedy větší odolnosti mikrobiální populace (Chitrakar et al., 2019; Smelt et al., 2014).

Když jsou bakterie vystaveny prostředí s nízkou vodní aktivitou, musí vyrovnávat osmolaritu jejich vnitřního buněčného složení se složením vnějšího prostředí, aby se zabránilo ztrátě vody. Bakterie mají řadu buněčných mechanismů, které se účastní tohoto procesu osmoregulace. Například buňka *B. subtilis*, modelového organismu rodu *Bacillus* široce používaného ke studiu základních biologických procesů, za těchto okolností zpočátku importuje velké množství draselných iontů jako nouzovou stresovou reakci, aby omezila ztrátu vody. Pokud osmoregulační stres přetrvává, následuje adaptační fáze, kdy se snižuje množství zásoby draslíku a částečně se nahrazuje rozpuštěnými elektricky neutrálními, nízkomolekulárními a kompatibilními látkami. Tyto organické osmolyty jsou vysoce shodné s fyziologií buňky, což umožňuje jejich akumulaci do mimořádně vysokých intracelulárních koncentrací, aniž by ovlivnily chemické pochody, jako je například funkce enzymů. Mezi dva důležité zástupce těchto kompatibilních solutů patří glycinbetain a L-prolin. Díky tomu je zajištěno zadržování vody v buňce a udržování vitálního turgoru buňky s vysokou osmolaritou, což může v bakteriální buňce omezit ztrátu vody (Hoffmann a Bremer, 2017; Chitrakar et al., 2019; Kohlsteht et al., 2014).

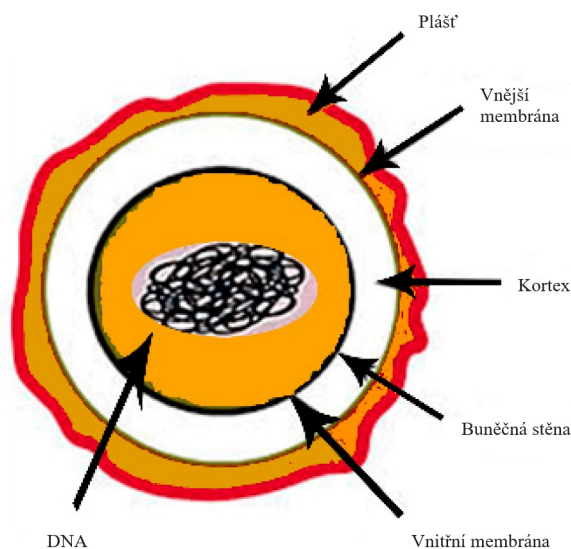
Sporotvorné tyčinky mohou také přetrvávat a přežívat v drsných podmínkách prostředí produkcí endospor a tvorbou biofilmů. Tyto bakterie jsou schopny aktivovat specifickou sadu genů zapojených do sporulace, která trvá mnoho hodin, a probíhá v několika fázích, které nakonec vedou ke zralé spoře. Proces je znázorněn na obrázku 1.

Sporulace začíná vytvořením asymetrické přepážky, na které je malý oddíl pohlcen mateřskou buňkou. Následně se postupně vytváří typická struktura spor. Spory *B. cereus* jsou protáhlé, charakterizované jádrem obklopeným vnitřní membránou, peptidoglykanovou kůrou, vnitřním pláštěm a vnějším pláštěm (Smelt et al., 2014; Tuipulotu et al., 2021). Zkopírována bakteriální DNA je uzavřena do membránově vázaného jádra, které je propustné pouze pro některé malé molekuly a ionty včetně vody. Složitá struktura obalových struktur obklopuje jádro, které zadržuje velké molekuly a poskytuje mechanickou stabilitu. Základní plazma je naplněna vysokou koncentrací

kyseliny dipikolinové (spojené s ionty vápníku se stejnou molaritou) a malými proteiny rozpustnými v kyselině, zatímco je odstraněno značné množství vody (až 75 % vlhké hmotnosti) (Dittmann et al., 2015).



Obrázek 1 Tvorba spor sporo tvorným *B. cereus* (Vidic et al., 2020)



Obrázek 2 Struktura bakteriálních spor (Vidic et al., 2020)

Bakteriální spory (obrázek 2) mají téměř nulovou metabolickou aktivitu a jsou odolné vůči zahřívání, mrazu, vysychání, γ -papřskům a ultrafialovému záření, které by normálně usmrtily

vegetativní bakterie. Například hodnota $D_{95\text{ }^{\circ}\text{C}}$ ($203\text{ }^{\circ}\text{F}$) pro *B. cereus* odpovídá přibližně době 24 minut, nicméně jiné kmeny vykazují vyšší tepelnou odolnost, a proto jsou schopnější přežít teplotu varu. Dávka ozařování pro 90% snížení počtu je mezi 1,25 a 4 kGy, pro vegetativní buňky odpovídá pouze hodnotě 0,17-0,65 kGy. Mnohé studie prokázaly, že právě přítomnost vysoké koncentrace malých proteinů rozpustných v kyselém prostředí základní plazmy spory je klíčovým faktorem pro zajištění této odolnosti, čímž usnadňují přežívání spor v nehostinném prostředí, dokud se nevrátí příznivější podmínky (Dittmann et al., 2015; Griffiths a Schraft, 2017).

Když se podmínky stanou příznivými, např. za optimální teploty, spora začne klíčit a jádro spory se nakonec vyvine v novou vegetativní buňku. Ke klíčení spor může docházet v teplotním rozmezí od $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve vařené rýži a od $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $59\text{ }^{\circ}\text{C}$ v laboratorním médiu. Glycin, neutrální L-aminokyseliny a purinové nukleotidy vyvolávají klíčení, přičemž L-alanin je aminokyselinou podporující nejvíce klíčení. Prodloužení doby klíčení bakteriální spory může být způsobeno poruchou mechanismu germinace nebo narušeným vývojem vegetativního stavu (Griffiths a Schraft, 2017; Smelt et al., 2014).

Biofilmy jsou definovány jako bakteriální populace uzavřená v matrici, která přilne k sobě navzájem a/nebo povrchům (abiotickým i živým tkáním) nebo rozhraním. Tvoří se, když se stresované bakteriální buňky začnou připojovat k povrchu, a vylučují ochrannou vrstvu tvořenou extracelulárními polysacharidy, proteiny a nukleovými kyselinami (obrázek 3). Tato vrstva obaluje bakteriální populaci a poskytuje ji, jak ochranu, tak možnost pro interakci s prostředím (Chitrakar et al., 2019). *B. cereus* v biofilmech produkuje ve srovnání s planktonickými buňkami vyšší množství sekundárních metabolitů, enzymů, jako jsou katalázy a superoxiddismutázy, což přispívá k jeho obraně (Tuipulotu et al., 2021). Biofilmy se skládají převážně z vegetativních buněk, nicméně *B. cereus* je schopen tvořit spory i v rámci biofilmů (Huang, 2020).



Obrázek 3 Schematický diagram zvýrazňující fáze tvorby biofilmu u *B. subtilis* (Alav et al., 2018)

Přítomnost spor v biofilmu tak propůjčuje vysokou odolnost vůči nepříznivým vlivům a vysokou přilnavost k různým substrátům, včetně nerezové oceli, což je materiál široce používaný v potravinářských provozech. Jejich hydrofobní povaha spolu s přítomností nerovností na povrchu umožňuje sporám přilnout k několika typům povrchů snadněji než u vegetativních buněk. Spory vzniklé v biofilmu také vykazují odlišné vlastnosti od spor planktonických buněk. Jsou větší, mají vyšší tepelnou odolnost a nižší kapacitu klíčení. Zároveň mohou mít vyšší odolnost vůči environmentálním stresům, včetně sanitačních a antimikrobiálních látek široce používaných v potravinářském průmyslu (Huang, 2020; Majed et al., 2016). Například dle Faille et al. (2014) vykazovaly spory *B. cereus* odloučené z biofilmu větší odolnost vůči CIP (Clean-in-Place) než samotné biofilmy. Díky těmto vlastnostem pak mohou přetrvávat na různých zařízeních po dlouhou dobu a představovat zdroj kontaminace potravinářských produktů. V tabulce 2 jsou uvedeny faktory ovlivňující tvorbu biofilmu.

Tabulka 2 Působení faktorů prostředí na tvorbu bakteriálního biofilmu v potravinářských provozech (Pagán & García-Gonzalo, 2015)

Faktor	Obecný účinek
Textura	Drsný povrch podporuje iniciaci biofilmu
Hydrofobicita	Hydrofobní povrch podporuje uchycení bakterií s hydrofobními vlastnostmi
Povrchový náboj	Protikladné povrchové náboje substrátu a buňky podporují přichycení
Teplota	a) Nižší teploty vedou k jednodušším vlastnostem polysacharidů, které stimulují tvorbu biofilmu b) Nižší teploty snižují povrchové napětí buněk a úroveň hydrofobicity, což vede k nižší tvorbě biofilmu
Koncentrace kyslíku	Pokles koncentrace kyslíku v biofilmech snižuje bakteriální metabolickou aktivitu a inhibuje růst bakterií
Hydrodynamické účinky	Vyšší smykové rychlosti snižují uchycení bakterií, ale zvyšují hustotu a tloušťku biofilmů
Složení potravinové matrice	a) Vysoká osmolarita potravinové matrice inhibuje tvorbu biofilmu b) Vliv pH a iontové síly na tvorbu biofilmu prostřednictvím změn povrchové hydrofobicity a náboje
Mikrobiální interakce	Proměnlivý účinek

Studiu mikrobiálních biofilmů byla v posledních desetiletích věnována značná pozornost. Pro kultivaci a kvantifikaci biofilmů se v současné době používá řada různých metod, jako jsou zkumavkový test, radioaktivní značení, mikroskopie, test na agaru s kongo červení atd., nicméně Christensenova metoda a její modifikace stále patří mezi nejčastěji používané testy. Právě modifikace v mikrotitračních destičkách využívá toho, že jsou jamky mikrotitrační destičky použity jako

kultivační nádobka, následně jsou buňky biofilmu detekovány barvením a výsledky jsou měřeny spektrofotometricky (Stepanović et al., 2007).

2.6 Virulence *Bacillus cereus*

2.6.1 Toxiny

Bakterie skupiny *B. cereus*, které lze vzhledem k jejich rozšířenosti nalézt v různých potravinách, a které jsou schopny produkovat několik typů toxinů, jsou spojovány se dvěma odlišnými formami otrav z potravin: emetickým a průjmovým syndromem. Porovnání je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3 Srovnání onemocnění z potravin způsobená *Bacillus cereus* (Griffiths a Schraft, 2017)

Vlastnost	Průjmový syndrom	Emetický syndrom
Typ toxinu	Protein	Cyklický polypeptid
Tvorba toxinu	V tenkém střevě hostitele	V potravinách
Inkubační doba	8-16 hodin	0,5-5 hodin
Délka onemocnění	12-24 hodin (někdy >24 hodin)	6-24 hodin
Infekční dávka	10^5 - 10^7 požitých buněk	10^5 - 10^8 buněk/g potravin
Příznaky	Bolesti břicha, vodnatý průjem, občasná nevolnost	Nevolnost, zvracení, občasný průjem
Rizikové potraviny	Masné výrobky, polévky, mléko a mléčné výrobky, zelenina, pudinky a omáčky	Rýže, těstoviny, nudle, pečivo

Emetický typ otravy jídlem je způsoben požitím cereulidu, který se tvoří v potravinách, když se bakterie pomnoží na vyšší počet (tj. $>10^5$ CFU/g). Nicméně byla hlášena alimentární onemocnění způsobená i nižším počtem. Tento toxin je cyklický polypeptid kódovaný genem *ces*. Cereulid je termostabilní (121 °C po dobu 2 hodin při pH 7,0), což znesnadňuje jeho zničení běžně používanými ošetřeními. Také je vysoce odolný vůči proteázové aktivitě a zůstává aktivní v gastrointestinálním traktu díky toleranci k žaludeční kyselině. Jeho kumulace v potravinách tedy představuje potenciální riziko, protože není zničen při následné přípravě nebo výrobě potravin ani po průchodu gastrointestinálním traktem (Bourdichon et al., 2021; Gdoura-Ben et al., 2019). Nizozemský národní

institut pro veřejné zdraví a životní prostředí navrhl, že již dávka cereulidu 1,8 µg/kg tělesné hmotnosti vyvolává zvracení (Jovanovic et al., 2021).

Průjmový typ otravy jídlem je způsoben jedním nebo několika termolabilními enterotoxiny, které se mohou tvořit v tenkém střevě při požití vyššího počtu buněk *B. cereus*. Enterotoxiny produkované bakteriemi skupiny *B. cereus*, které hrají hlavní roli v průjmovém onemocnění, jsou hemolysin BL (HBL) kódovaný geny *hblA*, *hblB*, *hblC* a *hblD*; nehemolytický enterotoxin (NHE) kódovaný geny *nheA*, *nheB* a *nheC* a cytotoxin K kódovaný genem *cytK*. Tyto enterotoxiny způsobují poškození epiteliálních buněk tvorbou pórů, což vede k poškození mikrokloků, osmotické lýze střevních epiteliálních buněk a následnému průjmu (Gdoura-Ben et al., 2019; Tuipulotu et al., 2021).

Produkce toxinů je důležitým aspektem patogenity *B. cereus*, která způsobuje nejen obranu proti jiným mikroorganismům, ale i imunitní odpověď hostitele. Navíc při buněčné lýze způsobené toxiny dochází k uvolnění živin důležitých pro bakterie. K cytotoxicitě a hemolytické aktivitě přispívají také fosfolipázy, hemolyziny (kódované *HlyI*, *HlyII* a *HlyIII*), enterotoxin FM (kódovaný *entFM*) či enterotoxin T. Funkce enterotoxinu FM byla zpochybňována, jelikož nesdílí podobnost s jinými enterotoxiny a sám o sobě není cytotoxický. Přesto se podílí na motilitě, tvorbě biofilmu a adhezi k buňkám epitelu, které jsou důležité pro progresi infekce (Jovanovic et al., 2021). Zároveň se předpokládá, že funguje spíše jako peptidáza buněčné stěny než jako funkční enterotoxin, nicméně přesná role tohoto toxinu není známa a vyžaduje tedy další zkoumání (Tuipulotu et al., 2021).

Hemolýza je klíčovým faktorem mnoha kmenů *B. cereus*. Toxiny HBL, NHE a cytotoxin K díky své schopnosti tvořit póry také indukují hemolýzu. Nicméně *B. cereus* také exprimuje hemolytické toxiny, tzv. hemolyziny, které se přímo váží na membránu erytrocytů a způsobují tak jejich strukturální změny. Příkladem je hemolyzin I, který je schopen se vázat na cholesterol na buněčném povrchu a tvořit transmembránové póry během infekce (Tuipulotu et al., 2021).

Z důvodu omezení počtu ohnisek nálezů způsobených bakteriemi skupiny *B. cereus*, bylo vyvinuto úsilí, aby se zabránilo výskytu těchto bakterií v potravinářských komoditách. Prevence růstu *B. cereus* v potravinách je důležitá jak u kmenů produkujících emetický toxin, tak u kmenů produkujících další enterotoxiny. Tvorba enterotoxinu začíná ve fázi exponenciálního růstu, podobně jako u cereulidu. Pokud tedy chceme zabránit otravě jídlem vyvolané *B. cereus*, je důležité zabránit bakteriím dosáhnout nebo udržet počet buněk pod prahem 10^5 CFU /g způsobujícím intoxikaci. V průmyslovém prostředí mohou být přijata různá opatření k zabránění růstu *B. cereus*, jako je správná výrobní praxe (GMP), analýza rizik kritických kontrolních bodů (HACCP) ve výrobním procesu, hygienický design zařízení, vhodné postupy čištění a dezinfekce s použitím vysokých teplot

s následným rychlým ochlazením kvůli zabránění sporulaci, a kontrola chladicího řetězce během skladování a přepravy. Pokud jsou tyto postupy pečlivě dodržovány, měl by být počet potravin kontaminovaných *B. cereus*, a tedy riziko pro spotřebitele, minimalizováno (Jovanovic et al., 2021). Důležitým faktorem je i to, jak spotřebitel zachází s potravinami, jelikož četná ohniska jsou právě způsobena v důsledku nesprávné manipulace s potravinami v domácnosti. Toto zjištění zdůrazňuje potřebu pokračovat v poskytování informací spotřebitelům o důležitosti správného zacházení s potravinami v domácnostech. Je také zásadní zdůraznit význam etiket na potravinách, které spotřebitelům pomohou dodržovat pokyny pro přípravu, spotřebu a uchování potravin, čímž mohou zamezit například nedodržování vhodných podmínek skladování či tepelné úpravy (EFSA, 2015, 2023).

V současnosti však žádný legislativní předpis nevyžaduje systematický screening potravin na kontaminaci tímto patogenem. V rámci EU se jediné nařízení, které stanoví bezpečnostní limit pro *B. cereus* v potravinách, týká sušené počáteční kojenecké výživy se stanoveným maximálním limitem 50 CFU/g (Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007). Dle zprávy EFSA (2017) mezi nyní používaná účinná kontrolní opatření patří tepelné zpracování, vysoký hydrostatický tlak, pulzní světlo, ozáření, chemické dezinfekční prostředky a po výrobě udržovat potraviny chlazené při ≤ 7 °C (nejlépe při ≤ 4 °C). Většina těchto ošetření je relativně účinná proti vegetativním buňkám, ale některé z nich nedokážou inaktivovat spory a dosud žádná běžně používaná kontrolní metoda používaná v potravinářském průmyslu nedokáže inaktivovat cereulidové toxiny. Nicméně jako prevence se provádí kvantitativní stanovení emetického toxinu (cereulidu) pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) dle ČSN EN ISO 18465. K inaktivaci nejodolnějších bakteriálních spor je zapotřebí kombinace vysokého tlaku a vysoké teploty.

Klíčový význam pro určení virulence kmenů má identifikace toxinových genů, které jim propůjčují virulentní potenciál. Metody detekce toxinů a charakterizace kmenů pro produkci toxinů nejsou standardizovány. V důsledku toho není k dispozici žádná standardizovaná metoda pro rutinní použití při kontrole potravin. Některé pokročilé metody jsou však předmětem zkoumání (Vidic et al., 2020). Například byly vyvinuty metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR) pro hledání skupiny chromozomálních genů pro toxiny *Nhe*, *Hbl* a pro gen emetického toxinu *ces*. Použití těchto metod ukázalo, že geny zodpovědné za produkci toxinů mohou být poměrně rozšířené (Griffiths a Schraft, 2017).

2.6.2 Antibiotická rezistence

Alimentární ohniska způsobená *B. cereus* jsou obecně považována za benigní a spontánně odezní, tedy nevyžadují užívání antibiotik. Nicméně byly také zaznamenány i některé závažné nebo extrémně závažné případy, zejména u imunosuprimovaných osob. V těchto případech je antimikrobiální léčba důležitým prostředkem k eliminaci patogenů z potravin. V důsledku nesprávného či nadměrného užívání antibiotik vzniká antimikrobiální rezistence, což vede k selhání antibiotické léčby (Yu et al., 2019). Druhy ze skupiny *B. cereus* často vykazují rezistenci k β -laktamovým antibiotikům, jako jsou penicilin, ampicilin, amoxicilin, oxacilin, cefalotin a cefoxitin, která souvisí se schopností kmenů syntetizovat β -laktamázu, tedy enzym degradující β -laktamová antibiotika. Většina zástupců druhu *B. cereus* je také rezistentní ke kotrimoxazolu, fosfomycinu, streptomycinu, tetracyklinu, trimetoprimu a ceftriaxonu, v závislosti na kmenech bývají také rezistentní k ciprofloxacinu, klindamycinu, tetracyklinu a levofloxacinu. Naopak jsou zcela citlivé k chloramfenikolu, klindamycinu, vankomycinu, erytromycinu a gentamicinu (EFSA 2016; Haque et al., 2021).

Rezistence bakterií vůči antibiotikům představuje problém pro lidské zdraví, a proto je nutné vyhodnocovat různá antibiotika pomocí testů antimikrobiální citlivosti, aby bylo možné provést screening účinných antibiotik pro zajištění lepší kontroly onemocnění způsobených *B. cereus* z potravin (Haque et al., 2021).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit ucelenou literární rešerši zaměřenou na výskyt aerobních sporotvorných tyčinek v potravinách, včetně popisu faktorů, které mohou ovlivňovat jejich růst.

Hlavním cílem bylo v praktické části z mikrobiologicky nerizikových potravin izolovat a dostupnými metodami identifikovat sporotvorné bakterie a provést jejich charakterizaci. V rámci naplnění tohoto cíle byla pozornost zaměřena na:

- sledování působení teploty na růst,
- antibiotickou rezistenci,
- geny virulence,
- tvorbu biofilmu.

V neposlední řadě byly vyhodnoceny a diskutovány získané výsledky a z nich zformulovány závěry této práce.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Popis vzorků

Mikroorganismy byly izolovány z modelových vzorků pasterovaných masových pomazánek vyrobených pod vedením prof. Buňky Ing. Pětovou v Laboratoři výzkumu jakosti a bezpečnosti potravin na Katedře logistiky Fakulty vojenského leadershipu Univerzity obrany Brno v listopadu roku 2022. Dále byly mikroorganismy izolovány z lyofilizovaného ovoce. Vzorky ovoce byly zakoupeny v tržní síti, a také opět vyrobeny ve stejné laboratoři Univerzity obrany (v průběhu měsíců dubna a května v roce 2022).

3.2 Pomůcky, zařízení a použité chemikálie

Běžně používané zařízení a pomůcky:

- box, kahan, očkovací kličky, rukavice
- pipeta 10 μ l (Eppendorf), pipeta 20 μ l (Eppendorf), pipeta 100 μ l (Eppendorf), pipeta 200 μ l (Eppendorf), pipeta 1000 μ l (Eppendorf), pipeta 1-5 ml (Eppendorf), pipetovací špičky bez filtru různé velikosti
- sterilní Petriho misky \varnothing 60 mm a \varnothing 90 mm, 5ml zkumavky, stojánek na zkumavky
- VX-200 Vortex Mixer (Labnet), Biosan Vortex V-1 plus
- termostat
- mikroskop, mikroskopická sklíčka

Molekulárně biologické metody:

- sterilní 0,2ml, 1ml a 1,5ml mikrozkušavky, stojánky na mikrozkušavky
- špičky s filtrem
- kit DNeasy® Blood Tissue (QIAGEN)
- kit komponenty: PBS, proteináza K, Buffer AL, pufr W1, pufr W2, eluční pufr
- centrifuga MiniSpin (Eppendorf), Dry Block Termostat TDB-100 (Biosan)
- PCR komponenty: GoTaq R G2 Green Master Mix (Promega), Red Taq DNA Polymerase 2x Master Mix (VWR), primery FD1, FD2 (kapitola 3.4.3), další uvedeny v tabulce 5 (kapitola 3.6.2) a 6 (kapitola 3.7), PCR voda

- PCR cykler Bio-Rad C1000 Thermal Cycler
- Tecan Infinite M200 PRO
- Erlenmeyerova baňka, odměrný válec
- agaróza (SeaKem® LE Agarose for gel electrophoresis), 5× TAE pufr
- UV vizualizační činidlo Red gel
- Perfekt™ 100 bp DNA Ladder (EURx)
- elektroforéza multiSUB maxi, multiSUB mini
- UV transluminátor SynGene
- SPRIselect Bead-Based Reagent, magnetický stojánek (Magnetic Stand-96)

Testování vlivu působení teploty na růst (kapitola 5.6):

- centrifugační zkumavky typu Falcon
- osobní bioreaktor RTS-1C (Biosan)

Disková difuzní metoda (kapitola 5.7.1):

- zákaloměr (Densi-La-metr)
- umělohmotné sterilní zkumavky pro Densi-La-metr o objemu 10 ml
- antibiotické disky (amikacin, chloramfenikol, ciprofloxacin, klindamycin, erythromycin, gentamicin, imipenem, levofloxacin, meropenem, norfloxacin, penicilin G, tetracyklin, tobramycin, trimethoprim a vankomycin)
- pinzeta
- posuvné měřítko, černý papír

Biofilm

- 96jamková mikrotitrační destička
- Tecan Infinite M200 PRO

3.3 Příprava kultivačních médií a roztoků

BHI Broth (Brain Heart Infusion Agar)

- číslo šarže M210-500G, výrobce HiMedia Laboratories
- **složení:** 12,5 g telecí mozková infuse (sušina), 5 g mozkovo srdcová infuse (sušina), 10 g proteosový pepton, 5 g chlorid sodný, 2,5 g hydrogenfosforečnan (di)sodný, 2 g dextróza
- **použití:** Pro pomnožení a kultivaci nutričně náročných mikroorganismů
- **příprava:** Naváženo 37,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody, zahříváno do úplného rozpuštění, rozplněno do zkumavek a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.
- **příprava BHI agaru:** Naváženo 14,8 g přípravku a 6 g agaru do 400 ml destilované vody, zahříváno do úplného rozpuštění a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Před naléváním na Petriho misky důkladně promícháno.

Nutrient Broth

- číslo šarže M002-500G, výrobce HiMedia Laboratories
- **složení:** 5 g/l masový pepton, 1,5 g/l hovězí extrakt, 1,5 g/l kvasničný extrakt, 1,5 g/l chlorid sodný
- **použití:** Obecně použitelné tekuté kultivační médium
- **příprava:** Naváženo 13,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody, zahříváno do úplného rozpuštění a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Mueller Hinton Agar, MHA

- číslo šarže M173-500G, výrobce HiMedia Laboratories
- **složení:** 300 g/l hovězí masová infuse, 17,5 g/l enzymatický hydrolyzát kaseinu, 1,5 g/l škrob, 17 g/l agar
- **použití:** Pro stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám difusní diskovou metodou. Složení přípravku odpovídá požadavkům ČSN EN ISO 10272-1
- **příprava:** Naváženo 38,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody, zahříváno do úplného rozpuštění a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Před naléváním na Petriho misky důkladně promícháno.

Fyziologický roztok

- **použití:** Pro potřeby ředění vzorků
- **příprava:** Naváženo 4,3 g chloridu sodného do 500 ml destilované vody, zahříváno do úplného rozpuštění a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

3.4 Izolace a identifikace

3.4.1 Zhodnocení čistoty kultur

Kultury mikroorganismů, které byly použity v této diplomové práci, byly ze vzorků potravin vyizolovány Ing. Bábkovou, Ing. Huňovou v rámci jejich probíhajících studií běžnými metodami využívanými pro izolaci mikroorganismů z potravin a byly poskytnuty s jejich laskavým svolením.

Nejprve byla zhodnocena velikost a morfologie kolonií po křížovém roztěru. Bylo nutné, aby se na miskách vyskytovaly pouze kolonie stejné morfologie, protože různě vyhlížející kolonie obvykle značí přítomnost jiných druhů. Zhodnocení čistoty vybraných narostlých kolonií byla poté provedena Gramovým barvením a následným mikroskopováním.

Vybrané kmeny byly z BHI půdy přeočkovány do BHI bujonu. Po 24hodinové kultivaci byla vzniklá suspenze mikroorganismů přenesena pomocí pipety na podložní sklo a ponechána na vzduchu zaschnout, případně se zafixovala plamenem kahanu. Takto zaschlý vzorek byl zakápnut roztokem krystalové violeti. Roztok se nechal působit po dobu 60 sekund. Dále byl bez oplachu převrstven Lugolovým roztokem, který se nechá působit opět po dobu 60 vteřin. Následně byl roztok rychle smyt destilovanou vodou během 1 sekundy a odbarven acetonem do odtékání barvy, maximálně však po dobu 25 sekund. Nakonec se preparát dobarví roztokem safraninu. Jeho převrstvení probíhalo 1 minutu, poté byl opláchnut destilovanou vodou. Preparát byl usušen vložení mezi dva filtrační papíry. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí mikroskopu. Mikroorganismy s gram pozitivní buněčnou stěnou se barvily modře, naopak gram negativní měly barvu buněk červenou.

3.4.2 Izolace DNA

Izolace byla provedena podle protokolu doporučeného výrobcem izolačního kitu DNeasy® Blood Tissue (QIAGEN).

Pipetou byl z BHI bujonu odebrán 1 ml kultury, která byla přenesena do čisté 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky typu Eppendorf a umístěna do rotoru centrifugy a centrifugována (14 500 rpm; 5 minut). Přebytečný supernatant byl odstraněn a byly přidány tři roztoky: 200 µl PBS,

20 μ l proteinázy K a 200 μ l DNA vazebného pufru (Buffer AL). Vzniklá směs se důkladně promíchala pomocí míchadla vortexu po dobu 1 minuty a poté byl vzorek centrifugován (6000 rpm; 30 sekund).

Následně byla směs 10 minut inkubována v termobloku při teplotě 56 °C, převedena do kolonky na sběrné zkumavce a bylo k ní přidáno 200 μ l ethanolu. Celý set byl jemně zamíchán pomocí vortexu a centrifugován (8 000 rpm; 1 minuta). Supernatant byl odstraněn a bylo přidáno 500 μ l pufru W1, poté byl set centrifugován (8 000 rpm; 1 minuta). Roztok prošlý filtrem kolonky byl opět odstraněn a bylo přidáno 500 μ l pufru W2. Kolonka byla centrifugována (14 000 rpm; 3 minuty), aby došlo k odstranění zbytkového promývacího pufru.

Kolonka s navázanou DNA byla přenesena do nové mikrocentrifugační zkumavky a do kolonky bylo pipetováno 100 μ l elučního pufru (Elution buffer). Po uplynutí 10 minut, byl kolonkový set centrifugován (8 000 rpm; 1 minuta). Během centrifugace došlo k uvolnění DNA z kolonky a její shromáždění ve sběrné zkumavce.

Stanovení koncentrace DNA bylo provedeno spektrofotometricky na přístroji Tecan Infinite M200 PRO, kde byla destička proměřována při vlnové délce 260 a 280 nm. Jako slepý (negativní) vzorek (blank) zde byl použit eluční pufr.

3.4.3 Amplifikace DNA genů pro sekvenaci 16S rRNA

Do sterilní 1,5ml mikrozukavky byla v PCR boxu připravena směs mastermixu dle doporučení výrobce, jejíž složení pro 1 reakční směs o celkovém objemu 20 μ l obsahovalo: 10 μ l GoTaq Hot Start Green MM, 7 μ l PCR vody, 1 μ l primeru FD1 a 1 μ l primeru RD1. Všechny komponenty byly před přípravou mastermixu promíchány pomocí vortexu. Dále byl promíchán i samotný mastermix, který byl následně rozpipetován po 19 μ l do popsanych a nachystanych sterilnich 0,2 ml mikrozukavek.

Následně byl do každé mikrozukavky ještě přidán 1 μ l DNA a obsah každé zkumavky byl krátce stočen. V případě negativní kontroly byla DNA nahrazena 1 μ l PCR vody. Mikrozukavky byly poté umístěny do PCR cykleru Bio-Rad C1000 Thermal Cycler a byl použit předvolený program upravený dle protokolu (anealingové teploty) použitých primerů. Počáteční denaturace probíhala po dobu 5 min při 95 °C; následovalo 35 cyklů denaturace při 92 °C po dobu 60 s, annealingu při 55 °C po dobu 30 s, extenze při 72 °C po dobu 1 min; a závěrečná extenze při 72 °C po dobu 5 min. Takto připravené vzorky byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy.

3.4.4 Vizualizace DNA

Během přípravy gelové elektroforézy bylo nutné začít ředěním zásobního 10×koncentrovaného TAE roztoku na pracovní koncentraci 1× TAE. Jeden litr tohoto pracovního roztoku byl výsledkem smíchání 100 ml 10× TAE s 900 ml destilované vody.

Dle délky amplifikovaného úseku DNA byl pro účely detekce připravován 1% agarózový gel. Použitím mikrovlnné trouby byly v Erlenmeyerově baňce rozvařeny 1 g agarózy v 100 ml 1× TAE. Po úplném rozvaření bez viditelných částic byly přidány 2 kapky vizualizačního činidla pro DNA (Red gel). Ochlazený obsah baňky byl následně nalit do připravené elektroforetické vaničky o objemu cca 100 ml s umístěnými hřebínky pro požadované množství jamek. Takto připravený gel se nechal ztuhnout při pokojové teplotě alespoň po dobu půl hodiny.

Po vyjmutí čel vaničky a hřebíků se tuhý gel vložil do elektroforetické nádoby zaplněné 1 × TAE tak, aby byl gel zcela ponořen. Do první a poslední jamky gelu byl napipetován velikostní standard 100 bp DNA Ladder o objemu 3 µl, následně byly aplikovány 4 µl analyzovaných vzorků včetně negativní kontroly. Před nanášením jednotlivých vzorků byl vždy celý objem dokonale promíchán pomocí pipety. Následně byla elektroforetická nádoba uzavřena a spuštěna při elektrickém napětí 90 V po dobu 40 minut.

Po proběhnuté separaci vzorků byl zdroj odpojen, gel s vaničkou vyndán a amplikony DNA vizualizovány pomocí UV transluminátoru SynGene. Gel byl vyfocen pomocí programu GeneSnap (<https://genesnap-from-syngene.software.informer.com/7.1/>) a pořízený snímek byl popsán a vyhodnocen pomocí odhadu velikosti úseků DNA oproti velikostnímu standardu.

3.4.5 Purifikace

Získaná DNA byla přečištěna podle protokolu výrobce kitu na bázi magnetických kuliček (SPRIselect Bead-Based Reagent).

Nejprve bylo do mikrozkušavek k PCR produktu přidáno množství kuliček v poměru 1:1, tj. 15 µl a vzniklá suspenze byla důkladně promíchána na vortexu a inkubována 10 min při pokojové teplotě. Poté byl obsah mikrozkušavek přepipetován do mikrotitrační destičky, která byla umístěna na magnetický stojánek po dobu 4 min. Supernatant byl odstraněn a kuličky s navázanou DNA byly promyty 180 µl 85% ethanolu. Po uplynutí 4 minut byl odstraněn ethanol a kuličky byly vysoušeny v termobloku po dobu asi 5 minut. Následně byly kuličky pomocí pipety důkladně promíchány v 30 µl PCR vody a inkubovány 4 minuty mimo magnetický stojánek. Dále byly zkumavky umístěny

na magnetický stojánek po dobu 2 minut. Nakonec bylo do mikrozkušavek odebráno 15 μ l supernatantu, jež obsahoval přečištěnou DNA.

Takto přečištěné vzorky byly označeny a poslány na sekvenaci do laboratoře společnosti SEQme (Dobříš).

3.4.6 Identifikace izolovaných mikroorganismů sekvenací produktů PCR

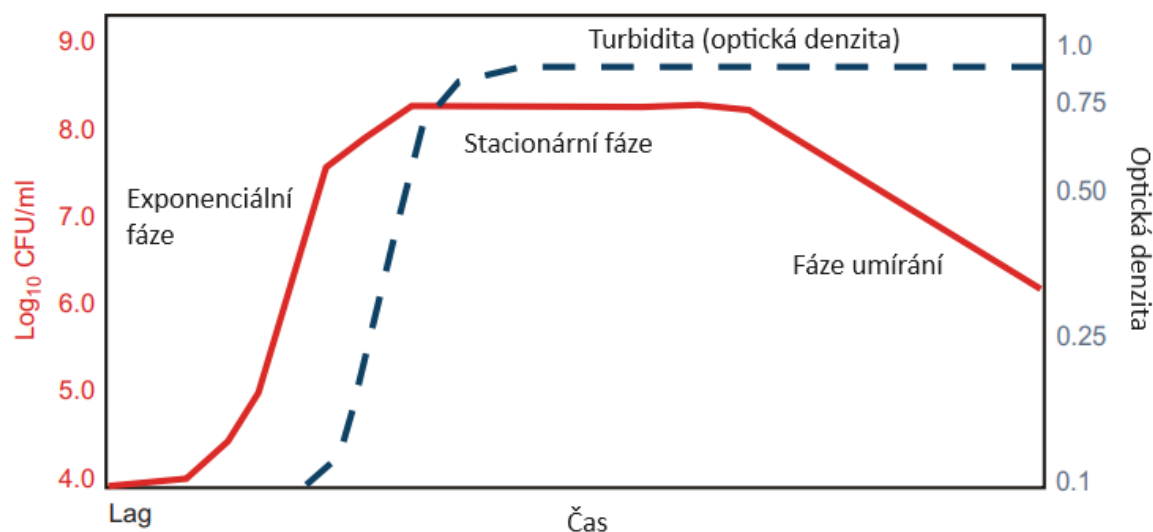
Získané sekvence obsahovaly místa, která přístroj nedokázal zaznamenat. K jejich úpravě byl použit program DNA Baser Assembler (<https://mybiosoftware.com/dna-baser-3-2-5-dna-sequence-assembly-analysis.html>), kdy správná chybějící báze byla přidána pomocí určení nejvyššího píku v chromatogramu upravované sekvence. Editované neznámé sekvence byly převedeny do formátu FASTA a následně srovnány s nejpodobnějšími známými sekvencemi z databází pomocí specializovaného softwaru BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), který je bezplatně k přístupu na adrese <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

3.5 Testování vlivu působení teploty na růst

Vybrané kmeny byly z BHI půdy přeočkovány do BHI bujónu. Po 24hodinové kultivaci bylo do zkumavek označených dle příslušných kmenů napipetováno 1 ml inokula a dobře promícháno ve fyziologickém roztoku. Zákal získané suspenze byl měřen denzimetrem, jelikož výsledný zákal musel odpovídat hustotě 0,5 dle McFarlanda. Sterilní a označené centrifugační zkumavky typu Falcon byly naplněny 30 ml NUTRI bujónu a poté zaočkovány 50 μ l suspenze mikroorganismů. Bylo důležité, víčka zkumavek pečlivě utáhnout.

Následně byly zkumavky umístěny do osobního bioreaktoru RTS-1C (Biosan), v programu RTS-1 byly nastaveny parametry kultivace a byla spuštěna inkubace po dobu 24 hodin. Nastavené parametry byly následující: rychlost otáček 500 rpm, frekvence reverzních otáček 1 s⁻¹, objem vzorku 30 ml, frekvence měření 30 min a teplota (25 °C, 30 °C a 40 °C).

Vyhodnocení růstu bakterií bylo provedeno ze získaných dat sestavením růstové křivky (viz. Obrázek 4) závislosti optické hustoty kultury (OD₈₅₀) na čase (t) v závislosti na teplotě.



Obrázek 4 Typická růstová křivka bakteriální populace získaná dvěma metodami sledujícími růst (dle Maier a Pepper, 2015)

3.6 Testování citlivosti na antibiotika

3.6.1 Disková difúzní metoda

Testování antimikrobiální rezistence pomocí diskové difúzní metody bylo založené na pokynech Evropského výboru pro testování antimikrobiální citlivosti (European Committee on antimicrobial susceptibility testing; EUCAST) (EUCAST, 2023). Vybrané kmeny byly naočkovány na BHI půdy a následně přeočkovány do BHI bujonu.

Po 24hodinové kultivaci byl do označených zkumavek příslušných kmenů napipetován 1 ml inokula a vše bylo dobře promícháno ve fyziologickém roztoku. Výsledný zákal (denzita) získané suspenze byla měřena denzimetrem (Densi-La-metr), jelikož musela odpovídat standardu 0,5 dle McFarlanda. Připravené inokulum se očkovovalo na Mueller Hinton agar pomocí pipety, kdy se na povrch půdy napipetoval 1 ml suspenze a krouživým pohybem se rozlil po celé její ploše, aby došlo k rovnoměrnému rozmístění inokula. Bylo důležité, plotnu nechat dobře uschnout, přibližně po dobu 10 minut. Přebytkovou tekutinu bylo možné odsát.

Následně byly na Petriho misku umístěny pomocí sterilní pinzety příslušné antibiotické disky (Oxoid), každý disk bylo potřeba jemně přitisknout, aby celá jeho plocha byla v kontaktu s povrchem půdy. Na jednu plotnu se vždy pokládalo maximálně 6 disků uspořádaných do kruhu.

Pro každý kmen bylo použito 15 různých antibiotických disků. Testované antimikrobiální látky a jejich koncentrace jsou uvedeny v tabulce 4).

Po aerobní inkubaci v termostatu při 35 °C po dobu 18 hodin byla stanovena citlivost každého izolátu pro každou antimikrobiální látku měřením inhibiční zóny (v mm). Výsledky byly interpretovány jako citlivé (C), intermediární (I) a rezistentní (R) v souladu dle kritérií EUCAST pro *Bacillus* spp. S výjimkou antibiotik amikacinu, chloramfenikolu, gentamycinu penicilinu G, tetracyklinu, tobramycinu a trimethoprimu, jelikož nebyla definována specifická kritéria pro *Bacillus* spp. ani v EUCAST, ani v pokynech institutu pro klinické a laboratorní standardy (Clinical & Laboratory Standards Institute; CSLI). Pro tyto antimikrobiální látky byly tedy přijaty hraniční hodnoty určené *Staphylococcus* spp. (EUCAST, 2023)

Tabulka 4 Hraniční průměry inhibičních zón pro *Bacillus* spp. u testovaných antibiotik (dle metodiky EUCAST)

Antibiotikum	zkratka	obsah disku v μg	průměr inhibiční zóny v mm pro kategorii		
			citlivý \geq	intermediární	rezistentní \leq
Imipenem	IPM	10	30	-	29
Meropenem	MRP	10	25	-	24
Ciprofloxacin	CIP	5	50	24-49	23
Levofloxacin	LE	5	50	24-49	23
Norfloxacin	NX	5	21	-	20
Vancomycin	VA	10	10	-	9
Erythromycin	E	5	24	-	23
Clindamycin	CD	2	17	-	16
Penicilin	P	1	29	-	28
Chloramfenikol	C	30	18	13-17	12
Gentamycin	HLG	120	15	13-14	12
Amikacin	AK	30	17	15-16	14
Tetracyklin	TE	10	19	15-18	14
Sulfamethazol / trimethoprim	TR	5	16	11-15	10
Tobramycin	TOB	10	15	13-14	12

3.6.2 Detekce genů antimikrobiální rezistence pomocí PCR

Tato metoda byla aplikována pouze u mikroorganismů, u kterých byla prokázána rezistence pomocí diskové difúzní metody. Geny, u kterých byla testována jejich přítomnost a sekvence jejich primerů, jsou uvedeny v tabulce 5.

Nejdříve byly uvnitř PCR boxu nachystány zásobní roztoky příslušných primerů přidáním PCR vody v objemu udávaném dodavatelem primerů, aby byla získána odpovídající koncentrace 100 μM . Vzniklé premixy byly zředěny na pracovní koncentraci 10 μM , tj. napipetováním 90 μl PCR

vody a 10 µl zásobního roztoku primeru do 0,5 ml sterilní mikrozkušavky. Všechny komponenty byly před začátkem práce promíchány pomocí vortexu. Výsledné premixy byly stočeny.

Tabulka 5 Použité primery pro detekci vybraných genů antibiotické rezistence

Skupina ATB	Geny	Primery	Sekvence	Reference
<i>betalaktamová</i>	<i>penp</i>	penp-ST-F	TTGTTACATATTCTCCAATCACAG	Wash et al. (2022)
		penp-ST-R	GGCCAAACGATAGCAATG	
	<i>blaOXA</i>	blaOXA-S-F	TGGGACGGGGTCAAGCG	
		blaOXA-S-R	TCTTGAATCATCATGCGCTTGAC	
	<i>blaZ</i>	blazF	ACTTCAAC ACCTGCTGCTTTC	Youssif et al. (2021)
		blazR	TGACCACTTTTATCAGCAACC	
<i>linkosamidy</i>	<i>vmiR</i>	vmlR-S-F	GAAGCGTACGGATGCCC	Wash et al. (2022)
		vmlR-S-R	CCAGCACTTCTTGTCTTTCTG	
	<i>ImrB</i>	lmrB-S-F	GATGCCGATTATGATTTCCCTTG	
		lmrB-S-R	ATCGGCAGAAGCAGCATAG	
<i>mphK</i>	mph-2-SH-F	AATCGGGATGAATCTGCCTATGTA		
	mph-2-SH-R	CACCTGCCACCGACTCTCTGA		
<i>makrolidová</i>	<i>ermB</i>	ErmB-F	CATTTAACGACGAAACTGGC	Youssif et al. (2021)
		ErmB-R	GGAACATCTGTGGTATGGCG	
	<i>ermC</i>	ErmC-F	ATCTTTGAAATCGGCTCAGG	
		ErmC-R	CAAACCCGTATTCCACGATT	
<i>fluorochinolony</i>	<i>norA</i>	norA-F	TTCACCAAGCCATCAAAAAG	
		norA-R	CTTGCCTTTCTCCAGCAATA	

Posléze byl do sterilní 1,5ml mikrozkušavky v PCR boxu připraven mastermix dle doporučení výrobce kitu, jejíž složení pro 1 reakční směs o celkovém objemu 20 µl bylo následující: 10 µl GoTaq Hot Start Green MM, 7 µl PCR vody, 1 µl primeru F a 1 µl primeru R daného genu. Všechny komponenty byly před přípravou mastermixu promíchány pomocí vortexu. Dále byl promíchán i samotný mastermix, který byl následně rozpipetován po 19 µl do popsaných a připravených sterilních 0,2 ml mikrozkušavek.

Následně byl do každé mikrozkušavky ještě přidán 1 µl DNA a obsah každé zkušavky byl krátce stočen. V případě negativní kontroly byla DNA nahrazena 1 µl PCR vody. Mikrozkušavky byly poté umístěny do PCR cykleru a byl spuštěn předvolený program: počáteční denaturace po dobu 3 min při 95 °C; následně 34 cyklů denaturace při 95 °C po dobu 30 s, teplota annealingu (pro každý

gen uvedena v tabulce 6) po dobu 30 s, extenze při 72 °C po dobu 1 min; a závěrečná extenze při 72 °C po dobu 10 min. Po proběhnutí reakce byly vzorky podrobeny gelové elektroforéze.

Tabulka 6 Teploty annealigu pro použité sady primerů k testování genů antibiotické rezistence

Geny	Primery	Teplota annealingu (°C)
<i>penp</i>	penp-ST-F	54
	penp-ST-R	
<i>blaOXA</i>	blaOXA-S-F	63
	blaOXA-S-R	
<i>blaZ</i>	blazF	54
	blazR	
<i>vmlR</i>	vmlR-S-F	56
	vmlR-S-R	
<i>lmrB</i>	lmrB-S-F	60
	lmrB-S-R	
<i>mphK</i>	mph-2-SH-F	63
	mph-2-SH-R	
<i>ermB</i>	ErmB-F	53
	ErmB-R	
<i>ermC</i>	ErmC-F	53
	ErmC-R	
<i>norA</i>	norA-F	54
	norA-R	

Dle očekávané délky amplifikovaného úseku DNA byl připravován 1,5% agarózový gel. Pomocí mikrovlnné trouby byly v Erlenmeyerově baňce rozvařeny 3,75 g agarózy v 250 ml 1× TAE pufru. Po úplném rozvaření bez viditelných částic bylo přidáno 5 kapek vizualizačního činidla pro DNA (Red gel). Ochlazený obsah baňky byl následně nalit do připravené elektroforetické vaničky o objemu cca 250 ml s umístěnými hřebínky pro požadované množství jamek. Takto připravený gel se nechal ztuhnout při pokojové teplotě alespoň po dobu 1 hodiny.

Po vyjmutí čel vaničky a hřebínků se tuhý gel vložil do elektroforetické vany zaplněné 1× TAE tak, aby byl gel zcela ponořen. Do první a poslední jamky gelu byl napipetován velikostní standard Perfekt™ 100 bp DNA Ladder (EURx) o objemu 3 µl, následně byly aplikovány 4 µl analyzovaných vzorků včetně negativní kontroly. Před nanášením jednotlivých vzorků byl vždy celý objem dokonale promíchán pomocí pipety. Následně byla elektroforetická nádoba uzavřena a spuštěna při elektrickém napětí 90 V po dobu 1 hodiny a 20 minut.

Po proběhnuté separaci vzorků byl zdroj odpojen, gel s vaničkou vyndán a úseky DNA vizualizovány pomocí UV transluminátoru SynGene. Gel byl zdokumentován pomocí programu GeneSnap from SynGene a pořízený snímek byl popsán a vyhodnocen pomocí odhadu velikosti úseků DNA oproti velikostnímu standardu.

3.7 Detekce genů virulence pomocí PCR

Tato metoda byla aplikována pouze u mikroorganismů identifikovaných jako *Bacillus cereus*. Použité primery jsou uvedeny v tabulce 7.

Postup přípravy primerů i PCR směsi byl stejný, jako je popsán v kapitole 5.7.2. Následně byly mikrokumavky umístěny do PCR cykleru Bio-Rad C1000 Thermal Cycler a nastaven program dle publikace Owusu-Kwarteng et al. (2017): počáteční denaturace po dobu 3 min při 95 °C; následně 35 cyklů denaturace při 94 °C po dobu 30 s, annealing při 58 °C po dobu 45 s, extenze při 72 °C po dobu 1,5 min; a závěrečná extenze při 72 °C po dobu 5 min. Po proběhnuté reakci byly vzorky podrobeny gelové elektroforéze, jak je popsáno výše v kapitole 5.7.2.

Tabulka 7 Primery použité pro detekci genů virulence

Geny	Primery	Sekvence (5'-3')	Reference
<i>hblA</i>	HBLA1	GTGCAGATGTTGATGCCGAT	Owusu-Kwarteng et al. (2017)
	HBLA2	ATGCCACTGCGTGGACATAT	
<i>hblC</i>	L2A	AATGGTCATCGGAACTCTAT	
	L2B	CTCGCTGTTCTGCTGTTAAT	
<i>hblD</i>	L1A	AATCAAGAGCTGTCACGAAT	
	L1B	CACCAATTGACCATGCTAAT	
<i>nheA</i>	nheA 344 S	TACGCTAAGGAGGGGCA	
	nheA 843 A	GTTTTTATTGCTTCATCGGCT	
<i>nheB</i>	nheB 1500 S	CTATCAGCACTTATGGCAG	
	nheB 2269 A	ACTCCTAGCGGTGTTCC	
<i>nheC</i>	nheC 2820 S	CGGTAGTGATTGCTGGG	
	nheC 3401 A	CAGCATTCGTACTIONGCCAA	
<i>cytK</i>	CK-F-1859	ACAGATATCGG(GT)CAAAATGC	
	CK-R-2668	TCCAACCCAGTT(AT)(GC)CAGTTC	
<i>entFM</i>	ENTA	ATGAAAAAAGTAATTTGCAGG	
	ENTB	TTAGTATGCTTTTGTGTAACC	
<i>Ces</i>	cesF1	GGTGACACATTATCATATAAGGTG	
	cesR2	GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA	
<i>hlyA</i>	FHEMAF	CGTGAGAAAGCAAAACGC	Kim et al. (2015)
	FHEMAR	TCAACAGAAACTGGAGAATGAT	
<i>hlyII</i>	FHLYII	GATTCTAAAGGAACTGTAG	
	RHLYII	GGTTATCAAGAGTAACTTG	
<i>hlyIII</i>	bchem1	AATGACACGAATGACACAAT	
	bchem4	TCATCGCACTACCACCTAAT	
<i>cerA</i>	cerA1	ACTGAGTTAGAGAACGGTAT	
	cerA2	CGCTTACCTGTCATTGGTGT	
<i>cerB</i>	cerB1	TCGTAGTAGTGGAAGCGAAT	
	cerB2	AGTCGCTGTATGTCCAGTAT	
<i>cerO</i>	cerOf	GTATCTACTTGGAATSAAAAG	
	cerOr	TAATCTGTATTGTTATGAAC	

3.8 Testování tvorby biofilmu

Pro kultivaci a kvantifikaci biofilmu byla využita modifikovaná Christensenova metoda s využitím mikrotitrační destičky.

Z vybraných testovaných bakterií byly připraveny suspenze ve fyziologickém roztoku tak, aby jejich denzita odpovídala zákalu o hodnotě 1,0 McFarlandovy stupnice. Do připravené mikrotitrační destičky bylo do každého sloupce pipetováno 200 μ l BHI bujónu. Následně bylo do každé jamky A-F řádku přidáno 10 μ l suspenze bakterií. Vždy 3 jamky příslušely jednomu mikroorganismu, poslední 3 obsahovaly pouze čistý bujón a sloužily pro kontrolu sterility (obrázek 5). Takto připravená destička byla inkubována po dobu 24 hodin v termostatu při teplotě 35 °C.

Následující den, po uplynutí doby inkubace, byl obsah destičky vylit do odpadní nádoby a 3krát opatrně promyt destilovanou vodou. Následně bylo do všech jamek přidáno 150 μ l krystalové violeti a destička byla inkubována při pokojové teplotě 30 minut. Po uplynutí dané doby bylo barvivo z jamek odstraněno propláchnutím destilovanou vodou, vyklepáním do odpadní nádoby a destička byla ponechána uschnout. Poté bylo pomocí pipety aplikováno 200 μ l 96% etanolu, který se následně nechal působit po dobu 15 minut, aby vyluhoval přebývajícím barvivo ze stěn jamek. Nakonec byl obsah destičky opět vylit do odpadní nádoby (Šilhová-Hrušková et al., 2015).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1H*	B21B	I1H	B43	B7	B7C	B28C	B23A	C2H	B4D	B2H	B1H
B												
C												
D	B27B	B3G	B11E	B18H	B14C	B4H	B15	B11H	B82	B81	B18B	NK
E												
F												

Obrázek 5 Schéma nanesení vzorků do mikrotitrační destičky

* analyzované kmeny bakterií; NK – negativní kontrola

Vyhodnocení bylo provedeno spektrofotometricky na přístroji Tecan Infinite M200 PRO, kde byla destička proměřována při vlnové délce 595 nm. Jako blank bylo použito čisté médium BHI.

Interpretace získaných výsledků vyžadovala stanovení hraniční hodnoty, která oddělila kmeny produkující biofilm od kmenů neprodukcujících biofilm. Výsledná data ze spektrofotometru byla zprůměrována, jelikož všechny testy byly provedeny v trojím opakování. Průměrné hodnoty optické denzity (OD) se vypočítaly pro všechny testované kmeny a jamky s čistým bujónem (negativní

kontroly). Následně byla stanovena hraniční hodnota (OD_c), definována jako součet průměrné hodnoty OD pro negativní kontroly a trojnásobek směrodatné odchylky (SD). Takto získané výsledky byly rozděleny do tří kategorií na základě porovnání naměřených hodnot OD proti vypočtené hraniční hodnotě (Stepanović et al., 2007).

- Kmen netvoří biofilm: $OD \leq OD_c$
- Kmen slabě tvoří biofilm: $OD_c < OD \leq 2 OD_c$
- Kmen silně tvoří biofilm: $2 OD_c \geq OD$

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Identifikace bakterií pomocí sekvenace bazí

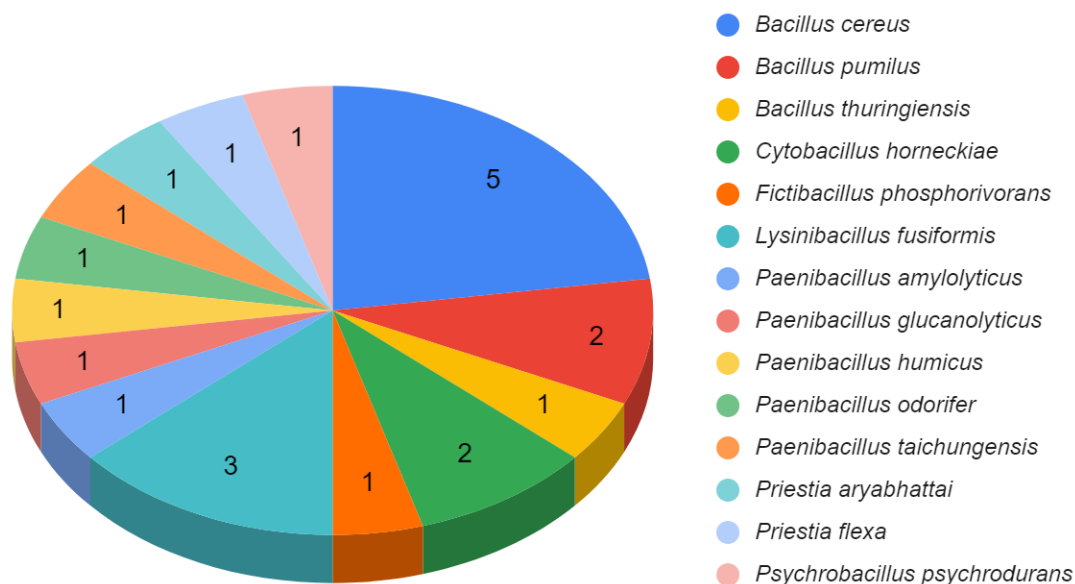
Všechny bakteriální kmeny byly identifikovány s použitím sekvenace genu pro 16S rRNA. V tabulce 8 jsou zaznamenány hodnoty shody v procentech s identifikovanými bakteriální kmeny.

Tabulka 8 Výsledky identifikace bakterií sekvenací genů pro 16S rRNA

Testované bakterie	Sekvenace bazí – shoda (%)	Identifikované bakterie
B7	100	<i>Bacillus cereus</i>
B11E	99	<i>Bacillus cereus</i>
B21B	100	<i>Bacillus cereus</i>
B27B	100	<i>Bacillus cereus</i>
B82	99	<i>Bacillus cereus</i>
B4D	100	<i>Bacillus pumilus</i>
B14C	99	<i>Bacillus pumilus</i>
B81	100	<i>Bacillus thuringiensis</i>
B1H	100	<i>Cytobacillus horneckiae</i>
C1H	100	<i>Cytobacillus horneckiae</i>
B23A	99	<i>Fictibacillus phosphorivorans</i>
B2H	100	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
B4H	100	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
B28C	100	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
B18H	99	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>
C2H	100	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>
I1H	99	<i>Paenibacillus humicus</i>
B3G	100	<i>Paenibacillus odorifer</i>
B43	100	<i>Paenibacillus taichungensis</i>
B11H	99	<i>Priestia aryabhatai</i>
B15	100	<i>Priestia flexa</i>
B7C	99	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>

Sekvenací genů pro 16S rRNA bylo identifikováno celkem 22 grampozitivních kmenů, mezi zjištěné kmeny patřili zástupci rodů *Bacillus* (*B. cereus*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*), *Cytobacillus* (*C. horneckiae*), *Fictibacillus* (*F. phosphorivorans*), *Lysinibacillus* (*L. fusiformis*), *Paenibacillus* (*P. amylolyticus*, *P. glucanolyticus*, *P. humicus*, *P. odorifer*, *P. taichungensis*), *Priestia* (*Pr. aryabhatai*, *Pr. flexa*) a rodu *Psychrobacillus* (*Ps. psychrodurans*). Pro lepší znázornění je

zastoupení jednotlivých identifikovaných druhů uvedeno na obrázku 6 Identifikace sporotvorných tyčinek dosahovala vysoké míry shody, ve většině případů byla 100%.

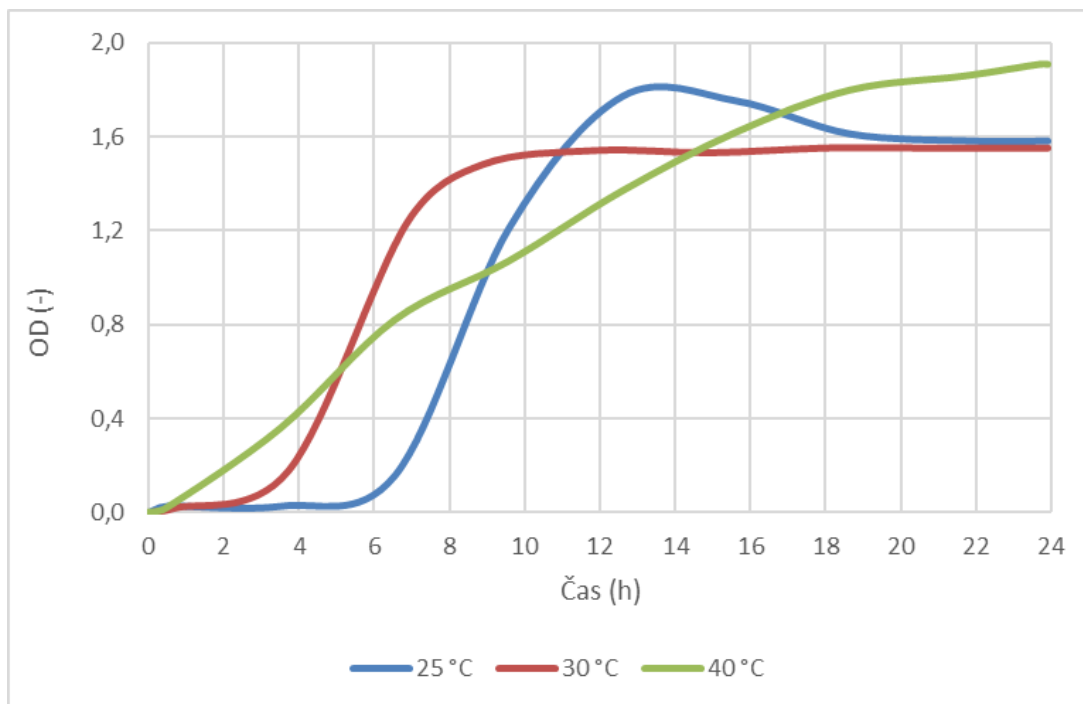
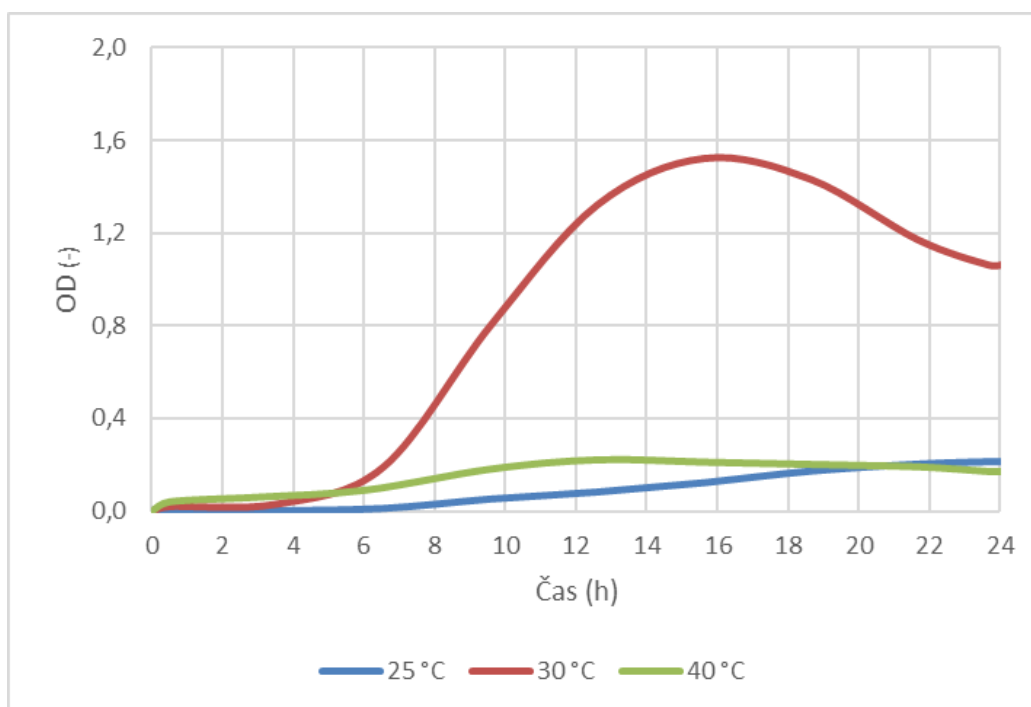


Obrázek 6 Vyhodnocení podílu identifikovaných kmenů podle příslušných druhů

4.2 Testování vlivu působení teploty na růst

Vyhodnocení růstu bakterií bylo provedeno ze získaných dat sestavením růstové křivky závislosti optické hustoty kultury (OD_{850}) na čase (t). Na obrázcích 6-14 jsou vyobrazeny jednotlivé růstové křivky pro testované bakteriální kmeny získané kultivací za 3 různých teplot. U každé teploty byla provedena 2 měření, z nichž byly výsledky zprůměrovány.

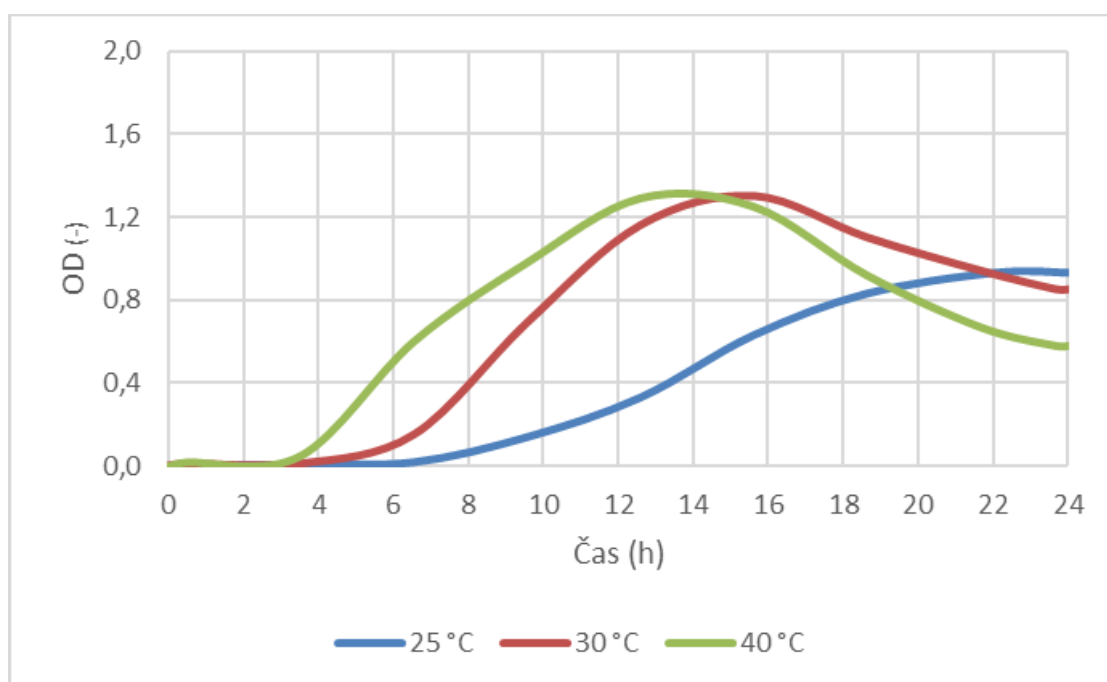
Na růstové křivce *Bacillus cereus* B7 (obrázek 7) odpovídající kultivaci při 30 °C byl patrný začátek exponenciální fáze po dvou a půl hodinách kultivace a její konec v 10,5. hodině po dosažení hodnoty absorbance 1,51. Následovala stacionární fáze, ve které byla kultivace ukončena. Křivka znázorňující 40 °C měla kratší lag-fázi a exponenciální fáze začala už ve druhé hodině kultivace. Oproti předchozí teplotě byl růst daleko pomalejší, nicméně od 14. hodiny dosahovala vyšších hodnot absorbance (1,52). Při ukončení kultivace stále docházelo k pozvolnému růstu, tedy maximální absorbance byla 1,94. Naopak křivka znázorňující růst při teplotě 25 °C měla při porovnání s předchozími dvěma teplotami dvojnásobně delší lag-fázi a exponenciální fáze tedy začala až v páté hodině kultivace. Nicméně oproti teplotě 30 °C byla tato fáze delší a růst se zastavil na hodnotě absorbance 1,81 po 14. hodině, následně růstová křivka postupně klesala na hodnotu 1,58.

Obrázek 7 Růstové křivky *Bacillus cereus* B7 kultivovaného za 3 různých teplotObrázek 8 Růstové křivky *Bacillus cereus* B21B kultivovaného za 3 různých teplot

Co se týče růstové křivky *Bacillus cereus* B21B (obrázek 8) kultivovaného při 30 °C, tak začátek exponenciální fáze byl po pěti a půl hodinách kultivace a její konec nastal po dosažení hodnoty absorbance 1,55 v 15. hodině. Po dvouhodinové stacionární fázi, následovala fáze odumírání, kdy při ukončení kultivace byla hodnota absorbance 1,07. Teplota 25 °C a 30 °C nebyla pro růst

tohoto kmene příznivá, jelikož z růstové křivky byla patrná pouze lag-fáze a hodnota absorbance nepřesáhla 0,23.

Minimální teplota pro růst *B. cereus* se obvykle pohybuje od 10 °C a maximální až do 45 °C, přičemž optimální teplota je přibližně 37 °C (Logan et al., 2016). Tyto informace odpovídají růstovým křivkám B7, jelikož testovaný kmen roste při všech 3 teplotách. Zároveň křivka při teplotě 40 °C dosahuje nejvyšší hodnoty absorbance, což je teplota blízká optimu. Také B21B roste při všech teplotách, nicméně jsou zde patrné velké rozdíly u testovaných teplot, zejména u teploty 30 °C oproti 25 °C a 40 °C. Je možné, že tento kmen je spíše mezofilní, jelikož právě při teplotě 30 °C vykazoval nejvyšší růst.

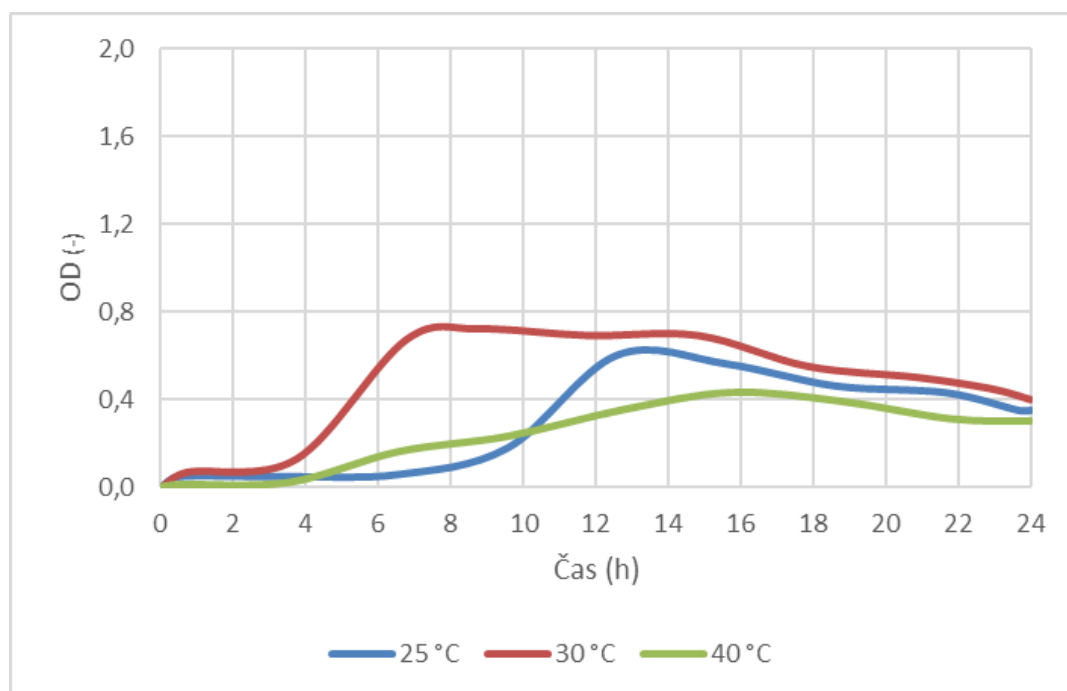


Obrázek 9 Růstové křivky *Bacillus pumilus* B4D kultivovaného za 3 různých teplot

Bacillus pumilus B4D (obrázek 9) kultivovaný při 30 °C měl začátek exponenciální fáze po páté hodině od začátku inkubace a její konec byl v 15. hodině po dosažení hodnoty absorbance 1,36. Následovala stacionární fáze, která trvala hodinu a následně fáze odumírání. Kultivace byla ukončena při absorbanci 0,89. Křivka znázorňující inkubaci při 40 °C měla o hodinu kratší lag-fázi, tzn. exponenciální fáze začala ve 4. hodině kultivace. Stacionární fáze zde téměř nebyla (trvala pouze 30 minut) a po dosažení maximální absorbance 1,39 v 13. hodině, docházelo k jejímu poklesu až na hodnotu 0,55. Při porovnání s předchozí křivkou lze říci, že obě růstové křivky měly přibližně stejný tvar, nicméně při 40 °C byl růst rychlejší, tedy všechny fáze proběhly dříve. Naopak křivka pro 25 °C měla delší lag-fázi trvající do 5. hodiny. Následovala pozvolná fáze růstu, kdy nejvyšší

hodnota absorbance byla 0,96. Hodinu před ukončením kultivace (23. hodina) začala hustota buněk postupně klesat.

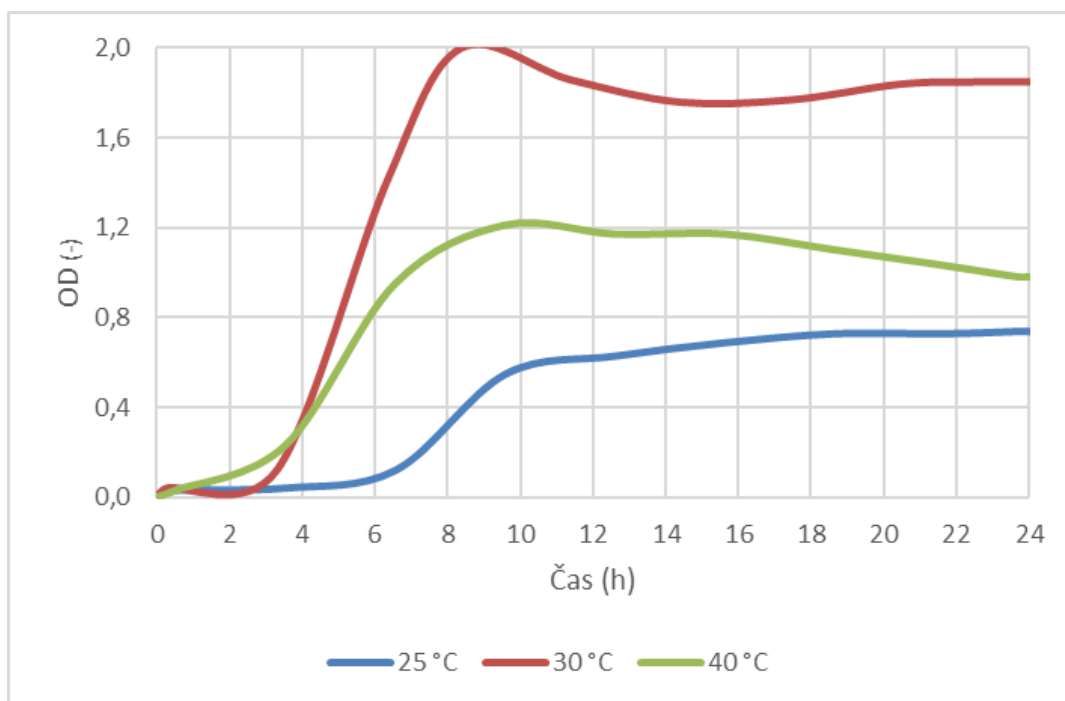
Dle Logan et al. (2016) je *B. pumilus* schopen růstu při minimální teplotě 5 °C a maximální teplotě 50 °C. Lze říci, že toto vysoké rozpětí odpovídá i našemu testování, kdy *B. pumilus* rostl při všech teplotách. Z grafu je také možné vyčíst, že jeho optimální teplota odpovídá 30-40 °C, jelikož obě křivky dosahují nejvyšší absorbance a mají podobný tvar.



Obrázek 10 Růstové křivky *Cytobacillus horneckiae* B1H kultivovaného za 3 různých teplot

Při 30 °C začíná růst u *Cytobacillus horneckiae* B1H (obrázek 10) po čtyřech a půl hodinách. Po dosažení hodnoty absorbance 0,73 v 8. hodině růstová křivka lehce klesala až do konce pokusu. V této exponenciální fázi byla kultivace ukončena a bylo dosaženo hodnoty absorbance 2,19. Pro křivku znázorňující inkubaci při 40 °C nastala fáze růstu oproti předchozí teplotě asi o hodinu později (4,5 hodin) a během 16. hodiny dosáhla hodnoty své nejvyšší absorbance a to 0,42. Při ukončení kultivace křivka dosahovala absorbance 0,37. Křivka odpovídající růstu při 25 °C měla delší lag-fázi a začátek exponenciální fáze byl v 8. hodině kultivace. Růst se zastavil přibližně před 14. hodinou na hodnotě absorbance 0,63, pak růstová křivka postupně klesala až na hodnotu 0,33.

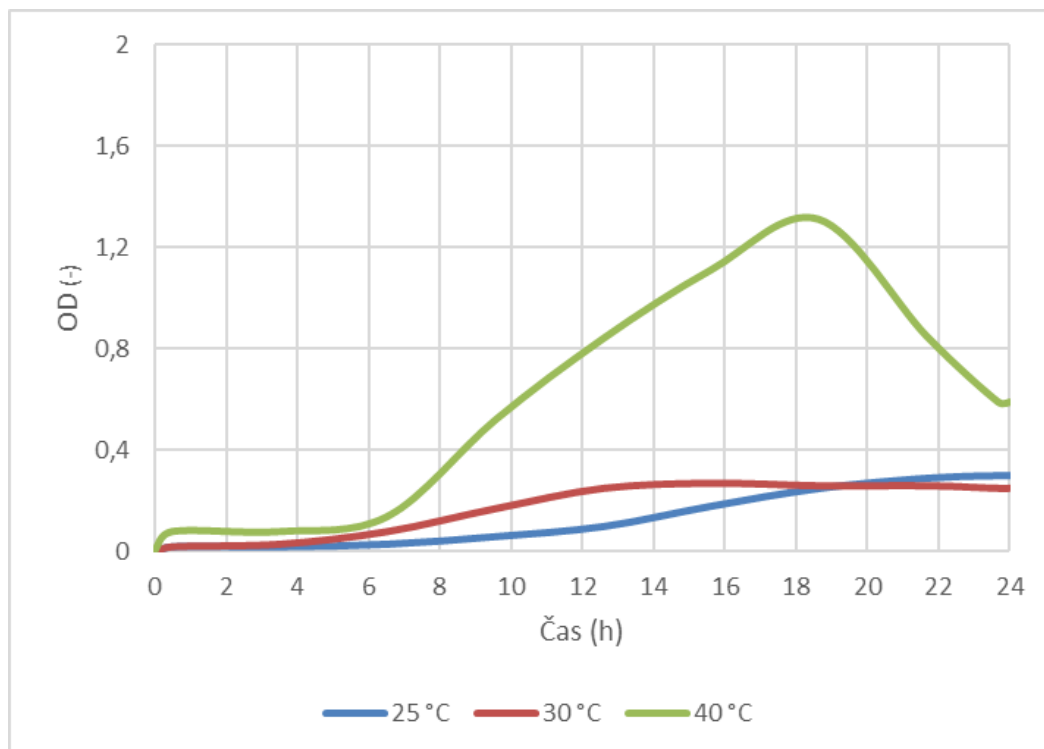
Dle studie Vaishampayan et al. (2010), která jako první popsala *C. horneckiae*, rostl tento při teplotách 4–32 °C a při teplotě 50 °C již nebyl schopen růstu. Dle růstových křivek je patrné, že kromě testovaných teplot 25 a 30 °C je schopen růstu i při teplotě 40 °C. Nejvyšší absorbance bylo dosaženo při teplotě 30 °C.



Obrázek 11 Růstové křivky *Lysinibacillus fusiformis* B2H kultivovaného za 3 různých teplot

Na růstové křivce *Lysinibacillus fusiformis* B2H (obrázek 11) odpovídající kultivační teplotě 30 °C byl patrný začátek exponenciální fáze po dvou a půl hodině kultivace a její konec v 12,5. hodině po dosažení hodnoty absorbance 2,11. Následoval pokles, nicméně kolem 19. hodiny byl zaznamenán mírný nárůst hodnoty absorbance, jejíž konečná hodnota ve stacionární fázi byla 2,03. Křivka znázorňující inkubaci při 40 °C měla podobnou délku lag-fáze, exponenciální fáze však byla daleko kratší oproti předchozí teplotě, začala ve 2,5 hodině kultivace a skončila v hodině desáté, kdy dosahovala nejvyšší hodnoty absorbance 1,21. Následná stacionární fáze trvala do 16. hodiny, poté následovala fáze umírání. Křivka pro teplotu 25 °C měla při porovnání s předchozími dvěma teplotami dvojnásobně delší lag-fázi, růstová fáze začala až po šesté hodině kultivace. Oproti předchozím teplotám byl růst daleko pozvolnější a docházelo k němu až do ukončení kultivace.

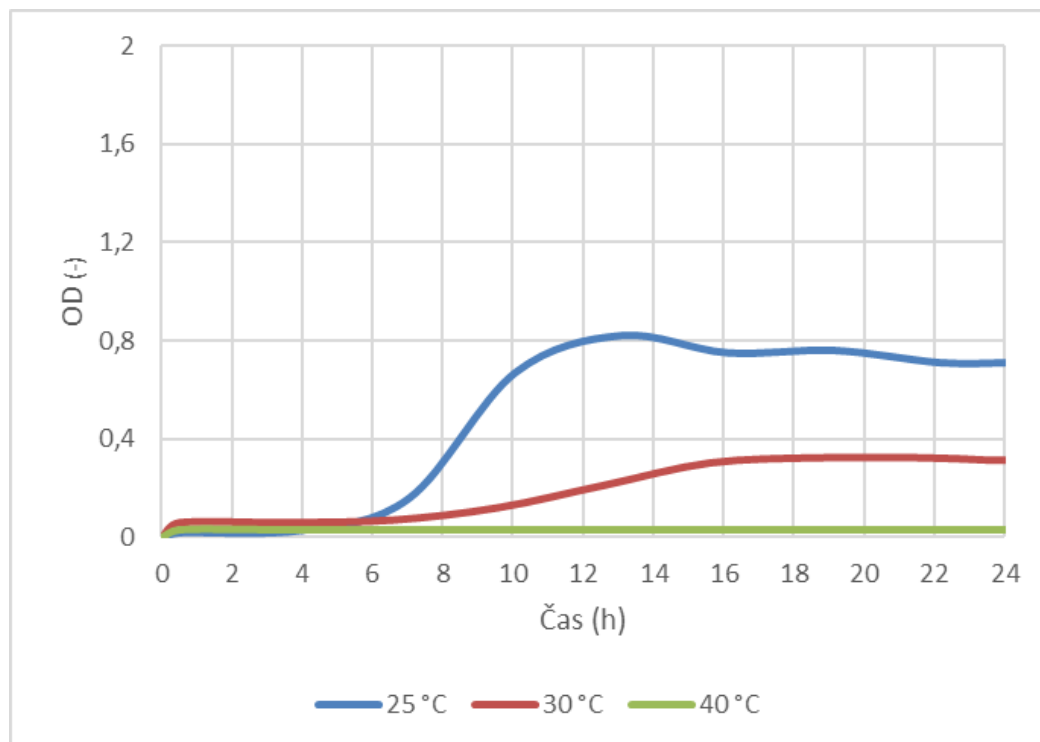
K růstu *L. fusiformis* dochází při teplotách 17-40 °C (Failor et al., 2016). Tyto informace opět souhlasí s naší studií, jelikož testovaný kmen roste při všech teplotách. Nicméně dle vysoké hodnoty absorbance u křivky při 40 °C, lze usuzovat, že může růst i v teplotě lehce přesahující 40 °C. Dle růstových křivek je možné prohlásit, že jeho optimální teplota se pohybuje kolem 30 °C.



Obrázek 12 Růstové křivky *Paenibacillus glucanolyticus* C2H kultivovaného za 3 různých teplot

Paenibacillus glucanolyticus C2H (obrázek 12) rostoucí při teplotě 30 °C měl hodinovou lag-fázi následovanou minimálním růstem. Během 12,5 hodiny absorbance dosáhla hodnoty 0,31 a do konce kultivace byla konstatní. Křivka znázorňující růst při 40 °C měla začátek exponenciální fáze po 6,5 hodině kultivace. Po dosažení hodnoty absorbance 1,25 v 17. hodině denzita buněk začala klesat. Hodnota maximální absorbance byla čtyřnásobně vyšší než u předchozí teploty. Růstová křivka pro teplotu 25 °C po celou dobu kultivace velmi pozvolně stoupala obdobně jako u teploty 30 °C, čemuž odpovídá i nejvyšší dosažená hodnota absorbance.

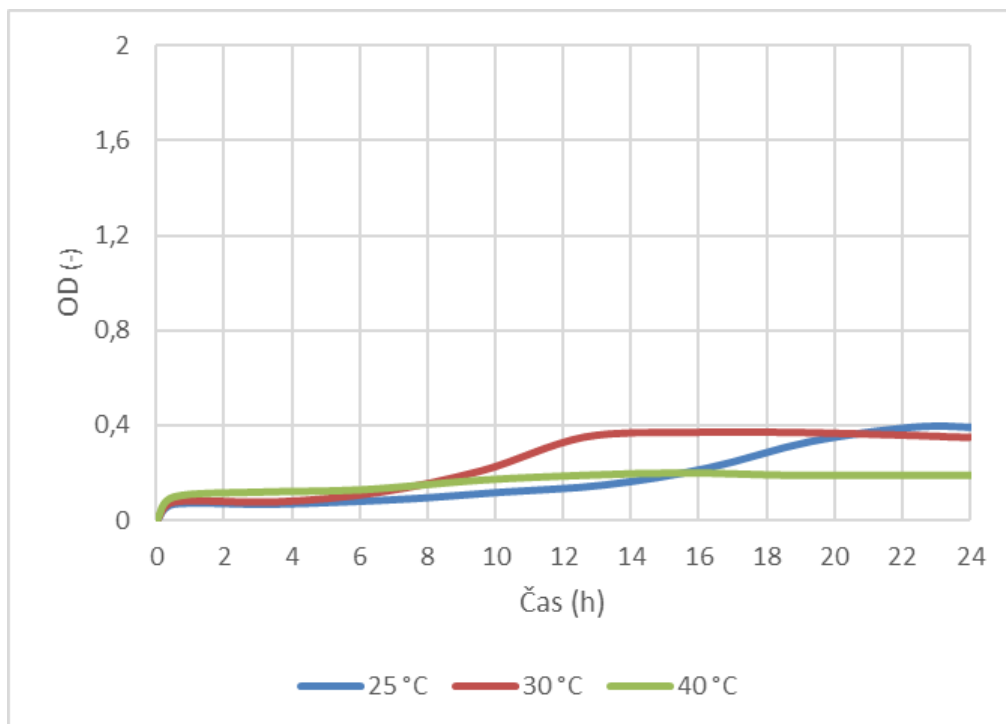
P. glucanolyticus roste mezi 17-37 °C, při 45 °C je růst proměnlivý a při 50 °C už neroste (Priest et al., 2015). Z grafu je patrné, že roste při všech 3 teplotách, přičemž při 40 °C je růst nejvyšší.



Obrázek 13 Růstové křivky *Paenibacillus humicus* I1H kultivovaného za 3 různých teplot

Co se týče růstové křivky *Paenibacillus humicus* I1H (obrázek 13) odpovídající kultivační teplotě 30 °C, byla charakteristická pozvolným růstem. V 16. hodině se absorbance zastavila na hodnotě 0,32. Teplota 40 °C nebyla pro růst tohoto kmene vůbec příznivá, z růstové křivky je patrné, že nebyl zaznamenán žádný růst. Při teplotě 25 °C byl začátek exponenciální fáze po šesté hodině kultivace a její konec nastal po dosažení hodnoty absorbance 0,8 v 12. hodině. Při ukončení kultivace byl růst ve stacionární fázi při hodnotě absorbance 0,77.

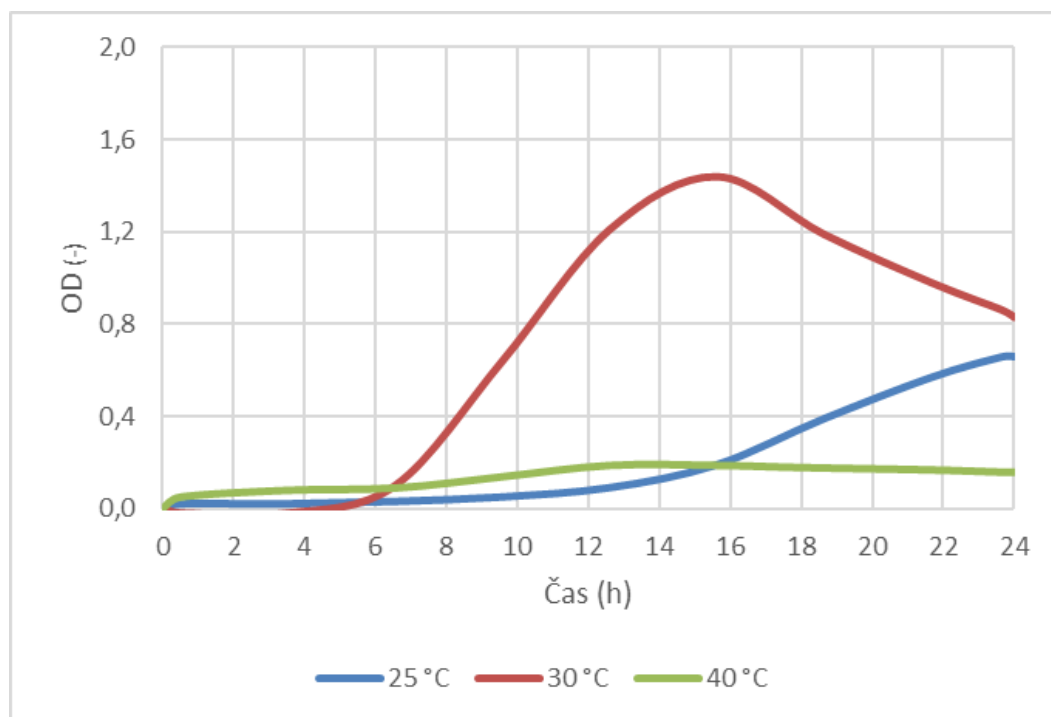
Dle studie Vaz-Moreira et al. (2007), která jako první popsala *P. humicus*, dochází k růstu při 15–40 °C a při teplotě vyšší než 45 °C již neroste. Tato zjištění odpovídají i výsledkům diplomové práce, kdy při 45 °C nebyl zaznamenán růst, při ostatních teplotách *P. humicus* rostl. Dle růstových křivek lze za nejlepší teplotu považovat 25 °C.



Obrázek 14 Růstové křivky *Paenibacillus taichungensis* B43 kultivovaného za 3 různých teplot

Růst *Paenibacillus taichungensis* B43 (obrázek 14) byl během 24 hodin při všech 3 teplotách inkubace minimální. Lag-fáze trvala minimálně 6 hodin, poté následovala pomalá růstová fáze a stacionární fáze, ve které byla kultivace i ukončena. Nejvyšších hodnot absorbance bylo dosaženo při teplotě 25 °C a to 0,4 ve 23. hodině.

P. taichungensis dle studie Lee et al. (2008), roste při teplotním rozmezí 5–40 °C, optimálně při 30 °C. Z grafu je patrné, že roste při všech 3 teplotách, přičemž při 30 °C je růst nejvyšší.



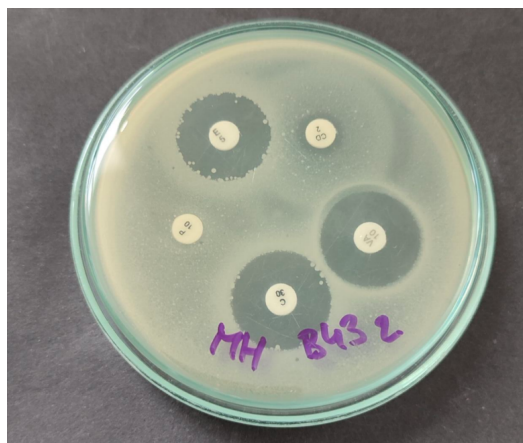
Obrázek 15 Růstové křivky *Psychrobacillus psychrodurans* B7C kultivovaného za 3 různých teplot

Psychrobacillus psychrodurans B7C (obrázek 15) rostoucí při 30 °C měl pětihodinovou lag-fázi následovanou exponenciální fází. Během 15. hodiny absorbance dosáhla hodnoty 1,59 a následně do konce kultivace klesala. Křivka znázorňující inkubaci při 25 °C měla začátek pozvolného růstu po 10. hodině od začátku kultivace a po celou dobu postupně stoupala, nejvyšší hodnota absorbance byla 0,6. Hodnota maximální absorbance byla tedy několikanásobně nižší než u předchozí teploty. Při teplotě 40 °C byla nejvyšší hodnota absorbance ve 13. hodině 0,19. Takto nízké hodnoty nelze považovat za růst. Dle Logan et al. (2016) je *P. psychrodurans* schopen růstu při minimální teplotě -2 °C a maximální teplotě 35 °C. Toto teplotní rozpětí odpovídá i našemu testování, nicméně velmi slabý růst byl zaznamenán i při teplotě 40 °C. Z grafu je také možné vyčíst, že jeho optimální teplota odpovídá 30 °C.

4.3 Testování citlivosti na antibiotika

4.3.1 Disková difuzní metoda

Citlivost k vybraným antibiotikům pomocí diskové difuzní metody (viz. Obr. 16) byla vyhodnocena na základě změřených průměrů inhibičních zón dle kritérií EUCAST u všech 22 vyšetřovaných kmenů. Výsledky jsou zaznamenány v tabulkách 9-12 a pro lepší představu i na obrázku 17.

Obrázek 16 Výsledky diskové difuzní metody pro *Paenibacillus taichungensis*Tabulka 9 Hodnocení antibiotické rezistence u kmenů *Bacillus cereus*

Antibiotikum	průměr zóny (v mm), hodnocení				
	B7	B11E	B21B	B27B	B82
Imipenem	24 R	18 R	36 C	32 C	26 R
Meropenem	36 C	18 R	31 C	28 C	17 R
Ciprofloxacin	26 I	0 R	30 I	26 I	20 R
Levofloxacin	27 I	12 R	41 I	30 I	18 R
Norfloxacin	29 C	24 C	31 C	31 C	31 C
Vancomycin	16 C	19 C	22 C	21 C	26 C
Erythromycin	32 C	17 R	23 R	38 C	16 R
Clindamycin	23 C	21 C	22 C	25 C	27 C
Penicilin	0 R	0 R	9 R	0 R	0 R
Chloramfenikol	23 C	20 C	24 C	33 C	12 I
Gentamycin	33 C	28 C	15 C	35 C	39 C
Amikacin	30 C	23 C	28 C	32 C	32 C
Tetracyklin	18 I	24 C	28 C	26 C	22 C
Trimethoprim	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R
Tobramycin	17 C	21 C	26 C	30 C	33 C

Legenda: C = citlivý kmen I = intermediární kmen R = rezistentní kmen

Tabulka 10 Hodnocení antibiotické rezistence u kmenů *Bacillus pumilus*, *B. thuringiensis*, *Cytobacillus horneckiae* a *Fictibacillus phosphorivorans*

Antibiotikum	průměr zóny (v mm), hodnocení					
	B4D	B14C	B81	B1H	C1H	B23A
Imipenem	50 C	49 C	26 R	38 C	28 R	33 C
Meropenem	32 C	30 C	16 R	41 C	35 C	33 C
Ciprofloxacin	32 I	33 I	36 I	42 I	23 I	38 I
Levofloxacin	40 I	36 I	32 I	26 I	22 R	40 I
Norfloxacin	49 C	41 C	39 C	42 C	24 C	38 C
Vancomycin	38 C	24 C	24 C	27 C	18 C	26 C
Erythromycin	23 R	24 C	30 C	20 R	21 R	16 R
Clindamycin	24 C	23 C	28 C	7 R	0 R	0 R
Penicilin	16 R	19 R	0 R	0 R	0 R	0 R
Chloramfenikol	22 C	23 C	29 C	20 C	18 C	16 I
Gentamycin	35 C	45 C	35 C	36 C	21 C	33 C
Amikacin	32 C	37 C	40 C	17 C	26 C	30 C
Tetracyklin	16 I	20 C	29 C	30 C	23 C	30 C
Trimethoprim	45 C	41 C	0 R	30 C	0 R	30 C
Tobramycin	33 C	39 C	26 C	29 C	23 C	29 C

Legenda: C = citlivý kmen I = intermediární kmen R = rezistentní kmen

Tabulka 11 Hodnocení antibiotické rezistence u kmenů rodů *Lysinibacillus*, *Priestia* a *Psychrobacillus*

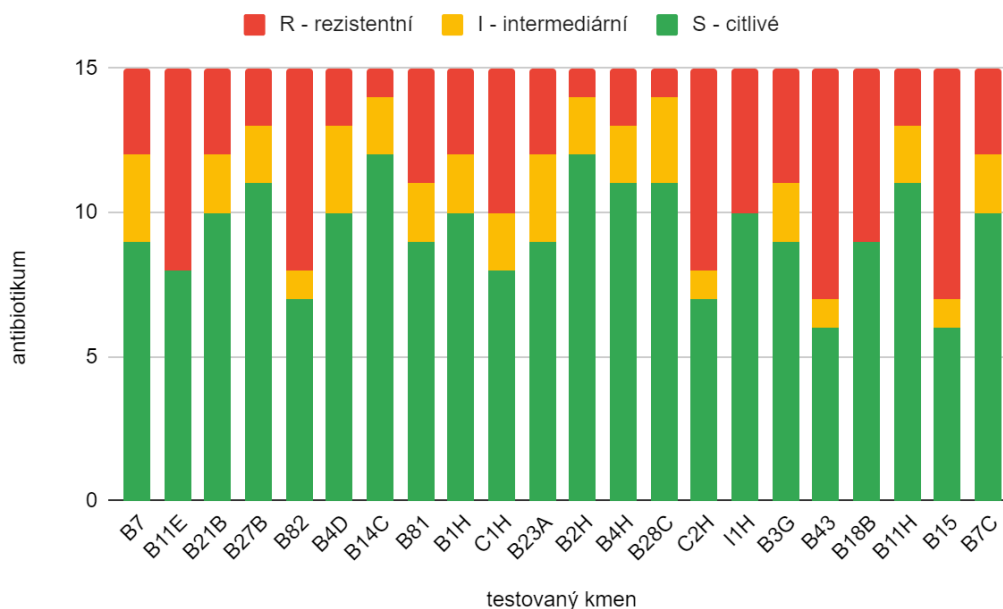
Antibiotikum	průměr zóny v mm, hodnocení					
	B2H	B4H	B28C	B11H	B15	B7C
Imipenem	26 C	25 R	35 C	42 C	21 R	34 C
Meropenem	28 C	25 C	40 C	23 R	14 R	-
Ciprofloxacin	27 I	23 I	24 I	31 I	17 R	24 I
Levofloxacin	28 I	28 I	29 I	35 I	18 R	21 R
Norfloxacin	25 C	21 C	26 C	42 C	17 R	26 C
Vancomycin	24 C	26 C	28 C	20 C	21 C	18 C
Erythromycin	25 C	33 C	43 C	24 C	0 R	24 C
Clindamycin	29 C	22 C	24 C	24 C	19 C	21 C
Penicilin	11 R	15 R	20 R	19 R	11 R	0 R
Chloramfenikol	21 C	30 C	20 C	24 C	15 I	22 C
Gentamycin	28 C	35 C	30 C	33 C	24 C	31 C
Amikacin	20 C	32 C	37 C	36 C	23 C	28 C
Tetracyklin	26 C	30 C	28 C	30 C	27 C	18 I
Trimethoprim	27 C	28 C	15 I	42 C	0 R	0 R
Tobramycin	22 C	25 C	21 C	20 C	21 C	17 C

Legenda: C = citlivý kmen I = intermediární kmen R = rezistentní kmen

Tabulka 12 Hodnocení antibiotické rezistence u kmenů rodu *Paenibacillus*

Antibiotikum	naměřené zóny v mm, hodnocení				
	B3G	B43	B18H	C2H	I1H
Imipenem	23 R	33 C	28 R	23 R	27 R
Meropenem	17 R	13 R	18 R	0 R	17 R
Ciprofloxacin	26 I	22 R	21 R	22 R	22 R
Levofloxacin	22 I	21 R	24 I	22 R	22 R
Norfloxacin	0 R	20 R	27 C	26 C	22 C
Vancomycin	24 C	21 C	23 C	26 C	32 C
Erythromycin	31 C	20 R	21 R	29 C	51 C
Clindamycin	28 C	9 R	24 C	10 R	41 C
Penicilin	12 R	0 R	15 R	12 R	22 R
Chloramfenikol	28 C	21 C	25 C	0 R	28 C
Gentamycin	35 C	25 C	35 C	34 C	25 C
Amikacin	30 C	21 C	31 C	29 C	23 C
Tetracyklin	31 C	18 I	29 C	14 I	25 C
Trimethoprim	30 C	0 R	27 C	17 C	26 C
Tobramycin	26 C	21 C	23 C	26 C	21 C

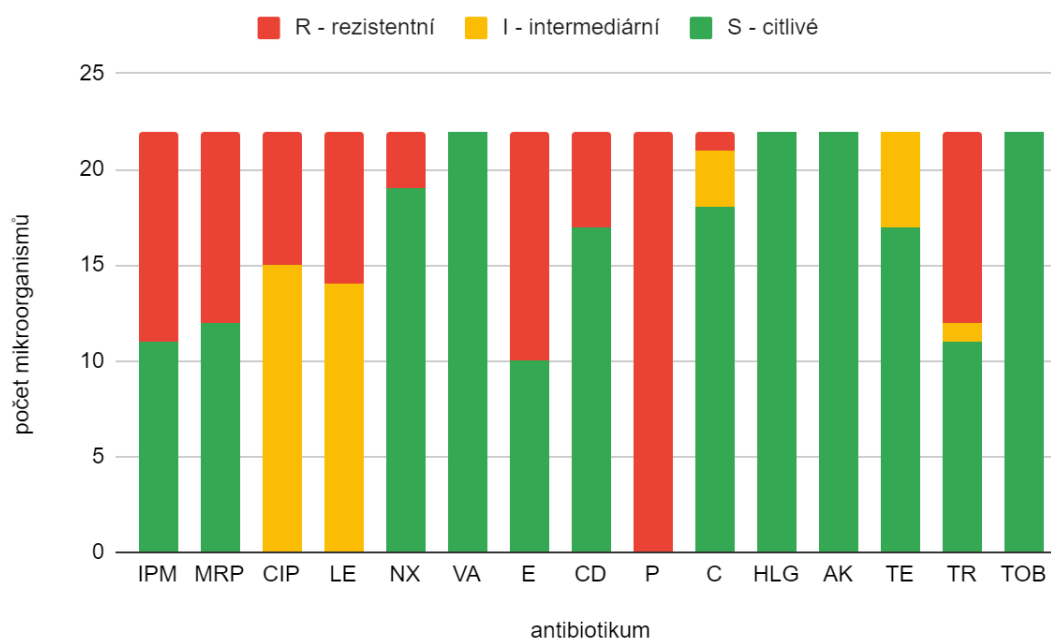
Legenda: C = citlivý kmen I = intermediární kmen R = rezistentní kmen



Obrázek 17 Vyhodnocení působení antibiotik na testované kmeny

Legenda: B7, B11E, B21B, B27B, B82 = *Bacillus cereus*, B4D, B14C = *Bacillus pumilus*, B81 = *Bacillus thuringiensis*, B1H, C1H = *Cytobacillus horneckiae*, B23A = *Fictibacillus phosphorivorans*, B2H, B4H, B28C = *Lysinibacillus fusiformis*, B18H = *Paenibacillus amylolyticus*, C2H = *Paenibacillus glucanolyticus*, I1H = *Paenibacillus humicus*, B3G = *Paenibacillus odorifer*, B43 = *Paenibacillus taichungensis*, B11H = *Priestia aryabhattai*, B15 = *Priestia flexa*, B7C = *Psychrobacillus psychrodurans*

Výsledky měření jsou dále znázorněny na obrázcích 18-19. Z 22 vyšetřovaných kmenů bylo vůči karbapenemovému antibiotiku imipenemu rezistentních 11 kmenů a vůči meropenemu 11 kmenů, zbylé kmeny byly zhodnoceny jako citlivé. U chinolonových antibiotik bylo 7 kmenů rezistentních a zbylých 15 intermediárních vůči ciprofloxacinu, u levofloxacinu bylo 8 kmenů rezistentních a zbylých 14 intermediárních a na norfloxacin vykazovaly rezistenci 3 kmeny. U vankomycinu a aminoglykosidových antibiotik gentamycinu, amikacinu a tobramycinu byly shledány pouze citlivé kmeny. Naopak u penicilinu byly všechny kmeny rezistentní. K erytromycinu vykazovalo rezistenci 12 vyšetřovaných kmenů, ostatních 10 kmenů bylo intermediárních. U 5 kmenů byla stanovena rezistence ke klindamycinu, zbylé kmeny byly na toto antibiotikum citlivé. U chloramfenikolu byl nalezen jediný rezistentní kmen, další 3 kmeny intermediární a další byly shledány jako citlivé. Při testování citlivosti na tetracyklin bylo stanoveno 5 intermediárních kmenů a 17 citlivých. V případě kombinace sulfamethazol / trimethoprim bylo 10 kmenů rezistentních, 1 určen jako intermediární a ostatní kmeny byly shledány jako citlivé.

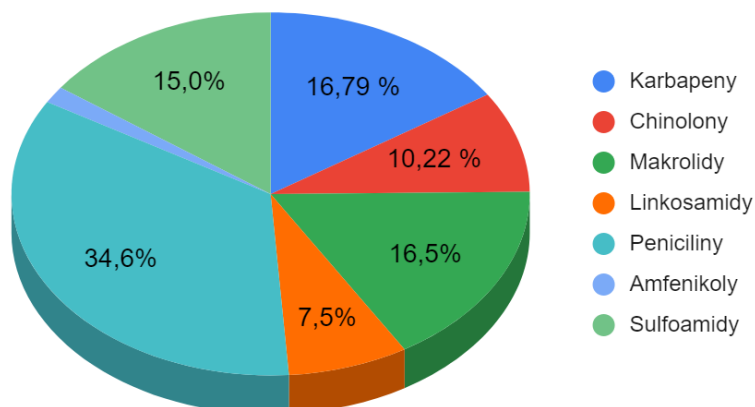


Obrázek 18 Vyhodnocení zastoupení rezistentních, intermediárních a citlivých kmenů na vybraná testovaná antibiotika

Legenda: IPM = imipenem, MRP = meropenem, CIP = ciprofloxacin, LE = levofloxacin, NX = norfloxacin, VA = vancomycin, E = erythromycin, CD = klindamycin, P = penicilin, C = chloramfenikol, HLG = gentamycin, AK = amikacin, TE = tetracyklin, TR = sulfamethazol / trimethoprim, TOB = tobramycin

Na základě výsledků byla jako nejúčinnější antibiotika shledána amikacin, gentamycin, vankomycin, tobramycin (100 %), chloramfenikol (81,82 %), norfloxacin (86,36 %) a tetracyklin (77,27 %). Naopak 100 % izolátů se ukázalo rezistentních na penicilin G a vyšší než 20% rezistence

byla zaznamenána u erytromycinu (54,55 %), imipinemu (50 %), meropenemu, sulfamethazol / trimethoprimu (45,45 %), levofloxacinu (36,36 %), ciprofloxacinu (31,82 %) a klindamycinu (22,73 %).



Obrázek 19 Vyhodnocení podílu rezistentních kmenů podle skupin testovaných antibiotik

Pokud jde o rozdíly mezi skupinami čeledi *Bacillaceae*, prevalence antibiotické rezistence u *B. pumilus* a *Lysinibacillus fusiformis* byly nižší ve srovnání s jinými druhy. Prevalence citlivosti u *B. thuringiensis*, *Cytobacillus horneckiae*, *Fictibacillus phosphorivorans*, *Paenibacillus amylolyticus*, *P. humicus*, *P. odorifer*, *Priestia aryabhattai* a *Psychrobacillus psychrodurans* se významně neliší ve srovnání s *B. cereus*. Nicméně u kmenů druhů *Paenibacillus glucanolyticus*, *P. taichungensis* a *Priestia flexa* byla pozorována vyšší rezistence než u ostatních druhů. Ačkoli tyto výsledky mohou být zkresleny nízkým počtem izolovaných druhů, mohou i tak podat prvotní informace o antibiotické rezistenci sporotvorných tyčinek z čeledi *Bacillaceae*.

Rezistence k antibiotikům norfloxacinu, klindamycinu a chloramfenikolu byla signifikantně vyšší u izolátů ze skupiny *B. cereus* ve srovnání s dalšími izoláty čeledi *Bacillaceae*. Nebyl zjištěn žádný významný rozdíl v procentech izolátů s antibiotickou rezistencí vůči amikacinu, ciprofloxacinu, erythromycinu, gentamycinu, imipenemu, meropenemu, levofloxacinu, tetracyklinu, tobramycinu a vankomycinu mezi skupinami čeledi *Bacillaceae*. Nicméně rezistence na antibiotickou kombinaci sulfamethazol / trimethoprim byla významně vyšší u dalších testovaných izolátů *Bacillaceae* ve srovnání s kmeny *B. cereus*.

Většina studií se obvykle zaměřuje na *B. cereus*, který je patogenní, proto jsem se v rámci diskuze soustředila zejména na tento mikroorganismus.

Podle studie Gdoura-Ben et al. (2019) byl *B. cereus*, izolovaný ze vzorků tuniských potravin, včetně vařeného drůbežího masa, velmi citlivý na gentamycin, chloramfenikol (100 %) a vankomycin

(92 %). Podíl izolátů rezistentních k tetracyklinu byl nízký (14,9 %). Studie podporuje současná zjištění této diplomové práce, kde z pěti testovaných kmenů *B. cereus* byly všechny citlivé na gentamycin (100 %), čtyři na chloramfenikol a tetracyklin (80 %).

Tato zjištění souhlasí také s těmi, která potvrdili Shawish a Tarabees et al. (2017) studií bakterií izolovaných z výrobků z hovězího masa v Egyptě. Uvedli, že všechny získané kmeny *B. cereus* byly vysoce citlivé na gentamycin, klindamycin a vankomycin (100 %) a rezistentní pouze k penicilinu G. U kmenů použitých v této diplomové práci se vyskytovala 100% citlivost na klindamycin a vankomycin, tj. 5 z 5 izolátů. Naopak veškeré byly rezistentní vůči penicilinu (100 %).

Kromě těchto studií i Mousa et al. (2020) potvrdili, že získané izoláty *B. cereus* z masných produktů v Kaliobě (Egypt) byly vysoce rezistentní na penicilin G a trimethoprim/sulfamethoxazol (80,4 %). Testované kmeny *B. cereus* byly středně citlivé na erytromycin (citlivost u 58,8 %) a citlivé na gentamycin, následované meropenem, kde byla citlivost u 72,5 %. Uvedené výsledky jsou v souladu s touto diplomovou prací, kde bylo všech 5 izolátů rezistentních na sulfamethazol / trimethoprim (100 %) a 2 na erytromycin s meropenem (40 %).

Rovněž zjištění v této diplomové práci souhlasí s těmi, které publikovali Algammal et al. (2024) ze studie kmenů *B. cereus* původem ze vzorků masa a masných výrobků v Egyptě, kde rezistence izolátů *B. cereus* na antimikrobiální látky byla identifikována následovně: tetracyklin (85,7 %), erythromycin (42,9 %) a vankomycin (0 %).

Polská studie uvádí, že kmeny *B. cereus* získané ze syrového mléka vykazovaly rezistenci k antimikrobiálním látkám různých tříd. Přesněji byly veškeré izoláty citlivé na chloramfenikol a meropenem, většina studovaných kmenů byla citlivá na vankomycin (98,89 %), amikacin (97,8 %), gentamycin (94,44 %) a sulfamethazol / trimethoprim (94,44 %) (Adamski et al., 2023).

V neposlední řadě lze výsledky porovnat i se studií Savić et al. (2016), kteří izolovali *B. cereus* z různých vzorků potravin, životního prostředí a lidské stolice v Srbsku. Výsledky u vzorků potravin ukázaly vysokou citlivost k vankomycinu s tetracyklinem, a rezistenci k penicilinu.

Nicméně někteří autoři také uvádějí odlišnou rezistenci *B. cereus* vůči antibiotikům oproti výsledkům zjištěným v této diplomové práci. Mousa et al. (2020), Gdoura-Ben et al. (2019) a Shawish a Tarabees (2017) uvádí 74,5, 100 a 100 % izolátů citlivých na ciprofloxacin, což je v rozporu se získanými výsledky, kde z pěti kmenů nebyl citlivý žádný. Stejně je tomu ve studii Algammal et al. (2024) u antibiotika levofloxacinu. Naopak ve studii Adamski et al., 2023 bylo 61,11 % izolátů rezistentních k norfloxacinu, u izolátů testovaných v diplomové práci nebyl rezistentní ani jeden

kmen *B. cereus*. Také Savić et al. (2016) uvádějí vyšší citlivost vůči imipenemu (100 %) ve srovnání s kmeny testovanými v této diplomové práci, kde byly 3/5 izolátů rezistentních.

Rozdíly mohou být způsobeny v důsledku odlišného používání antibiotik v různých regionech nebo jiným zdrojem izolátů. Osman et al. (2018) prokázali, že různé zdroje masa vykazovaly několik statisticky významných odchylek v množství izolátů odolných vůči 10 testovaným antibiotikům. Například z importovaného hovězího masa bylo signifikantně více izolátů s rezistencí na lékovou kombinaci sulfamethazol / trimethoprim ve srovnání s izoláty z místního (egyptského) hovězího masa, nicméně nebyl zjištěn významný rozdíl ve srovnání se syrovým kuřecím masem.

Studie Adamski et al. (2023) se v Polsku zabývala nejenom kmeny *B. cereus*, ale také *B. pumilus*, kde z 16 izolátů byly všechny zcela citlivé na chloramfenikol, meropenem, amikacin, sulfamethazol / trimethoprim, vankomycin, erytromycin a gentamycin a většina studovaných kmenů byla citlivá na norfloxacin (56,25 %). V rámci této diplomové práce byly zkoumány 2 kmeny *B. pumilus*. Výsledky byly s touto studií shodné, výjimkou byla jen antibiotika erytromycin, kde byl rezistentní jen 1 kmen a norfloxacin, kde naopak byly zase všechny kmeny citlivé. Nicméně výsledek této práce může být zkreslený kvůli malému množství použitých kmenů.

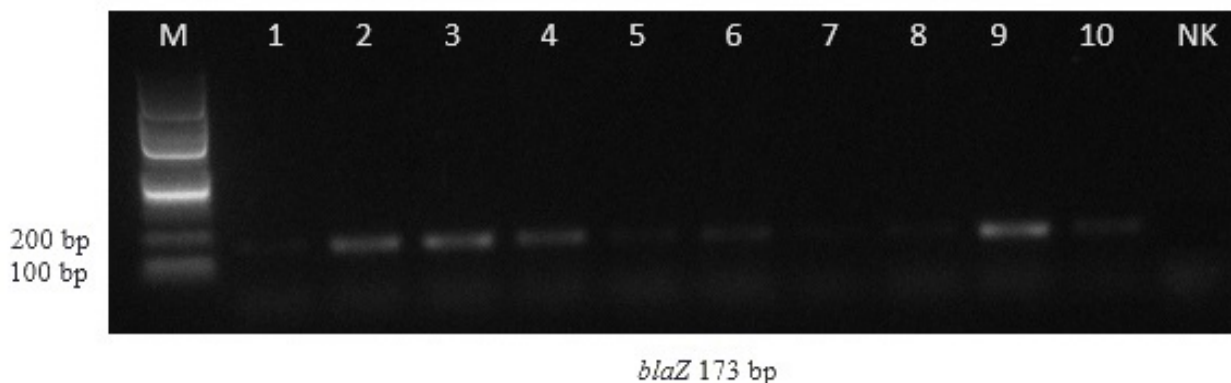
Patogenní kmeny *B. cereus* se mohou přenášet právě potravinami, čímž mohou způsobit poškození lidského zdraví, proto bylo důležité porovnat jejich rezistenci vůči několika třídám antibiotik. Získaný výsledek ohledně vysoké rezistence k penicilinu nebyl překvapivý, jelikož je známo, že kmeny *B. cereus* mohou produkovat enzymy štěpící β -laktamový kruh v jejich molekule (Savić et al., 2016).

Podle výsledků našeho testování antimikrobiální citlivosti by suspektní infekce *B. cereus* neměly být léčeny klinicky širokospektrálním penicilinem, ale nejlépe pomocí aminoglykosidových antibiotik gentamycinu, amikacinu a tobramycinu.

Pro antibiotika amikacin, chloramfenikol, gentamycin, penicilin G, tetracyklin, tobramycin a sulfamethazol / trimethoprim neexistují kritéria EUCAST pro stanovení citlivosti kmenů *Bacillus* v rámci použití diskové difuzní metody, proto byla v této diplomové práci použita kritéria EUCAST pro *S. aureus*, což mohlo zkreslit výsledky. Ze studie Fiedler et al. (2019) vyplývá, že hraniční hodnoty rozdělující kategorie antibiotické rezistence používané pro kmeny *S. aureus* v EUCAST neodpovídaly výsledkům některým antibiotik testovaných u *B. cereus*. Většinou se jednalo o snížení limitní hranice pro citlivost, tedy některé izoláty *B. cereus* vykazovaly citlivost, nicméně mohly nést geny rezistence.

4.3.2 Detekce genů antimikrobiální rezistence pomocí PCR

Přítomnost genů rezistence k vybraným antibiotikům byla po proběhlé amplifikaci vyhodnocena na základě vizualizace úseku DNA gelovou elektroforézou (viz. obrázek 20) u vybraných kmenů, které vykazovaly rezistenci dle kritérií EUCAST u diskové difuzní metody. Výsledky jsou zaznamenány v tabulkách 13-15.



Obrázek 20 Výsledky elektroforézy pro vybraný gen antibiotické rezistence

Legenda: M = marker, 1 = B11E, 2 = C2H, 3 = I1H, 4 = B7, 5 = B15, 6 = B81, 7 = B82, 8 = B43, 9 = B18H, 10 = B4G, NK = negativní kontrola

Tabulka 13 Hodnocení přítomnosti genů rezistence vůči betalaktamovým antibiotikům

Kmen	Geny pro betalaktamová antibiotika		
	<i>blaZ</i>	<i>penp</i>	<i>blaOXA</i>
B7 , <i>Bacillus cereus</i>	+	+	-
B82 , <i>Bacillus cereus</i>	-	+	-
B11E , <i>Bacillus cereus</i>	-	+	-
B81 , <i>Bacillus thuringiensis</i>	+	+	-
B18H , <i>Paenibacillus amylolyticus</i>	+	-	-
C2H , <i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	+	-	-
I1H , <i>Paenibacillus humicus</i>	+	-	-
B3G , <i>Paenibacillus odorifer</i>	+	-	-
B43 , <i>Paenibacillus taichungensis</i>	-	-	-
B15 , <i>Priestia flexa</i>	+	-	-

Legenda: + pozitivní, - negativní

Tabulka 14 Hodnocení přítomnosti genů rezistence vůči makrolidovým antibiotikům

Kmen	Geny pro makrolidová antibiotika		
	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>mph</i>
B21B , <i>Bacillus cereus</i>	-	+	-
B82 , <i>Bacillus cereus</i>	+	+	-
B4D , <i>Bacillus pumilus</i>	-	-	-
B1H , <i>Cytobacillus horneckiae</i>	-	-	-
C1H , <i>Cytobacillus horneckiae</i>	-	-	-
B23A , <i>Fictibacillus phosphorivorans</i>	-	-	-
B18H , <i>Paenibacillus amylolyticus</i>	-	-	-
B43 , <i>Paenibacillus taichungensis</i>	-	-	-
B15 , <i>Priestia flexa</i>	-	+	-

Legenda: + pozitivní, - negativní

Tabulka 15 Hodnocení přítomnosti genů rezistence vůči fluorochinolonovým a linkosamidovým antibiotikům

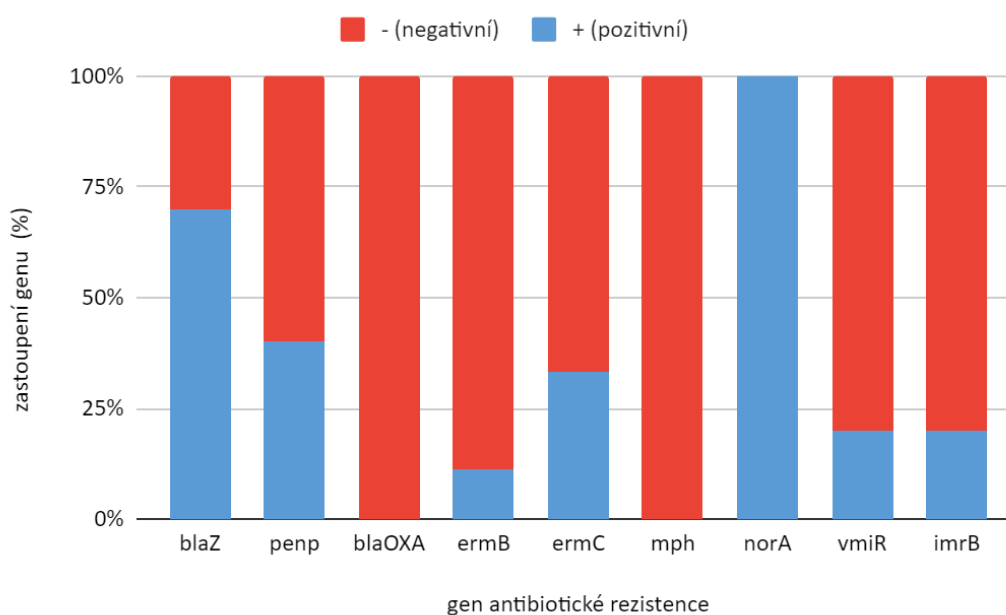
Kmen	Geny pro fluorochinolonová antibiotika	Kmen	Geny pro linkosamidová antibiotika	
	<i>norA</i>		<i>vmiR</i>	<i>imrB</i>
B11E , <i>Bacillus cereus</i>	+	B1H , <i>Cytobacillus horneckiae</i>	-	-
B82 , <i>Bacillus cereus</i>	+	C1H , <i>Cytobacillus horneckiae</i>	-	-
B18H , <i>Paenibacillus amylolyticus</i>	+	B23A , <i>Fictibacillus phosphorivorans</i>	-	-
C2H , <i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	+	C2H , <i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	+	+
I1H , <i>Paenibacillus humicus</i>	+	B43 , <i>Paenibacillus taichungensis</i>	-	-
B43 , <i>Paenibacillus taichungensis</i>	+			
B15 , <i>Priestia flexa</i>	+			

Legenda: + pozitivní, - negativní

Výsledky měření jsou znázorněny na obrázku 21. Pomocí PCR byla prokázána přítomnost genů antibiotické rezistence u testovaných kmenů. Gen *norA* byl detekován u 100 % vzorků (7/7), naopak geny *blaOXA* (0/10) a *mph* (0/9) nebyly zaznamenány u žádného izolátu. U 7/10 vzorků byl detekován gen *blaZ*, u 4/10 gen *penp* a gen *ermC* byl přítomný u 3/9 testovaných kmenů. Geny *ermB*,

vmiR a *imrB* byly nalezeny vždy u 1 izolátu, tj. u genu *ermB* v 1/10 případech a u genů *vmiR* a *imrB* v 1/5.

Pokud jde o rozdíly mezi skupinami čeledi *Bacillaceae*, prevalence genů antibiotické rezistence u *B. pumilus*, *Cytobacillus horneckiae*, *Fictibacillus phosphorivorans* a *Paenibacillus taichungensis* byla nižší ve srovnání s jinými druhy. Prevalence citlivosti u *Paenibacillus amylolyticus*, *P. humicus*, *P. glucanolyticus*, *P. odorifer* a *Priestia flexa* se významně nelišila ve srovnání s *B. cereus*.



Obrázek 21 Prevalence zastoupení genů antimikrobiální rezistence u testovaných kmenů

Ve studii Bianco et al. (2021) hlásili mezi 17 klinickými izoláty *B. cereus* odebranými v jižní Itálii vysokou prevalenci genů kódujících β -laktamázu, konkrétně *bla-1* a *bla-2* byly identifikovány u 100 % (17/17). Nicméně gen *blaZ* byl nalezen pouze u 6 % (1/17) kmenů. V souboru izolátů čeledi *Bacillaceae* použitých pro tuto diplomovou práci jsme zjistili podstatně vyšší prevalenci *blaZ* a to 7/10 (70 %), což se zdá podobné studii Mills et al. (2022), kde z 85 izolátů *B. cereus* z mléčných výrobků byl gen *blaZ* přítomen u 48. Co se týče dalších genů udělujících rezistenci na β -laktamová antibiotika, tak ve studii Wash et al. (2022) byl ze 7 izolátů detekován gen *penp* u dvou (28,57 %) *Bacillus* spp. a *blaOXA* u jednoho (14,29 %). U kmenů použitých pro výzkum v této diplomové práci se vyskytoval gen *penp* u 4/10 (40 %) a gen *blaOXA* nebyl zjištěn u žádného izolátu.

Získaný výsledek ohledně nízké prevalence genů rezistence k penicilinu byl překvapivý, zejména kvůli vysokému počtu rezistentních kmenů zjištěných diskovou difuzní metodou. Tato skutečnost, ale může být způsobena faktem, že za rezistenci způsobenou β -laktamázou je hlavně

zodpovědná kombinace genů rezistence *bla-1* a *bla-2* (Algammal et al., 2024) a přítomnost těchto genů nebyla testována.

Bianco et al. (2021) u některých izolátů identifikovali dva geny (*ermC* a *mph*) propůjčující rezistenci vůči antibiotikům ze skupiny makrolidů. Gen *mph* byl identifikován u 35 % (6/17) kmenů *B. cereus* a gen *ermC* u 6 % (1/17), zatímco Mills et al. (2022) detekovali relativně nižší počet izolátů nesoucích specifickou alelu *mph*, konkrétně 13 % (11/85). Jako další gen poskytující rezistenci na erythromycin, byl ve studii Fernández-Fuentes et al. (2022) testován gen *ermB*. Ze vzorků španělských biopotravin byl detekován u 9/11 (81,81 %) izolátů *Bacillus* spp., včetně 4 izolátů *B. cereus* a 2 *B. licheniformis*. Ve srovnání s touto diplomovou prací, byla ve zmíněné studii zjištěna daleko vyšší prevalence alel *ermB* (1/9) a *mph* (0/9), ale zároveň nižší prevalence alely *ermC* (3/9, 33,33 %). Odolnost kmenů *B. cereus* vůči erythromycinu je dle Algammal et al. (2024) připisována zejména genu *ermA*, jehož možná přítomnost nebyla testována spolu s dalšími geny skupiny *erm* (*ermD*, *ermK* a *ermJ*), která může být u *Bacillus* spp. zastoupena (Berić et al., 2018). Pawlowski et al. (2019) uvádí, že kromě genu *mphK* jsou pro *Bacillus* spp. a *Paenibacillus* spp. specifické další homologní geny jako *mphJ*, *mphL* a *mphM*.

Hodnocení přítomnosti genů rezistence vůči fluorochinolonovým antibiotikům, konkrétně genu *norA*, byla provedena ve studii Fernández-Fuentes et al. (2022). Gen *norA* nebyl detekován v žádném izolátu *Bacillus* spp. V naší studii byl gen *norA* naopak identifikován ve všech (7/7).

Tyto rozdílné výsledky mohly vzniknout vlivem nespecifického nasedání primeru na cílovou DNA sekvenci. Mohlo jít například o záměnu s genem *bmr*, který je často detekován u *B. subtilis* (Tóth et al., 2021). Schindler et al. (2016) popsal gen *bmr* jako strukturní i funkční homolog k *norA*.

Studie Wash et al. (2022) uvedla jako nejvíce převládající geny *VmiR* a *ImrB*, které byly detekovány u 6/7 *Bacillus* spp. Nicméně zjištění této diplomové práce opětovně ukazují daleko nižší výskyt těchto genů, kde oba geny (*VmiR* a *ImrB*) byly nalezeny pouze u jednoho izolátu (1/5). I když testované izoláty *Bacillus* spp. nenesly geny *VmiR* a *ImrB*, byly fenotypově rezistentní vůči klindamycinu z antibiotické třídy linkosamidů. To mohlo být způsobeno přítomností jiných genů rezistence s obdobnou nukleotidovou sekvencí, jako jsou například *speG* nebo již zmíněné geny ze skupiny *erm* (Jeong et al., 2020).

Jak bylo uvedeno výše, výskyt genů rezistence na antibiotika se velmi liší v závislosti na studii. Tato variabilita může být připsána různým geografickým lokalitám, zdrojům kmenů, vybraným genům s jinou sekvencí a použitím různých primerů pro PCR testy. Důležité je i zmínit, že většina

článků se zaměřuje na *B. cereus* nebo *B. subtilis*, proto je tedy velmi těžké získané výsledky porovnat. Všechny tyto faktory mohou vést ke zkreslení výsledků.

Obecně lze říci, že byla očekávána daleko vyšší prevalence genů antibiotické rezistence, jelikož testované kmeny byly vybrány na základě své fenotypové rezistenci prokázané diskovou metodou. U vybraných testovaných izolátů se tedy přítomnost genů rezistence předpokládala. Nicméně na druhou stranu je třeba poznamenat, že pro každou třídu antibiotik existuje mnoho genů zodpovědných za rezistenci a v rámci této diplomové práce jich bylo testováno pouze několik. Tedy v případě výběru jiných genů bylo možné dospět i k jiným závěrům.

4.3.3 Srovnání použitých metod testování antibiotické rezistence

Bylo provedeno srovnání metod s cílem porovnat výsledky klasické fenotypové metody pomocí diskové difuzní metody a genotypové PCR metody. Pomocí diskové difuzní metody bylo otestováno všech 22 bakterií, nicméně v rámci PCR byly testovány pouze ty, které vykazovaly rezistenci již zmíněnou metodou. Celkem se jednalo o 15 mikroorganismů a různé geny rezistence.

Ze 74 testování vyšla ve většině případech (50, 67, 57 %) neshoda v profilech fenotypové a genotypové antimikrobiální citlivosti. Zbývajících 24 kombinací (32,43 %) vykazovalo shodu mezi fenotypem a genotypem. Pozorované neshody byly zejména u kmenů *B. pumilus* B4D, *Cytobacillus horneckiae* B1H, C1H a *Fictibacillus phosphorivorans* B23A, kdy přes fenotypovou rezistenci nebyl detekován žádný gen. Dále byla častá neshoda zaznamenána u *Paenibacillus taichungensis* B43, kdy v 8/9 případů (88,89 %) nebyl nalezen příslušný gen rezistence. Dále u *Paenibacillus amylolyticus* B18H v 5/7 (71,43 %), u *B. cereus* B21B a *Paenibacillus odorifer* B3G v 2/3 (66,67 %) a u *Priestia flexa* B15 ve 4/7 (57,14 %). 50% shoda byla zjištěna u *B. cereus* B11E spolu s *Paenibacillus humicus* I1H a nejvyšší míra shody (66,67 %) byla shledána u *B. cereus* B7, B82, *Bacillus thuringiensis* B81 a *Paenibacillus glucanolyticus* C2H.

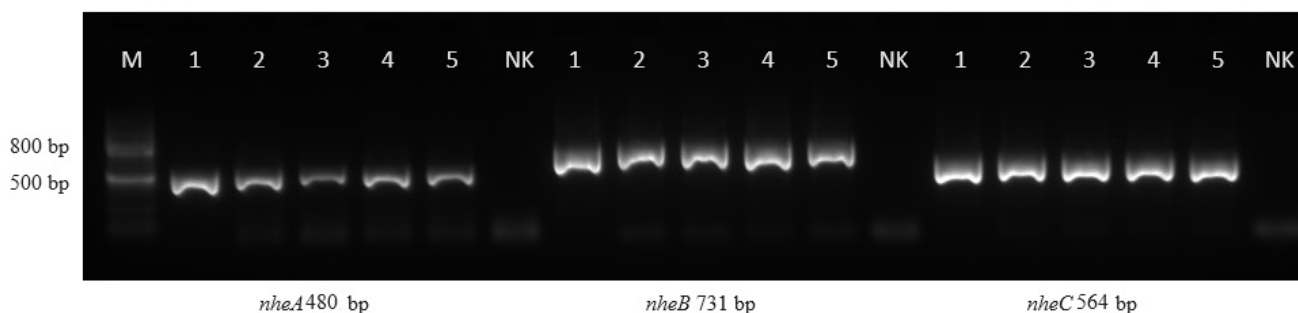
Nejnižší míra neshody byla zaznamenána u genu *blaZ*, kromě *norA*, který nevykazoval žádnou. Naopak nejvíce nesouhlasných výsledků bylo pro geny *blaOXA* a *mph*, kde i přes nalezenou fenotypovou rezistenci nebyly tyto geny vůbec detekovány. Dále bylo detekováno 4/5 případů neshodných pro linkosamidová antibiotika (geny *vmiR* a *imrB*) a gen *ermB*. U zbývajících testovaných genů *penp* a *ermC* byly pozorovány tři nebo čtyři shody.

Tyto neshody mohou být způsobeny faktory již zmíněnými v předchozích kapitolách (6.3.1 a 6.3.2). Mezi ty nejdůležitější jistě patří malé množství testovaných genů rezistence a nepřesnost diskové difuzní metody. Výsledky Fiedler et al. (2019) a Mills et al. (2022) naznačují, že používání

hodnot EUCAST pro *Staphylococcus* spp. při testování *Bacillus* spp. mohou způsobit nesprávnou interpretaci antimikrobiální citlivosti. V případě *Bacillus* spp. by měla být hranice citlivosti ve většině případů nižší, proto je třeba se této interpretaci vyhnout. Místo toho se pro testování doporučuje použít diluční metodu v bujónu. Tu však v naší laboratoři nebylo možné použít. Také příručka CLSI M45 doporučuje pouze metodu diluční kvůli spolehlivější testování citlivosti. I přesto je však disková difúzní metoda často používána pro skriningové stanovení antimikrobiální citlivosti izolátů skupiny *B. cereus*.

4.4 Detekce genů virulence

Přítomnost vybraných genů virulence u kmenů *Bacillus cereus* byla vyhodnocena na základě vizualizace úseku DNA amplifikovaného metodou PCR s následnou gelovou elektroforézou (Obrázek 22). Jednalo se o geny kódující hemolyzin BL (*hblA*, *hblC* a *hblD*), cereolyziny (*cerA*, *cerB* a *cerO*), další hemolyziny (*hlyI*, *hlyII* a *hlyIII*), nehemolytický enterotoxin (*nheA*, *nheB* a *nheC*), enterotoxin FM (*entFM*) a cereulid (*ces*). Výsledky jsou zaznamenány v tabulkách 16-17.



Obrázek 22 Výsledky elektroforézy pro vybrané geny virulence

Legenda: M = marker, 1 = B82, 2 = B7, 3 = B11E, 4 = B21B, 5 = B27B, NK = negativní kontrola

Tabulka 16 Přítomnost genů virulence zodpovědných za alimentární intoxikace testovaných kmenů *B. cereus*

Kmen	Geny zodpovědné za enterotoxigenní nebo emetogenní (gen <i>ces</i>) aktivitu							
	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>entFM</i>	<i>ces</i>
B82	+	+	+	+	+	+	+	-
B7	-	-	-	+	+	+	+	-
B11E	-	+	+	+	+	+	-	-
B21B	-	+	+	+	+	+	+	-
B27B	-	+	+	+	+	+	+	-

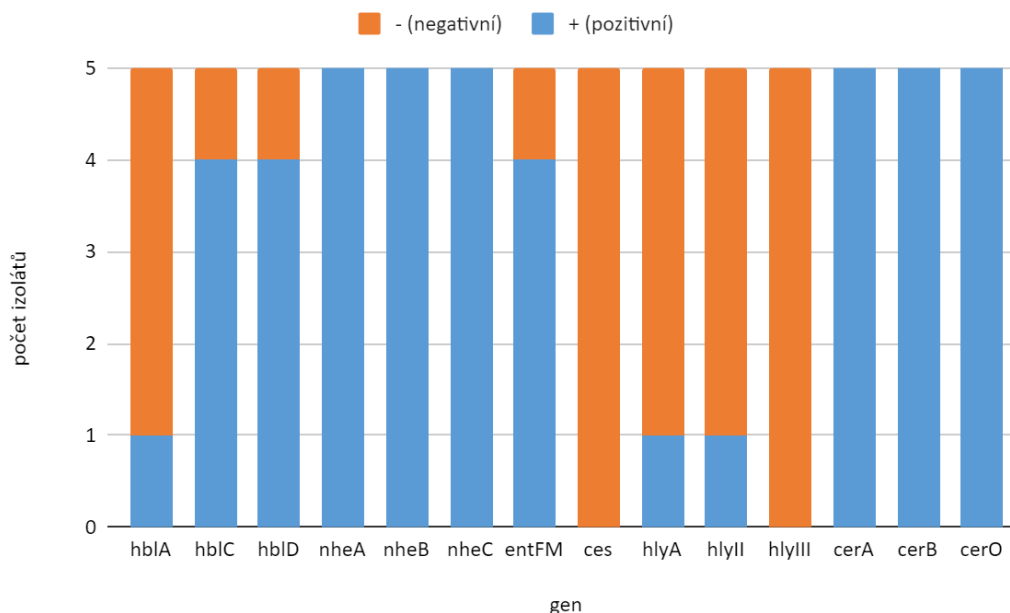
Legenda: + pozitivní, - negativní

Tabulka 17 Přítomnost genů zodpovědných za hemolytickou aktivitu testovaných kmenů *B. cereus*

Kmen	Geny zodpovědné za hemolytickou aktivitu					
	<i>hlyA</i>	<i>hlyII</i>	<i>hlyIII</i>	<i>cerA</i>	<i>cerB</i>	<i>cerO</i>
B82	+	-	-	+	+	+
B7	-	-	-	+	+	+
B11E	-	-	-	+	+	+
B21B	-	-	-	+	+	+
B27B	-	+	-	+	+	+

Legenda: + pozitivní, - negativní

Výsledky jsou znázorněny na obrázku 23. Pět zkoumaných kmenů *B. cereus* testovaných metodou PCR na přítomnost genů kódujících toxiny prokázalo existenci genů pro různé enterotoxiny. Geny *nheA*, *nheB* a *nheC* kódující nehemolytické enterotoxiny a *cerA*, *cerB* a *cerO* kódující cereolyziny byly detekovány u 5/5 vzorků (100 %). U 4 vzorků byly detekovány geny *hblC* a *hblD* kódující toxin hemolyzin BL a *entFM* kódující enterotoxin FM (80 %). U 1/5 byly nalezeny další geny kódující hemolyziny, a to *hblA*, *hlyA*, *hlyII* (20 %). Gen kódující cereulid (*ces*) a hemolyzin III (*hlyIII*) nebyly zaznamenány u žádného izolátu.

Obrázek 23 Přítomnost genů virulence u testovaných kmenů *B. cereus*

Ukázalo se, že genetické determinanty komplexu NHE jsou častěji detekované společně než každý zvlášť. Všechny 5 testovaných kmenů *B. cereus* vykazovaly pozitivní reakci na všechny tři geny (*nheA*, *nheB*, *nheC*). Stejně tomu bylo u genů kódujících cereolysiny *cerA*, *cerB* a *cerO*, celá skupina byla zaznamenána u 5/5 izolátů. Výskyt genů komplexu HBL ukázal nižší distribuci mezi *B. cereus*.

Konkrétně veškeré 3 geny *hbl* (tj. *hblA*, *hblC* a *hblD*) byly detekovány u 1/5 (20 %) kmenu B82, 2 geny byly přítomny ve 3/5 (60 %) vzorků (B11E, B21B a B27B), zatímco u 1/5 testovaných izolátů (*B. cereus* B7) nebyla zjištěna přítomnost genů kompletu HBL. Detekovaných genů kódujících hemolysiny (tj. *hlyA*, *hlyII* a *hlyIII*) bylo také méně než u komplexů výše zmíněných, tedy NHE a HBL. U žádného kmene nebyly identifikovány všechny tři nebo dva geny této skupiny. Pouze 2 (40 %) izoláty byly pozitivní na jeden gen, zatímco 3/5 (60 %) kmenů byly negativní na přítomnost zmíněných genů.

Získané výsledky lze vyhodnotit tak, že izoláty *B. cereus* jsou multitoxigenní a obsahují alespoň jeden gen virulence komplexu NHE nebo HBL. Geny komplexu HBL byly detekovány s menší četností než geny komplexu NHE. Tato nízká prevalence genetických determinantů komplexu HBL ve srovnání s komplexem NHE byla prokázána i v dalších studiích uvedených níže, včetně studie Fiedler et al. (2019) v sousedním Německu. V tomto výzkumu se autoři zaměřili na vzorky izolované z čerstvé zeleniny z maloobchodních trhů. Nicméně, jak je uvedeno ve studii Gdoura-Ben et al. (2019), neschopnost detekovat všechny geny pomocí PCR u většiny izolátů může být způsobena spíše existencí polymorfismu v sekvencích genů než jejich nepřítomností.

Tato zjištění souhlasí také s těmi, která Algammal et al. (2024) potvrdili studií vzorků izolovaných z masa a masných výrobků v Egyptě. Uvedli, že nejčastěji byly v izolátech *B. cereus* identifikovány geny komplexu *nhe*, tedy *nheA*, *nheC* (100 %) a *nheB* (83,3 %). Geny *hblC* a *hblD* byly zjištěny u 59,5 % a *hblA* u 11,9 % izolátů. U všech kmenů testovaných v této diplomové práci byla zjištěna přítomnost genů *nheA*, *nheB* a *nheC* (5/5).

Rovněž byly výsledky podpořeny dalšími studiemi, které publikovali Gdoura-Ben et al. (2019), kdy studie izolátů ze vzorků tuniských potravin, včetně vařeného drůbežího masa, popisuje četnost genů pro enterotoxiny detekované mezi izoláty *B. cereus* pro komplexy NHE a HB v sestupném pořadí následuně: *nheA* (98,9 %), *nheC* (97,7 %), *nheB* (86,8 %), *hblC*, *hblD* (54,6 %), *hblA* (29,9 %). Oproti diplomové práci zde byla prevalence většiny genů nižší. Zejména se jedná o geny komplexu hlb, kde *hblC* a *hblD* byly detekovány s četností 80 % a *hblA* 20 %.

Také ze studie mikroorganismů izolovaných ze vzorků potravin z cateringových kuchyní v Apulii (Itálie) Bonerba et al. (2010) je patrné, že izolované kmeny *B. cereus* prokázaly širokou distribuci genů souvisejících s virulencí. U 12 vzorků masových pokrmů byly geny *hneA*, *hneB* a *hneC* detekovány v deseti vzorcích. Stejně tomu bylo u genu *hblC* a *hblD* (10/12) a gen *hblB* byl zjištěn u 5/10 analyzovaných kmenů (Bonerba et al., 2010).

Výše uvedené výsledky lze srovnat se studií Kowalska et al. (2022), kteří potvrdili studii kmenů *B. cereus* pocházejících z různých potravinářských výrobků v Polsku přítomnost vždy alespoň jednoho genu kódujícího faktor virulence, nejčastěji u genů skupiny *nhe* (91,39 %). Geny komplexu *hbl* byly ve studii Kowalska et al. (2022) zjištěny u 53,56 % kmenů *B. cereus* a velmi nízká frekvence byla zjištěna u genu *ces* (2,62 %). U kmenů analyzovaných v diplomové práci nebyla zjištěna přítomnost *ces* genu u žádného z testovaných izolátů *B. cereus*. Z běžných pozorování plyne, že kmeny *B. cereus* produkující cereulid se nacházejí hlavně v potravinách s vysokým obsahem sacharidů (např. rýži nebo těstovinách). Naopak v produktech s nízkým podílem sacharidů, potravinách bílkovinné povahy nebo s vysokým obsahem tuků, jako jsou zelenina, maso či luštěniny, byl zjištěn nižší výskyt emetických kmenů *B. cereus* (Messelhäusser et al., 2014). Například studie Biesta-Peters et al. (2016) v Nizozemsku uvádí, že 7,2 % kmenů izolovaných z neškrobových produktů bylo schopno produkovat cereulid.

Kromě těchto studií i Didouh et al. (2023) potvrdili, že ze získaných izolátů *B. cereus* ze zařízení na zpracování mléka v Alžírsku byl u 100 % (17/17) přítomen enterotoxigenní gen *entFM*. Prevalence zjištěná v italské studii Progoga et al. (2019) byla relativně nižší. Zde byl u bacilů izolovaných z tvrdých a měkkých sýrů odebraných v jižní Itálii tento gen jedním z nejčastěji detekovaných genů, a to v 92 % případech (127/138). Tyto podíly jsou podobné těm, které byly zjištěny v této diplomové práci, kde u 4/5 (80 %) izolátů byl nalezen gen *entFM*, nicméně výsledky mohou být zkresleny nízkým počtem analyzovaných kmenů

V neposlední řadě se Kim et al. (2015) zabývali distribucí dalších předpokládaných genů faktorů virulence referenčních kmenů *B. cereus*, kdy gen *hlyA* byl detekován ve všech 16 (100 %) referenčních kmenech *B. cereus*, gen *hlyII* ve čtyřech (25 %) a gen *hlyIII* ve 14/16 (80 %) kmenech. Ve srovnání s touto diplomovou prací je prevalence daleko vyšší, zde byly geny *hlyA* a *hlyII* přítomny pouze u 1/5 (20 %) kmenů a gen *hlyIII* nebyl detekován u žádného z testovaných vzorků. Avšak k podobným závěrům dospěla i studie Glasset et al. (2016), která se zaměřila na kmeny *B. cereus* izolované ze vzorků potravin analyzovaných ze 74 suspektních alimentárních ohnisek ve Francii v letech 2007 až 2014, kdy byla zjištěna přítomnost genu *hlyII* u 37/159 (23 %) izolátů.

U 6/16 (38 %) referenčních kmenů *B. cereus* byl detekován gen *cerA*, gen *cerB* byl zjištěn v devíti (56 %) vzorcích a gen *cerO* v 8/16 (50 %) případech (Kim et al., 2015). U kmenů použitých pro výzkum diplomové práce se tyto geny vyskytovaly daleko častěji. U každého z 5 izolátů byly přítomny všechny tři geny (100 %). S tejnými výsledky byly publikovány i ve studii Bianco et al. (2021), kdy ve všech izolátech hemokultur odebraných od 17 epidemiologicky nepříbuzných pacientů

v období 2004–2018 ve fakultní nemocnici v Bari v jižní Itálii, byly identifikovány dva geny *cerA* a *cerB*.

Jak bylo uvedeno výše, výskyt genů pro enterotoxiny se velmi liší v závislosti na studii. Tato variabilita může být připsána různým geografickým lokalitám, různému původu kmenů, množství analyzovaných kmenů a výběru primerů pro PCR testy.

Podle výsledků našeho testování i proběhlých studií lze důrazně doporučit sledování potenciálně patogenního *B. cereus*. Další zkoumání přítomnosti jednoho nebo více genů kódujících enterotoxiny, může být zásadní pro bezpečnost potravin, a tedy i pro lidské zdraví. Dalším důvodem může být i rostoucí výskyt tohoto organismu u invazivních infekcí, kde byly toxiny *B. cereus* v roce 2022 příčinou nejčastěji hlášených suspektních alimentárních ohnisek v Evropské Unii způsobených bakteriálními toxiny a byly zodpovědné za dvě úmrtí (EFSA a ECDC, 2023). Vzhledem k těmto závěrům je důležité také zmínit, že v nařízení Komise ES č. 2073/2005 neexistují mikrobiologické limity pro *B. cereus* v potravinách, vyjma sušené počáteční kojenecké výživy (Bonerba et al., 2010).

Zároveň však výsledky PCR o výskytu enterotoxinových genů je také třeba brát s rezervou, jelikož nelze výskyt genů určitých enterotoxinů přímo převést na schopnost jejich produkce. Vlastní transkripci a translaci ovlivňují jiné mechanismy genetické regulace, a vzhledem k tomu, že tyto mechanismy někdy nebývají zohledněny, může to vést k nadhodnocení výsledků, a tedy i vzniklého rizika pro člověka.

4.5 Testování tvorby biofilmu

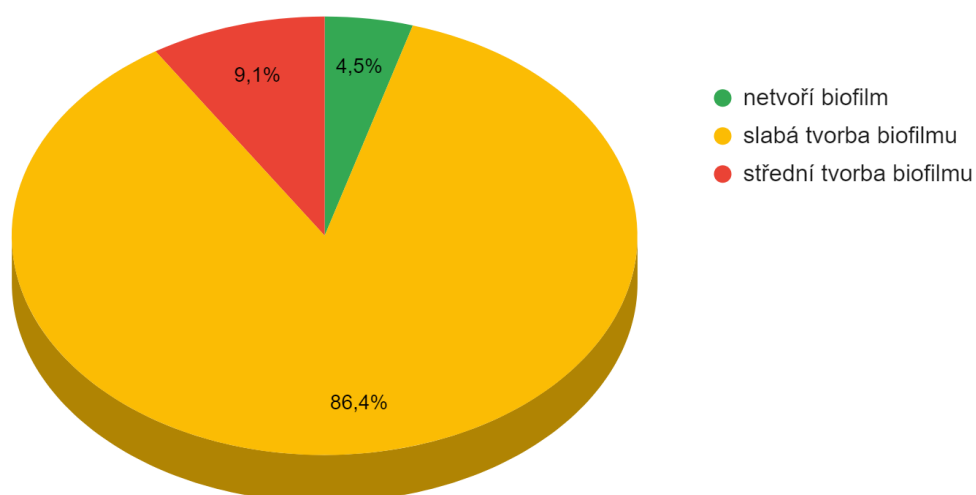
V Tabulce 18 jsou zaznamenány průměrné hodnoty optické denzity u testovaných bakterií v čistém bujónu, pomocí kterých byla hodnocena tvorba biofilmu. Hraniční hodnota rozdělující testované kmeny na biofilm pozitivní a biofilm negativní byla určena jako 0,13.

Z naměřených hodnot bylo 21 kmenů z testovaných 22 (95,45 %) vyhodnoceno jako bakterie tvořící biofilm, pouze 1 kmen *B. cereus* B27B byl vyhodnocen jako netvořící biofilm (4,55 %). Přítomnost střední tvorby biofilmu zjištěna u dvou izolátů (9,09 %), a to: *Bacillus pumilus* B14C a *Fictibacillus phosphovorans* B23A. Ostatní izoláty (19/22; 86,36 %) tvořily biofilm slabě. Pro lepší představu jsou výsledky znázorněny na obrázku 24.

Tabulka 18 Hodnocení tvorby biofilmu u testovaných kmenů

Testované bakterie	OD	hodnocení	Testované bakterie	OD	hodnocení
B7, <i>Bacillus cereus</i>	0,17	+	B2H, <i>Lysinibacillus fusiformis</i>	0,14	+
B11E, <i>Bacillus cereus</i>	0,16	+	B4H, <i>Lysinibacillus fusiformis</i>	0,18	+
B21B, <i>Bacillus cereus</i>	0,13	+	B28C, <i>Lysinibacillus fusiformis</i>	0,14	+
B27B, <i>Bacillus cereus</i>	0,12	-	B18H, <i>Paenibacillus amylolyticus</i>	0,17	+
B82, <i>Bacillus cereus</i>	0,15	+	C2H, <i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	0,13	+
B4D, <i>Bacillus pumilus</i>	0,18	+	I1H, <i>Paenibacillus humicus</i>	0,13	+
B14C, <i>Bacillus pumilus</i>	0,26	++	B3G, <i>Paenibacillus odorifer</i>	0,13	+
B81, <i>Bacillus thuringiensis</i>	0,14	+	B43, <i>Paenibacillus taichungensis</i>	0,17	+
B1H, <i>Cytobacillus horneckiae</i>	0,13	+	B11H, <i>Priestia aryabhatai</i>	0,16	+
C1H, <i>Cytobacillus horneckiae</i>	0,15	+	B15, <i>Priestia flexa</i>	0,17	+
B23A, <i>Fictibacillus phosphorivorans</i>	0,26	++	B7C, <i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	0,18	+

Legenda: - netvoří biofilm, + slabě tvoří biofilm, ++ silně tvoří biofilm



Obrázek 24 Vyhodnocení podílu testovaných kmenů podle schopnosti tvorby biofilmu

Tato zjištění souhlasí se studií Algammal et al. (2024) a jejich testovanými izoláty z masa a masných výrobků v Egyptě. Uvedli, že 88,1 % (37/42) získaných kmenů *B. cereus* bylo pozitivně testováno na produkci biofilmu. Mezi pozitivními kmeny byly 4/37 izoláty (10,8 %) slabými

producenty biofilmu, deset izolátů (27 %) středně silnými producenty biofilmu a 23 izolátů (62,2 %) bylo silnými producenty biofilmu. Podobně naše výsledky souhlasí s Osman et al. (2018), kteří uvedli produkci biofilmu u 83,3 % izolátů, z nich 33,3 % byly silnými producenty biofilmu, získaných z různých vzorků masa v Egyptě.

U kmenů použitých pro výzkum diplomové práce se vyskytovalo srovnatelné množství kmenů tvořících biofilm (95,45 %), nicméně míra tvorby byla daleko nižší. Většina byla slabými producenty biofilmu (86,4 %) a pouze 9,09 % se dalo označit jako středně produkující biofilm. Tyto rozdíly mohly být způsobeny různými kultivačními podmínkami, kdy ve studiích bylo použito odlišné kultivační médium (TSB), jiné teploty kultivace a kratší doby kultivace.

Studie Özdemir et al. (2018) v Turecku se zabývala nejenom kmeny *B. cereus*, ale také dalšími druhy, kde z 52 testovaných izolátů *Bacillus* spp. bylo 24 (46,1 %) považováno za producenty biofilmu. Výskyt produkce biofilmu u izolátů *Bacillus* z ryb a mletého hovězího masa byl 50 %. Izoláty produkující biofilm byly kategorizovány jako silní (13 izolátů), střední (6 izolátů) a slabí producenti (5 izolátů). Nejčastějším druhem považovaným za producenta biofilmu byl *B. thuringiensis* (80 %). Produkce biofilmu u ostatních druhů *Bacillus* byla následující: *B. licheniformis* 66,7 %, *B. anthracis*, *B. thuringiensis* 50 % (1/2, 5/10), *B. pumilus* 50 % (1/2), *B. subtilis* 33,3 %. Žádný z testovaných kmenů *Heyndrickxia coagulans* (dříve *B. coagulans*) a *Cytobacillus firmus* (dříve *B. firmus*) nebyl schopen vytvořit biofilm.

V rámci této diplomové práce byly zkoumány 2 kmeny *B. pumilus* a 1 kmen *B. thuringiensis*, kde všechny izoláty produkovaly biofilm. Nicméně výsledek této práce může být zkreslený kvůli malému množství použitých kmenů. Přesto však lze říci, že studie zdůraznily, že také kmeny nespádající do rodu *B. cereus* izolované z různých zdrojů masa mohou být také variabilními producenty biofilmu. Pokud je známo, schopnost těchto druhů tvořit biofilm nebyla dříve příliš studována.

Jak bylo uvedeno výše, schopnost tvorby biofilmu se velmi liší v závislosti na studii. Tato variabilita může být připsána různým zdrojům kmenů a faktorům prostředí, jako je dostupnost živin, osmolalita, teplota či doba růstu. Také různé povrchy, jako jsou nerezová ocel, plast a sklo, mohou významně ovlivnit jeho tvorbu. Například Kwon et al. (2017) během testování izolátů z prostředí souvisejícím s potravinářským průmyslem, zdůraznil, že větší tvorba biofilmu *B. cereus* byla zaznamenána nerezové oceli při 30 °C ve srovnání s plastovými a skleněnými povrchy při 25 a 30 °C.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo identifikovat a charakterizovat grampozitivní sporotvorné tyčinky izolované z potravin nepodporujících růst mikroorganismů. Do této studie byly zařazeny masové pomazánky a lyofilizované ovoce vyrobené v Laboratoři výzkumu jakosti a bezpečnosti potravin na Katedře logistiky Fakulty vojenského leadershipu Univerzity obrany Brno.

Identifikace 22 mikroorganismů byla provedena pomocí sekvenace genu pro 16S rRNA. Metodou sekvenace genu pro 16S rRNA byly identifikovány vyizolované kmeny bakterií. Mezi identifikované druhy patřily zástupci z rodů *Bacillus*, *Cytobacillus*, *Fictibacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Priestia* a *Psychrobacillus*. Nejvyšší zastoupení měl *Bacillus cereus*.

U 9 vybraných mikroorganismů byla sledována schopnost růstu při různých teplotách pomocí růstových křivek. Všechny byly schopny růstu při 30 °C a většina rostla i při teplotě 25 °C, což odpovídá pokojové teplotě, při které mohou být potraviny mikrobiologicky nerizikové uchovávány.

Citlivost na antibiotika byla zkoumána pomocí dvou metod – diskové difuzní metody a detekce genů antibiotické rezistence metodou PCR. Pomocí diskové difuzní metody byla stanovena citlivost na 15 antibiotik u 22 mikroorganismů, kdy nejvyšší citlivost byla prokázána u amikacinu, gentamicinu, tobramycinu, a vankomycinu. Naopak nejvíce rezistentních testovaných kmenů bylo zjištěno u penicilinu. Pomocí metody PCR byla sledována přítomnost 9 genů antibiotické rezistence u 15 mikroorganismů vykazujících rezistenci na základě výsledků diskové difuzní metody. Nejvyšší prevalence byla u genu *norA* kodující rezistenci k makrolidovým fluorochinolonovým antibiotikům. Naopak nejčastější absence platila pro gen kodující rezistenci k betalaktamovým (*blaOXA*) a makrolidovým antibiotikům (*mph*).

Prevalence 14 genů virulence u 5 kmenů *B. cereus* byla zjišťována také metodou PCR. Nejčastěji se vyskytujícími byly geny pro nehemolytické enterotoxiny (*nheA*, *nheB*, *nheC*) a geny kódující cereolyziny (*cerA*, *cerB* a *cerO*). Naopak nejnižší prevalence byla u genů *ces* (kodující cereulid) a *hlyIII* (kodující hemolyzin III).

Schopnost tvorby biofilmu byla ověřena modifikovanou Christensenovou metodou. Z 22 testovaných mikroorganismů nebyla tvorba biofilmu prokázána u jednoho z nich, u 19 byla zjištěna slabá tvorba biofilmu a 2 patřily mezi silně tvořící biofilm.

Závěrem lze konstatovat, že sporotvorné tyčinky jsou přítomné i v potravinářských výrobcích považovaných za mikrobiologicky nerizikové. Jelikož se jednalo i o podmíněně patogenní druhy,

např. *B. cereus*, nesprávná manipulace s těmito potravinami tak může představovat potenciální riziko pro zdraví konzumenta.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ADAMSKI, Patryk et al., 2023. Prevalence and Antibiotic Resistance of *Bacillus* sp. Isolated from Raw Milk. *Microorganisms* [online]. **11**(4) [cit. 2024-04-06]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041065>
- ADDIS, Mekonnen. 2015. Major causes of meat spoilage and preservation techniques: A Review. *Food Science and Quality Management* [online]. **41**, 101-114 [cit. 2024-04-06]. ISSN 2225-0557. Dostupné z: https://www.academia.edu/download/52772541/causes_of_spoilage.pdf
- AHMED, Iftikhar et al., 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **57**(5), 1117-1125 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63867-0>
- ALAV, Ilyas, et al., 2018. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. **73**(8), 2003-2020 [cit. 2024-04-06]. ISSN 0305-7453. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>
- ALGAMMAL, Abdelazeem M. et al., 2024. Meat and meat products as potential sources of emerging MDR *Bacillus cereus*: groEL gene sequencing, toxigenic and antimicrobial resistance. *BMC Microbiology* [online]. **24**(1) [cit. 2024-04-06]. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03204-9>
- BELHADJ SLIMEN, Imen et al., 2014. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *International Journal of Hyperthermia* [online]. **30**(7), 513-523 [cit. 2024-04-06]. ISSN 0265-6736. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.971446>
- BERIC, Tanja et al., 2018. Identification and antibiotic resistance of *Bacillus* spp. isolates from natural samples. *Archives of Biological Sciences* [online]. **70**(3), 581-588 [cit. 2024-04-06]. ISSN 0354-4664. Dostupné z: <https://doi.org/10.2298/ABS180302019B>
- BEUCHAT, Larry R. et al., 2013. Low-Water Activity Foods: Increased Concern as Vehicles of Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection* [online]. **76**(1), 150-172 [cit. 2024-04-06]. ISSN 0362028X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-211>
- BIANCO, Angelica et al., 2021. Characterization of *Bacillus cereus* Group Isolates From Human Bacteremia by Whole-Genome Sequencing. *Frontiers in Microbiology* [online]. **11** [cit. 2024-04-06]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.599524>

- BIESTA-PETERS, Elisabeth G. et al., 2016. Characterization and Exposure Assessment of Emetic *Bacillus cereus* and Cereulide Production in Food Products on the Dutch Market. *Journal of Food Protection* [online]. **79**(2), 230-238 [cit. 2024-04-06]. ISSN 0362028X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-217>
- BONERBA, Elisabetta et al., 2010. Detection of potentially enterotoxigenic food-related *Bacillus cereus* by PCR analysis. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. **45**(6), 1310-1315 [cit. 2024-04-06]. ISSN 0950-5423. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02257.x>
- BORRISS, Rainer. *Bacillus*. In: *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 107-132 [cit. 2023-04-06]. ISBN 9780128234143. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00007-1>
- CARLIN, F. a C. NGUYEN-THE. Pathogen update: *Bacillus* species. In: *Advances in Microbial Food Safety* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 70-96 [cit. 2023-04-06]. ISBN 9780857094384. Dostupné z: <https://doi:10.1533/9780857098740.2.70>
- CIOBANU, Marius-Mihai, et al. 2021. The influence of technological parameters on the sensory quality of pork paté. *Lucrări Științifice* [online]. **64**(1) [cit. 2024-04-06]. Dostupné z: <https://repository.uaiasi.ro/handle/20.500.12811/2995>
- DIDOUH, Nassima et al., 2023. Genomic Diversity and Virulence Genes Characterization of *Bacillus cereus* sensu lato Isolated from Processing Equipment of an Algerian Dairy Plant. *Journal of Food Quality* [online]. **2023**, 1-11 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1745-4557. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2023/5703334>
- DITTMANN, Christin et al., 2015. Dormant *Bacillus* spores protect their DNA in crystalline nucleoids against environmental stress. *Journal of Structural Biology* [online]. **191**(2), 156-164 [cit. 2024-04-06]. ISSN 10478477. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.06.019>
- DUPORT, Catherine, Michel JOBIN a Philippe SCHMITT, 2016. Adaptation in *Bacillus cereus*: From Stress to Disease. *Frontiers in Microbiology* [online]. **7** [cit. 2024-04-06]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01550>
- EFSA (European Food Safety Authority) 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013, 2015. *EFSA Journal* [online]. **13**(1) [cit. 2024-04-06]. ISSN 18314732. Dostupné z: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991>

- EFSA (European Food Safety Authority) 2016. Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal* [online]. **14**(7) [cit. 2024-04-06]. ISSN 18314732. Dostupné z: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4524>
- EFSA (European Food Safety Authority) a ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2023. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal* [online]. **21**(12) [cit. 2024-04-06]. ISSN 18314732. Dostupné z: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>
- FAILLE, C. et al., 2014. Sporulation of *Bacillus* spp. within biofilms: A potential source of contamination in food processing environments. *Food Microbiology* [online]. **40**, 64-74 [cit. 2024-04-06]. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.12.004>
- FAILOR, K. C., et al., 2019. Lysinibacillus. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. [online]. Wiley, 2019, s. 1–62. [cit. 2023-04-06] Dostupné z: <https://doi:10.1002/9781118960608.gbm01570>
- FIEDLER, Gregor et al., 2019. Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets. *BMC Microbiology* [online]. **19**(1) [cit. 2024-04-06]. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1632-2>
- FERNÁNDEZ-FUENTES, Miguel Angel et al., 2014. Genetic determinants of antimicrobial resistance in Gram positive bacteria from organic foods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **172**, 49-56 [cit. 2024-04-06]. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.032>
- GDOURA-BEN AMOR, Maroua et al., 2019. Toxigenic potential and antimicrobial susceptibility of *Bacillus cereus* group bacteria isolated from Tunisian foodstuffs. *BMC Microbiology* [online]. **19**(1) [cit. 2024-04-06]. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1571-y>
- GLAESER, Stefanie P. et al., 2013. *Fictibacillus phosphorivorans* gen. nov., sp. nov. and proposal to reclassify *Bacillus arsenicus*, *Bacillus barbaricus*, *Bacillus macauensis*, *Bacillus nanhaiensis*, *Bacillus rigui*, *Bacillus solisalsi* and *Bacillus gelatini* in the genus *Fictibacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **63**(8), 2934-2944 [cit. 2023-04-06]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.049171-0>

GLASSET, Benjamin et al., 2016. Bacillus cereus-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation. *Eurosurveillance* [online]. **21**(48) [cit. 2024-04-06]. ISSN 1560-7917. Dostupné z: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.48.30413>

GRADY, Elliot Nicholas et al., 2016. Current knowledge and perspectives of Paenibacillus: a review. *Microbial Cell Factories* [online]. **15**(1) [cit. 2023-04-06]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: <https://doi:10.1186/s12934-016-0603-7>

GRIFFITHS, M.W. a H. SCHRAFT, 2017. Bacillus cereus Food Poisoning. In: *Foodborne Diseases* [online]. Elsevier, s. 395-405 [cit. 2024-04-06]. ISBN 9780123850072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00020-6>

GUPTA, Radhey S. et al., 2020. Robust demarcation of 17 distinct Bacillus species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus Bacillus limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **70**(11), 5753-5798 [cit. 2023-04-06]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>

HAQUE, M. Atique, et al., 2021. Pathogenicity of feed-borne Bacillus cereus and its implication on food safety. *Agrobiological Records* [online]. **3**, 1-16 [cit. 2024-04-06]. ISSN 27087182. Dostupné z: <https://doi.org/10.47278/journal.abr/2020.015>

HELMANN, John D, 2016. Bacillus subtilis extracytoplasmic function (ECF) sigma factors and defense of the cell envelope. *Current Opinion in Microbiology* [online]. **30**, 122-132 [cit. 2024-04-06]. ISSN 13695274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.02.002>

HOFFMANN, Tamara a BREMER, Erhard, 2017. Guardians in a stressful world Bacillus subtilis: the Opu family of compatible solute transporters from Bacillus subtilis. *Biological Chemistry* [online]. **398**(2), 193-214 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1437-4315. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0265>

HUANG, Yiying, et al., 2020. Bacillus cereus spores and toxins – The potential role of biofilms. *Food Microbiology* [online]. **90** [cit. 2024-04-06]. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103493>

CHITRAKAR, Bimal, et al., 2019. Dehydrated foods: Are they microbiologically safe? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. **59**(17), 2734-2745 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1466265>

- JEONG, Do-Won et al., 2020. Two genes involved in clindamycin resistance of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* identified by comparative genomic analysis. *PLOS ONE* [online]. **15**(4) [cit. 2024-04-06]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231274>
- JOVANOVIĆ, Jelena et al., 2021. *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. **20**(4), 3719-3761 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1541-4337. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12785>
- KIM, Min-Ju et al., 2015. Various Enterotoxin and Other Virulence Factor Genes Widespread Among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. **25**(6), 872-879 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1017-7825. Dostupné z: <https://doi.org/10.4014/jmb.1502.02003>
- KOHLSTEDT, Michael et al., 2014. Adaptation of *Bacillus subtilis* carbon core metabolism to simultaneous nutrient limitation and osmotic challenge: a multi-omics perspective. *Environmental Microbiology* [online]. **16**(6), 1898-1917 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1462-2912. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12438>
- KOWALSKA, Joanna et al., 2022. Characteristic and Antimicrobial Resistance of *Bacillus cereus*/i Group Isolated from Food in Poland. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* [online]. **72**(3), 297-304 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1230-0322. Dostupné z: <https://doi.org/10.31883/pjfns/152677>
- KRISHNAMURTHI, S. et al., 2010. *Psychrobacillus* gen. nov. and proposal for reclassification of *Bacillus insolitus* Larkin & Stokes, 1967, *B. psychrotolerans* Abd-El Rahman et al., 2002 and *B. psychrodurans* Abd-El Rahman et al., 2002 as *Psychrobacillus insolitus* comb. nov., *Psychrobacillus psychrotolerans* comb. nov. and *Psychrobacillus psychrodurans* comb. nov. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. **33**(7), 367-373 [cit. 2023-04-06]. ISSN 07232020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.06.003>
- KÄMPFER, P. & GLAESER, SP. 2023. *Fictibacillus*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [online]. Wiley. [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01620>
- LE MARC, Yvan et al., 2022. Modelling the thermal inactivation of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **368** [cit. 2024-04-06]. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109607>

- LEE, F. L. et al., 2008. *Paenibacillus taichungensis* sp. nov., from soil in Taiwan. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. **58**(11), 2640-2645 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65776-0>
- LOGAN, N. A., & VOS, P. D., 2015. *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. [online]. Wiley, s. 1–163. [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://doi:10.1002/9781118960608.gbm00530>
- LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Bacillus*. [online]. 2023 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=Bacillus>
- LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Cytobacillus*. [online]. 2023 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=cytobacillus>
- LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Fictibacillus*. [online]. 2023 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=Fictibacillus>
- LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Lysinibacillus*. [online]. 2023 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=Lysinibacillus>
- LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Paenibacillus*. [online]. 2023 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=Paenibacillus>
- LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Priestia*. [online]. 2023 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=priestia>
- LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Psychrobacillus*. [online]. 2023 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=psychrobacillus>
- LV, Ruiling et al., 2019. Analysis of *Bacillus cereus* cell viability, sublethal injury, and death induced by mild thermal treatment. *Journal of Food Safety* [online]. **39**(1) [cit. 2024-04-22]. ISSN 0149-6085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jfs.12581>
- MAIER, Raina M. a Ian L. PEPPER, 2015. Bacterial Growth. In: *Environmental Microbiology* [online]. Elsevier, s. 37-56 [cit. 2024-04-06]. ISBN 9780123946263. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00003-X>
- MAJED, Racha et al., 2016. *Bacillus cereus* Biofilms—Same, Only Different. *Frontiers in Microbiology* [online]. **7** [cit. 2024-04-06]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01054>

MESSELHÄUSSER, Ute et al., 2014. Emetic *Bacillus cereus* Are More Volatile Than Thought: Recent Foodborne Outbreaks and Prevalence Studies in Bavaria (2007–2013). *BioMed Research International* [online]. **2014**, 1-9 [cit. 2024-04-06]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2014/465603>

MILLS, Emma et al., 2022. Comparative Analysis of *Bacillus cereus* Group Isolates' Resistance Using Disk Diffusion and Broth Microdilution and the Correlation between Antimicrobial Resistance Phenotypes and Genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **88**(6), e02302-21 [cit. 2024-04-06]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/aem.02302-21>

MOUSA, Dina et al., 2020. Molecular studies on antibiotic resistant *Bacillus cereus* isolated from meat products and human in Kaliobia, Egypt. *Benha Veterinary Medical Journal* [online]. **38**(2), 125-130 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1110-6581. Dostupné z: <https://doi.org/10.21608/bvmj.2020.25802.1187>

Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. In: *EUR-Lex* [online]. 32007R1441 [cit. 2024-04-06]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32007R1441>

OSMAN, Kamelia M. et al., 2018. Poultry and beef meat as potential seedbeds for antimicrobial resistant enterotoxigenic *Bacillus* species: a materializing epidemiological and potential severe health hazard. *Scientific Reports* [online]. **8**(1) [cit. 2024-04-06]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29932-3>

OWUSU-KWARTENG et al., 2017. Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products. *BMC Microbiology* [online]. **17**(1) [cit. 2024-03-06]. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0975-9>

ÖZDEMİR, Fatma a Seza ARSLAN, 2018. Biofilm Production and Antimicrobial Susceptibility Profiles of *Bacillus* spp. from Meats. *Sakarya University Journal of Science* [online]. **22**(6), 1674-1682 [cit. 2024-04-06]. ISSN 2147-835X. Dostupné z: <https://doi.org/10.16984/aufenbilder.395016>

PAGÁN, Rafael a GARCÍA-GONZALO, Diego. 2015. Influence of environmental factors on bacterial biofilm formation in the food industry: a review. *Journal of Postdoctoral Research* [online]. **3**(6), 3–13 [cit. 2024-04-06]. ART-2015-95845. Dostupné z: https://zagan.unizar.es/record/56668/files/texto_completo.pdf

PANDEY, Abhay K., et al., 2022. Paenibacillus polymyxa. *Trends in Microbiology* [online]. **31**(6), 657-659 [cit. 2023-04-06]. ISSN 0966842X. Dostupné z: <https://doi:10.1016/j.tim.2022.11.010>

PATEL, Sudip a Radhey S. GUPTA, 2020. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus Bacillus: Proposal for six new genera of Bacillus species, Peribacillus gen. nov., Cytobacillus gen. nov., Mesobacillus gen. nov., Neobacillus gen. nov., Metabacillus gen. nov. and Alkalihalobacillus gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **70**(1), 406-438 [cit. 2023-04-06]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003775>

PAWLOWSKI, Andrew C. et al., 2018. The evolution of substrate discrimination in macrolide antibiotic resistance enzymes. *Nature Communications* [online]. **9**(1) [cit. 2024-04-08]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org//10.1038/s41467-017-02680-0>

PONTIERI, Eugenio, 2016. Bacillus cereus Group Diagnostics. In: *The Diverse Faces of Bacillus cereus* [online]. Elsevier, s. 15-33 [cit. 2023-04-06]. ISBN 9780128014745. Dostupné z: <https://doi.org//10.1016/B978-0-12-801474-5.00002-5>

PROROGA, Yolande et al., 2019. Occurrence and toxin gene profile of Bacillus cereus in dairy products. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences* [online]. **9**(1), 58-62 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1338-5178. Dostupné z: <https://doi.org//10.15414/jmbfs.2019.9.1.58-62>

REZLER, Ryszard, Mirosława KRZYWDZIŃSKA-BARTKOWIAK a Michał PIĄTEK, 2021. The influence of the substitution of fat with modified starch on the quality of pork liver pâtés. *LWT* [online]. **135** [cit. 2024-04-06]. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org//10.1016/j.lwt.2020.110264>

SAVIC, Dejana et al., 2016. Antimicrobial susceptibility and β -lactamase production in Bacillus cereus isolates from stool of patients, food and environment samples. *Vojnosanitetski pregled* [online]. **73**(10), 904-909 [cit. 2024-04-06]. ISSN 0042-8450. Dostupné z: <https://doi.org//10.2298/VSP150415134S>

SÁNCHEZ-MALDONADO, Alma Fernanda, Alvin LEE a Jeffrey M. FARBER, 2018. Methods for the Control of Foodborne Pathogens in Low-Moisture Foods. *Annual Review of Food Science and Technology* [online]. **9**(1), 177-208 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1941-1413. Dostupné z: <https://doi.org//10.1146/annurev-food-030117-012304>

SCHINDLER, Bryan D. a Glenn W. KAATZ, 2016. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. *Drug Resistance Updates* [online]. **27**, 1-13 [cit. 2024-04-06]. ISSN 13687646. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.04.003>

SHAWISH, Reyad a TARABEES Reda, 2017. Prevalence and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* isolated from beef products in Egypt. *Open Veterinary Journal* [online]. **7**(4), 337-341 [cit. 2024-04-06]. ISSN 2218-6050. Dostupné z: <https://doi.org/10.4314/ovj.v7i4.9>

SMELT, J. P. P. M. a S. BRUL, 2014. Thermal Inactivation of Microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. **54**(10), 1371-1385 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.637645>

STEPANOVIĆ, SRDJAN et al., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. In: *APMIS* [online]. **115**(8), s. 891-899 [cit. 2024-03-06]. ISSN 0903-4641. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x

STRAHL, Henrik a Jeff ERRINGTON, 2017. Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function. *Annual Review of Microbiology* [online]. **71**(1), 519-538 [cit. 2024-04-06]. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095630>

ŠILHOVÁ-HRUŠKOVÁ, L., et al. 2015. Detection of biofilm formation by selected pathogens relevant to the food industry. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie: časopis Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii České lékařské společnosti JE Purkyně*, **64**(3), s 169-175.

TÓTH, Adrienn Gréta et al., 2021. Mobile Antimicrobial Resistance Genes in Probiotics. *Antibiotics* [online]. **10**(11) [cit. 2024-04-06]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111287>

TUIPULOTU, Daniel Enosi et al., 2021. *Bacillus cereus*: Epidemiology, Virulence Factors, and Host–Pathogen Interactions. *Trends in Microbiology* [online]. **29**(5), 458-471 [cit. 2024-04-06]. ISSN 0966842X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.09.003>

VAISHAMPAYAN, Parag et al., 2010. *Bacillus horneckiae* sp. nov., isolated from a spacecraft-assembly clean room. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **60**(5), 1031-1037 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.008979-0>

- VAZ-MOREIRA, Ivone et al., 2007. Paenibacillus humicus sp. nov., isolated from poultry litter compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **57**(10), 2267-2271 [cit. 2024-04-06]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65124-0>
- VIDIC, Jasmina et al., 2020. Food Sensing: Detection of Bacillus cereus Spores in Dairy Products. *Biosensors* [online]. **10**(3) [cit. 2024-04-30]. ISSN 2079-6374. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bios10030015>
- WANG, Dayuan et al., 2023. Novel drying techniques for controlling microbial contamination in fresh food: A review. *Drying Technology* [online]. **41**(2), 172-189 [cit. 2024-04-06]. ISSN 0737-3937. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/07373937.2022.2080704>
- WASH, Pari et al., 2022. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Respective Genes among Bacillus spp., a Versatile Bio-Fungicide. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. **19**(22) [cit. 2024-04-06]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijerph192214997>
- WHITMAN, William B., ed., 2015. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [online]. Wiley [cit. 2023-04-06]. ISBN 9781118960608. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781118960608>
- XIN, Weishan et al., 2023. Effect of pressure-assisted thermal sterilization combining with ϵ -polylysine on Bacillus subtilis spore proteins, nucleic acids and other intraspore substances. *Food Science and Technology* [online]. **43** [cit. 2024-04-06]. ISSN 1678-457X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/fst.15022>
- YOUSSIF, N. H. et al., 2021. Genes conferring anti-microbial resistance in cattle with subclinical mastitis. *BULGARIAN JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE* [online]. **24**(1), 67-85 [cit. 2024-03-06]. ISSN 13133543. Dostupné z: <https://doi.org/10.15547/bjvm.2019-0028>
- YU, Pengfei et al., 2019. Bacillus cereus Isolated From Vegetables in China: Incidence, Genetic Diversity, Virulence Genes, and Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Microbiology* [online]. **10** [cit. 2024-04-06]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00948>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CIP	Clean-in-Place
CFU	kolonie tvořící jednotky
CSLI	Institut pro klinické a laboratorní standardy (anglicky Clinical & Laboratory Standards Institute)
ECDC	Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí (anglicky European Centre for Disease Prevention and Control)
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin (anglicky European Food Safety Authority)
EUCAST	Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (anglicky European Committee on antimicrobial susceptibility testing)
GMP	správná výrobní praxe
HACCP	analýza rizik kritických kontrolních bodů
HBL	hemolysin BL
NHE	nehemolytický enterotoxin
OD	optická denzita
ODc	hraniční hodnota optické denzity
PCR	Polymerázová řetězová reakce (anglicky polymerase chain reaction)
SD	směrodatná odchylka

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Tvorba spor sporotvorným <i>B. cereus</i> (Vidic et al., 2020).....	28
Obrázek 2 Struktura bakteriálních spor (Vidic et al., 2020).....	28
Obrázek 3 Schematický diagram zvýrazňující fáze tvorby biofilmu u <i>B. subtilis</i> (Alav et al., 2018).....	29
Obrázek 4 Typická růstová křivka bakteriální populace získaná dvěma metodami sledujícími růst (dle Maier a Pepper, 2015).....	44
Obrázek 5 Schéma nanesení vzorků do mikrotitrační destičky	50
Obrázek 6 Vyhodnocení podílu identifikovaných kmenů podle příslušných druhů.....	53
Obrázek 7 Růstové křivky <i>Bacillus cereus</i> B7 kultivovaného za 3 různých teplot.....	54
Obrázek 8 Růstové křivky <i>Bacillus cereus</i> B21B kultivovaného za 3 různých teplot	54
Obrázek 9 Růstové křivky <i>Bacillus pumilus</i> B4D kultivovaného za 3 různých teplot.....	55
Obrázek 10 Růstové křivky <i>Cytobacillus horneckiae</i> B1H kultivovaného za 3 různých teplot.....	56
Obrázek 11 Růstové křivky <i>Lysinibacillus fusiformis</i> B2H kultivovaného za 3 různých teplot	57
Obrázek 12 Růstové křivky <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> C2H kultivovaného za 3 různých teplot	58
Obrázek 13 Růstové křivky <i>Paenibacillus humicus</i> I1H kultivovaného za 3 různých teplot.....	59
Obrázek 14 Růstové křivky <i>Paenibacillus taichungensis</i> B43 kultivovaného za 3 různých teplot ..	60
Obrázek 15 Růstové křivky <i>Psychrobacillus psychrodurans</i> B7C kultivovaného za 3 různých teplot	61
Obrázek 16 Výsledky diskové difuzní metody pro <i>Paenibacillus taichungensis</i>	62
Obrázek 17 Vyhodnocení působení antibiotik na testované kmeny	65
Obrázek 18 Vyhodnocení zastoupení rezistentních, intermediárních a citlivých kmenů na vybraná testovaná antibiotika	66
Obrázek 19 Vyhodnocení podílu rezistentních kmenů podle skupin testovaných antibiotik.....	67
Obrázek 20 Výsledky elektroforézy pro vybraný gen antibiotické rezistence	70
Obrázek 21 Prevalence zastoupení genů antimikrobiální rezistence u testovaných kmenů	72
Obrázek 22 Výsledky elektroforézy pro vybrané geny virulence.....	75
Obrázek 23 Přítomnost genů virulence u testovaných kmenů <i>B. cereus</i>	76
Obrázek 24 Vyhodnocení podílu testovaných kmenů podle schopnosti tvorby biofilmu	80

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Nové technologie sušení potravin (Wang et al., 2023).....	22
Tabulka 2 Působení faktorů prostředí na tvorbu bakteriálního biofilmu v potravinářských provozech (Pagán & García-Gonzalo, 2015).....	30
Tabulka 3 Srovnání onemocnění z potravin způsobená <i>Bacillus cereus</i> (Griffiths a Schraft, 2017)	31
Tabulka 4 Hraniční průměry inhibičních zón pro <i>Bacillus</i> spp. u testovaných antibiotik (dle metodiky EUCAST).....	45
Tabulka 5 Použité primery pro detekci vybraných genů antibiotické rezistence	46
Tabulka 6 Teploty annealigu pro použité sady primerů k testování genů antibiotické rezistence	47
Tabulka 7 Primery použité pro detekci genů virulence	49
Tabulka 8 Výsledky identifikace bakterií sekvenací genů pro 16S rRNA	52
Tabulka 9 Hodnocení antibiotické rezistence u kmenů <i>Bacillus cereus</i>	62
Tabulka 10 Hodnocení antibiotické rezistence u kmenů <i>Bacillus pumilus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>Cytobacillus horneckiae</i> a <i>Fictibacillus phosphorivorans</i>	63
Tabulka 11 Hodnocení antibiotické rezistence u kmenů rodů <i>Lysinibacillus</i> , <i>Priestia</i> a <i>Psychrobacillus</i>	64
Tabulka 12 Hodnocení antibiotické rezistence u kmenů rodu <i>Paenibacillus</i>	65
Tabulka 13 Hodnocení přítomnosti genů rezistence vůči betalaktamovým antibiotikům.....	70
Tabulka 14 Hodnocení přítomnosti genů rezistence vůči makrolidovým antibiotikům.....	71
Tabulka 15 Hodnocení přítomnosti genů rezistence vůči fluorchinolonovým a linkosamidovým antibiotikům	71
Tabulka 16 Přítomnost genů virulence zodpovědných za alimentární intoxikace testovaných kmenů <i>B. cereus</i>	75
Tabulka 17 Přítomnost genů zodpovědných za hemolytickou aktivitu testovaných kmenů <i>B. cereus</i>	76
Tabulka 18 Hodnocení tvorby biofilmu u testovaných kmenů.....	80

