

Bakterie rodu *Asaia* a jejich výskyt v potravinách a nápojích

Kamila Lacinová

Bakalářská práce
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kamila Lacinová**
Osobní číslo: **T16495**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Bakterie rodu *Asaia* a jejich výskyt v potravinách a nápojích**

Zásady pro vypracování:

1. **Bakterie rodu *Asaia* – taxonomické zařazení.**
2. **Morfologické, fyziologické a biochemické vlastnosti bakterií *Asaia*.**
3. **Výskyt a význam bakterií *Asaia* v potravinách a nápojích.**
4. **Možnosti stanovení *Asaia* v potravinách a nápojích.**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] SENGUN, I.Y., KARABIYIKLI, S. Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22, 647-656. 2011.

[2] ŠÍSTKOVÁ, I., HORSÁKOVÁ, I., HANKOVÁ, M., ČÍŽKOVÁ, H. *Asaia* spp., acetic acid bacteria causing the spoilage of non-alcoholic beverages. *Kvasný průmysl*, 65, 1-5. 2019.

[3] GÖRNER, Fridrich a L'ubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiologie požívatin*. Bratislava: Malé centrum, 2004.

[4] *Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect, SciFinder Scholar, Medline aj.*

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2019

Termín odevzdání bakalářské práce:

15. května 2019

Ve Zlíně dne 2. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Jiří Miček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:

Obor:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou 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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou 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);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské 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.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ 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, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce je představit bakterie rodu *Asaia*, jejich vlastnosti, výskyt a význam v potravinářském průmyslu.

První část práce se zaměřuje na obecnou charakteristiku bakterií octového kvašení, druhá část se již zabývá samotnou bakterií *Asaia* a jejím taxonomickým zařazením, poté se práce zaměřuje na popis morfologických, fyziologických a biochemických vlastností. Další kapitola popisuje výskyt a význam této bakterie, pozornost je věnována především kontaminaci ochucených nealkoholických nápojů. Poslední kapitola bakalářské práce se věnuje možnostem jejich stanovení v potravinách a nápojích.

Klíčová slova:

Asaia sp., bakterie octového kvašení, kontaminace nealkoholických nápojů

ABSTRACT

Abstrakt ve světovém jazyce

The aim of this bachelor thesis is to introduce bacteria of genus *Asaia*, their properties, occurrence and importance in food industry.

The first part focuses on the general characteristics of acetic bacteria, the second part deals with the *Asaia* bacterium itself and its taxonomic classification, then the work focuses on the description of morphological, physiological and biochemical properties. The next chapter describes the occurrence and importance of this bacterium, attention is paid to the contamination of flavored non-alcoholic drinks. The last chapter of the thesis deals with the possibilities of their determination in food and beverages.

Keywords:

Asaia sp., acetic acid bacteria, contamination of non-alcoholic beverages

Tímto bych ráda poděkovala doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a poskytnutí cenných rad při zpracování této bakalářské práce.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ OCTOVÉHO KVAŠENÍ.....	11
2 TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ BAKTERIE RODU <i>ASAIA</i>	13
3 MORFOLOGICKÉ, FYZIOLOGICKÉ A BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI BAKTERIE <i>ASAIA</i>	17
4 VÝSKYT A VÝZNAM BAKTERIÍ <i>ASAIA</i>	20
4.1 KONTAMINACE OCHUCENÝCH NEALKOHOLICKÝCH NÁPOJŮ	20
4.2 VÝSKYT <i>ASAIA</i> NA HROZNECH A VE VÍNĚ	24
4.3 PATOGENITA	25
5 MOŽNOSTI STANOVENÍ <i>ASAIA</i> V POTRAVINÁCH A NÁPOJÍCH.....	26
5.1 IZOLACE A KULTIVACE	26
5.2 MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY.....	27
ZÁVĚR	28
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	29
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	36
SEZNAM OBRÁZKŮ	37
SEZNAM TABULEK.....	38

ÚVOD

Bakterie rodu *Asaia* jsou poměrně nově objevenými mikroorganismy, které se řadí mezi bakterie octového kvašení. Oproti typickým představitelům se liší tím, že neoxidují etanol na kyselinu octovou, naopak jsou v její přítomnosti inhibovány již při koncentraci 0,35%.

V současné době se do tohoto rodu řadí osm druhů a jejich přirozeným výskytem jsou tropické rostliny pocházející z oblastí Thajska, Indonésie či Japonska. Jsou také případy, kdy byla *Asaia* detekovaná v reprodukčním systému a trávicím traktu komárů.

Co se týče potravin, je tato bakterie stále častěji izolována z nealkoholických ochucených nápojů, kde vytváří různé sensorické defekty. Vzhledem k silným adhezním vlastnostem, jejich schopnosti tvořit biofilm na materiálech používaných v potravinářském průmyslu a rezistenci vůči konzervačním látkám, se stávají nebezpečím pro stabilitu takových výrobků. Předpokládá se, že zdrojem kontaminace jsou ovocné šťávy používané k výrobě nealkoholických nápojů.

Přestože bakterie *Asaia* nejsou považovány za patogenní mikroorganismy, byly izolovány z klinického materiálu. Nicméně se vždy jednalo o pacienty se sníženou funkcí imunitního systému.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ OCTOVÉHO KVAŠENÍ

Bakterie octového kvašení jsou zařazeny do čeledi *Acetobacteraceae*, řádu *Rhodospirillales*, třídy *Alphaproteobacteria*. Původně byly octové bakterie rozděleny do dvou rodů, a to *Acetobacter* a *Gluconobacter* na základě morfologických, fyziologických a biochemických vlastností. (Sengun a Karabiyikli, 2011)

Dnes tato stále se rozšiřující skupina mikroorganismů zahrnuje celkově 19 rodů: *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Amevamea*, *Asaia*, *Bombella*, *Commensalibacter*, *Endobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Granulibacter*, *Komagataeibacter*, *Kozakia*, *Neoasaia*, *Neokomagatea*, *Nguyenibacter*, *Saccharibacter*, *Swaminathania*, *Swingsia* a *Tanticharoenia*. (Gomes et al., 2018)

Jedná se o gramnegativní nesporelující mikroorganismy elipsoidního až tyčinkovitého tvaru, které se vyskytují samostatně, v párech nebo řetězcích. Bakterie octového kvašení jsou obligátně aerobní mikroorganismy a mají striktně respiratorní typ metabolismu, kde je kyslík konečným akceptorem elektronů. Pohyb zajišťují peritrichální nebo polární bičíky, nebo jsou nepohyblivé, jsou kataláza pozitivní a oxidáza negativní. Jedná se o mezofilní mikroorganismy, jejichž optimální teplota pro růst se pohybuje mezi 25-30°C, optimální pH je 5,0-6,5, snášejí však i nižší hodnoty pH. (Sedláček, 2006; Taban a Saichana, 2017)

Mají schopnost oxidovat různé cukry, alkoholy a cukerné alkoholy na organické kyseliny. Obecným znakem většiny bakterií octového kvašení je schopnost oxidovat etanol na kyselinu octovou jako produkt oxidativní fermentace, která může být dále oxidována na oxid uhličitý a vodu rody *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* a *Acidomonas*. Oxidace etanolu je katalyzována dvěma membránově vázanými enzymy lokalizovanými na vnější straně cytoplazmatické membrány, a to alkoholdehydrogenázou (ADH) a aldehyddehydrogenázou (ALDH). Komplex ADH oxiduje etanol na acetaldehyd, ALDH potom katalyzuje oxidaci acetaldehydu na kyselinu octovou. (Taban a Saichana, 2017)

Bakterie octového kvašení jsou široce rozšířeny v přírodě, mohou být izolovány z různých druhů ovoce, rostlin, fermentovaných potravin nebo se mohou vyskytovat v symbiotickém vztahu s různými druhy hmyzu. Poměrně nedávno byly také některé rody izolovány z klinického materiálu a mohou být považovány za oportunní lidské patogeny. Hlavním produktem fermentace etanolu je kyselina octová, čehož se využívá v potravinářském průmyslu pro výrobu octa, dále jsou klíčové při výrobě fermentovaného čaje kombucha, kefiru

nebo při zpracování kakaových bobů. Využívají se také pro průmyslovou výrobu kyseliny askorbové, kyseliny glukonové nebo bakteriální celulózy, která má na rozdíl od rostlinné celulózy schopnost zadržovat více vody a je velmi pružná. Navzdory svému užitečnému využití mohou být i nežádoucími kontaminanty především vína, piva, ciderů, nealkoholických nápojů nebo ovoce a z ovoce vyráběných produktů. (Sedláček, 2006; Alauzet et al., 2010; Chouaia et al., 2010; Valera et al., 2017; Gomes et al., 2018)

2 TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ BAKTERIE RODU *ASAIA*

Bakterie rodu *Asaia* mají gramnegativní typ buněčné stěny a řadí se do kmene *Proteobacteria*, třídy *Alphaproteobacteria*, řádu *Rhodospirillales*, čeledi *Acetobacteraceae*. (Sedláček, 2006)

Rod je pojmenovaný po japonském bakteriologovi Toshinobu Asai zabývajícím se systematikou bakterií octového kvašení. Momentálně je známo osm druhů z rodu *Asaia* – *Asaia bogorensis* (objeveno r. 2000), *Asaia siamensis* (2001), *Asaia krungthepensis* (2004), *Asaia lannensis* (2008), *Asaia spathodeae* (2010), *Asaia astilbis*, *Asaia platycodi* a *Asaia prunellae* (2010). V tabulce číslo 1 je vidět taxonomické zařazení. (Yamada., 2016; Kreigel et al., 2011; LPSN, © 1997-2018)

Tab. č. 1: Taxonomické zařazení bakterií rodu *Asaia* (zpracováno podle Sedláček, 2006; LPSN, © 1997-2018)

Doména	<i>Bacteria</i>
Kmen	<i>Proteobacteria</i>
Třída	<i>Alphaproteobacteria</i>
Řád	<i>Rhodospirillales</i>
Čeď	<i>Acetobacteraceae</i>
Rod	<i>Asaia</i>
Druh	<i>Asaia astilbis</i> , <i>Asaia bogorensis</i> , <i>Asaia krungthepensis</i> , <i>Asaia lannensis</i> , <i>Asaia platycodi</i> , <i>Asaia siamensis</i> , <i>Asaia spathodeae</i> , <i>Asaia prunellae</i>

Prvním z prozkoumaných zástupců tohoto rodu je druh *Asaia bogorensis* (Yamada et al., 2000). Z květů orchideje (*Bauhinia purpureae*), olověnce ouškatého (*Plumbago auriculata*) a fermentované lepkavé rýže bylo v Indonésii izolováno osm gramnegativních aerobních tyčinek pohybujících se díky peritrichálním bičíkům. Měly neobvyklé charakteristiky ve srovnání s ostatními známými bakteriemi octového kvašení, nevykazovaly totiž žádnou nebo jen velmi malou produkci kyseliny octové z etanolu a jejich růst byl kompletně inhibován v přítomnosti 0,35% kyseliny octové. Nicméně izoláty rostly na médiu o pH 3 upra-

veném kyselinou chlorovodíkovou a oxidovaly acetát a laktát na oxid uhličitý a vodu. Na základě sekvencování 16S rRNA byla prokázána fylogenetická příbuznost s bakteriemi octového kvašení. (Yamada et al., 2000)

Osm získaných izolátů bylo označeno čísly 57 (= NRIC 0314), 64 (= NRIC 0315), 78 (= NRIC 0316), 86 (= NRIC 0317), 87 (= NRIC 0318), 90 (= NRIC 0319), 168 (= NRIC 0320) a 71^T (= NRIC 0311^T = JCM 10569^T), který byl zvolen jako typový kmen. Jako referenční kmeny byly zvoleny *Acetobacter aceti* IFO 14818^T, *Gluconobacter oxydans* IFO 14819^T, *Gluconobacter cerinus* NRIC 0229^T (= IFO 3267^T) a *Gluconacetobacter liquefaciens* IFO 12388^T. (Yamada et al., 2000)

Obsah GC bází v DNA se pohyboval v rozmezí 59,3-61,0%. Úroveň DNA příbuznosti mezi izoláty se pohybovala od 64 do 100%, na druhou stranu stupeň příbuznosti k referenčním kmenům byl velmi nízký, jednalo se o 5 až 10%, což naznačovalo, že všechny izoláty tvoří samostatný rod. (Yamada et al., 2000)

Izoláty 71^T, 86, 87 a 90 byly poté podrobeny fylogenetické analýze založené na genomu sekvencování 16S rRNA. (Yamada et al., 2000)

Aby se izolované kmeny mohly začlenit do jednoho rodu, je zapotřebí 70% a větší shoda v DNA-DNA příbuznosti a 97% shoda 16S rRNA sekvence. Jak je patrné z tabulky č. 2, příbuznost mezi izoláty 86 a 168, a izoláty 57 a 87 byla pouze 64%. Nicméně fylogenetická analýza prokázala shodu mezi izoláty 71^T, 86, 87 a 90 na více než 99,9%. Podobnost mezi typovým izolátem 71^T a každým z typových referenčních kmenů byla vypočítána na 96-96,7%. (Yamada et al., 2000)

Vznikl tak nový rod spadající do čeledi *Acetobacteraceae*, izolát 71^T (= NRIC 0311^T = JCM 10569^T) dostal rodové jméno na počest Dr. Toshinobu Asai, který působil na univerzitě v Tokiu a druhové jméno po městě Bogor, kde byla bakterie izolována. (Yamada et al., 2000)

Tab. č. 2: DNA příbuznost mezi izoláty rodu *Asaia* a referenčními kmeny bakterií octového kvašení (zpracováno podle Yamada et al., 2000)

Kmen	Obsah DNA bázi GC (%)	Příbuznost DNA (%)					
		71 ^T	86	87	IFO 14818 ^T	IFO 14819 ^T	IFO 12388 ^T
Izolát 57	61,0	70	97	64	12	18	17
Izolát 64	60,5	76	100	80	11	22	16
Izolát 71 ^T	60,2	100	75	91	11	22	17
Izolát 78	59,3	86	69	95	NT	26	NT
Izolát 86	59,7	68	100	69	8	20	12
Izolát 87	59,3	87	77	100	17	24	16
Izolát 90	59,5	86	69	100	19	25	16
Izolát 168	59,4	93	64	100	NT	NT	NT
<i>Acetobacter aceti</i> IFO 14818 ^T	58,3	5	5	5	100	24	19
<i>Gluconobacter oxydans</i> IFO 14819 ^T	61,7	10	9	7	11	100	22
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i> IFO 12388 ^T	64,9	9	8	6	17	23	100

Studie z roku 2001 (Katsura et al.) představuje další nový druh, který byl začleněný do rodu *Asaia* – *As. siamensis*, jejíž druhové jméno je odvozeno od slova Siam, tedy historickým názvem pro Thajsko, odkud pocházely zdroje izolátů. Pět bakteriálních kmenů bylo získáno z tropických rostlin plchoplodu podvinutého (*Calostropis gigantea*), křínu asijského (*Crinum asiaticum*) a keře ixory (*Ixora chinensis*). Obsah GC bázi v DNA se pohyboval

v rozmezí 58,6-59,7 %, je tedy o něco nižší než u *Asaia bogorensis*. Typovým kmenem byl zvolen izolát s označením S60-1^T (= NRIC 0323^T = JCM 10715^T = IFO 16457^T). (Katsura et al., 2001)

Třetím popsáným zástupcem byla *Asaia krungthepensis*. Izolované buňky pocházely z květů helikónie (*Heliconia* sp.) shromážděných v Thajsku. Molekulárně genetické analýzy prokázaly příbuznost k rodu *Asaia*, ale odlišnost od *As. bogorensis* a *As. siamensis*. Typový izolovaný kmen byl označen AA08^T (= BCC 12978^T = TISTR 1524^T = NRIC 0535^T), druhové jméno bylo odvozeno od thajského označení pro Bangkok – Krungthep. (Yukphan et al., 2004)

Dalším objeveným zástupcem byla *Asaia lannensis*. Typový kmen AB92^T (= BCC 15733^T = NBRC 102526^T) byl izolován v Chiang Mai v Thajsku z pavoučí lilie (*Lycoris radiata*). Druhové jméno je odvozené od zeměpisného původu, konkrétně od historického pojmenování pro region Lanna. (Malimas et al., 2008)

V roce 2010 byla popsána již čtvrtá *Asaia*, a to *Asaia spathodea*. Typovým kmenem byl zvolen izolát s označením GB23-2^T (= BCC 36458^T = NBRC 105894^T = PCU 307^T), pocházející z květů spatodea zvonkovitá (*Spathodea campanulata*), z čehož je odvozen i druhový název. (Kommanee et al., 2010)

V témže roce byly představeny další tři druhy – *Asaia astilbis* (T-6133^T = JCM 15831^T = DSM 23030^T), *Asaia platycodi* (T-683^T = JCM 25414^T = DSM 23029^T) a *Asaia prunellae* (T-153^T = JCM 25354^T = DSM 23028^T). Zatím byly všechny druhy rodu *Asaia* izolovány v tropických oblastech Thajska a Indonésie, nicméně tentokrát pocházely získané izoláty ze severních a středních oblastí Japonska, kde převládá mírné klima, z toho je možné usuzovat, že *Asaia* není limitována výskytem pouze na tropické oblasti, ale může být rozšířena kosmopolitně. Zdrojem typových izolátů byly rostliny čechrava (*Astilbe thunbergii* var. *congesta*), platykodon velkokvětý (*Platycodon grandiflorum*) a černohlávek obecný (*Prunella vulgaris*). (Suzuki et al., 2010)

3 MORFOLOGICKÉ, FYZIOLOGICKÉ A BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI BAKTERIÍ *ASAIA*

Rod *Asaia* má gramnegativní typ buněčné stěny, jedná se o buňky tyčinkovitého tvaru dosahující průměrné velikosti 0,4-1,0 μm na šířku a 0,8-2,5 μm na délku, *Asaia siamensis* může mít délku až 4,5 μm . Tyto bakterie netvoří spory. Jsou pohyblivé díky peritrichálním bičíkům nebo nepohyblivé, a na agarové plotně obsahující glukózu, pepton a kvasničný extrakt tvoří světle hnědé až růžové lesklé a hladké kolonie okrouhlého tvaru s vypouklým profilem o průměru 1-3 mm. Optimální pH pro růst se pohybuje okolo 5,5 a optimální teplota je 22-30°C, kmeny izolované v tropických oblastech jako je Thajsko nebo Indonésie vykazují růst i při 37°C. (Katsura et al., 2001; Kregiel et al., 2011; Yamada et al., 2016)



Obr. 1: Ukázka kolonie *Asaia* sp. na médiu s glukózou (převzato z Kregiel et al., 2011)

Jsou to obligátně aerobní mikroorganismy se striktně respiratorním metabolismem, pozitivní na katalázu a negativní na oxidázu. Oproti ostatním bakteriím octového kvašení se liší tím, že nevykazují produkci kyseliny octové z etanolu vůbec nebo jen velmi málo. Skutečnost, že nedokáží oxidovat etanol na kyselinu octovou je dána tím, že postrádají membránově vázaný enzym alkoholdehydrogenázu. Růst bakterií je inhibován přítomností 0,35% kyseliny octové, nerostou v přítomnosti metanolu, naopak dobře se jim daří v přítomnosti 30% D-glukózy. Se sníženou aktivitou oxidují acetát a laktát za vzniku oxidu uhličitého a vody. (Sedláček, 2006; Ano et al., 2008; Kommanee et al., 2010; Yamada et al., 2016)

Bakterie rodu *Asaia* jsou schopny tvořit kyselinu z různých cukrů a cukerných alkoholů, například z D-glukózy, D-manózy, D-galaktózy, D-fruktózy, L-sorbózy, D-xylózy, ribitolu, *meso*-erythritolu, melibiózy a D-mannitolu, ale žádný druh netvoří kyselinu z laktózy. Byla prokázána i produkce kyseliny z L-rhamnózy kromě *Asaia spathodea*, *As. astilbis* a

As. prunellae. Na rozdíl od ostatních druhů rodu *Asaia* dokáže *Asaia bogorensis* a *As. krungthepensis* produkovat kyselinu i z dulcitolu. Z glukózy produkují 2-keto-D-glukonát a 5-keto-D-glukonát, ne však 2,5-diketo-D-glukonát. Obecně se sníženou aktivitou tvoří dihydroxyaceton z glycerolu a dokáží asimilovat síran amonný na glukózovém médiu bez vitaminů a využít ho tak k růstu. (Yamada et al., 2000; Katsura et al., 2001; Yukphan et al., 2004; Kommanee et al., 2010; Suzuki et al., 2010; Malimas et al., 2008; Yamada, 2016)

Některé rody bakterií octového kvašení jsou schopny fixovat vzdušný dusík, patří mezi ně *Gluconacetobacter*, *Acetobacter* a *Swaminathania*, které k tomuto účelu využívají nitrogenázový enzymový komplex. Tato vlastnost byla prokázána i u bakterie *Asaia bogorensis* a *As. siamensis*, u kterých byla průkazem schopnosti fixace dusíku přítomnost genové sekvence *nifH*. (Samaddar et al., 2011)

Tyto bakterie jsou relativně rezistentní téměř ke všem antibiotikům, které jsou rutinně testovány vůči gramnegativním tyčinkám, jako je například kolistin, aztreonam, piperacillin-tazobaktam, penicilin, ceftazidim a cefotaxim. Minimální inhibiční koncentrace kolistinu u *Asaia bogorensis* izolované z klinického materiálu byla více než 1000mg/l, aztreonamu více než 256mg/l. Naopak citlivé jsou například vůči netilmicinu, gentamicinu a doxycyklinu. Citlivost závisí na izolovaném druhu a také kmeni. Minimální inhibiční koncentrace vybraných antibiotik vůči *Asaia bogorensis* izolované z klinického materiálu jsou shrnuty v tabulce číslo 3. (Tuuminen et al., 2006; Juretschko et al., 2010)

Tab. č. 3: Rezistence vybraných antibiotik vůči *Asaia bogorensis* izolované z klinického materiálu (zpracováno podle Tuuminen et al., 2006)

ATB	MIC (mg/l)
Aztreonam	>256
Ceftazidim	64
Colistin	>1 024
Doxycyklin	1,5
Gentamicin	3
Netilmicin	1,5
Penicilin	>32
Piperacillin-tazobactam	>256

Bakterie *Asaia* sp., podobně jako jiné bakterie octového kvašení, vykazují silné adhezní schopnosti a tvorbu biofilmu, a tím schopnost kolonizovat plochy různých materiálů jako je nerezová ocel, sklo, polyetylen a polystyren. Jsou velmi odolné vůči obvykle používa-

ným koncentracím sanitálních prostředků. Tyto bakterie jsou schopny růst v přítomnosti kyseliny sorbové a kyseliny benzoové až do koncentrace 7mmol/l. (Horsáková et al., 2009; Sedláčková et al., 2011)

Hlavním ubichinonem je Q-10 a obsah DNA bází GC se pohybuje v rozmezí 58,6-61,0%. (Yamada, 2016)

V tabulce číslo 4 jsou porovnány vybrané vlastnosti rodů z čeledi *Acetobacteraceae*.

Tab. č. 4: Vlastnosti vybraných rodů z čeledi *Acetobacteraceae* (zpracováno podle Yamada et al., 2000; Kregiel et al., 2011)

Charakteristika	Rod				
	<i>Asaia</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>Acidomonas</i>	<i>Gluconacetobacter</i>
Oxidace acetátu na CO ₂ a H ₂ O	w+	+	-	+	+/-
Oxidace laktátu na CO ₂ a H ₂ O	w+	+	-	-	+/-
Produkce kyseliny octové z etanolu	-/w+	+	+	+	+
Produkce dihydroxyacetonu z glycerolu	-/w+	-/w+	+	+	+/-
Produkce kyseliny z dulcitolu	+/-	-	-	-	-
Růst v přítomnosti 0,35% kyseliny octové	-	+	+	+	+
Asimilace síranu amonného na glukózovém médiu	+	w+	-	-	w+
Obsah DNA bází GC (%)	59-61	53-63	54-63	63-66	55-66
Hlavní ubichinon	Q10	Q9	Q10	Q10	Q10

Vysvětlivky: (+) – pozitivní výsledek; (-) – negativní výsledek; (w+) – slabá pozitivní reakce; (+/-) – pozitivní či negativní výsledek v závislosti na kmenu

4 VÝSKYT A VÝZNAM BAKTERIÍ *ASAIA*

Přirozeným místem výskytu bakterií rodu *Asaia* jsou především tropické rostliny jako je orchidej (*Bauhinia purpurea*), olověnc ovčák (*Plumbago auriculata*), helikónie (*Heliconia* sp.), pavoučí lilie (*Lycoris radiata*), platykodon velkokvětý (*Platycodon grandiflorum*), černohlávek obecný (*Prunella vulgaris*) a další rostliny z oblastí Thajska, Indonésie či Japonska. Mohou se nacházet v potravinách jako je fermentovaná lepkavá rýže, hroznové víno nebo jako kontaminant nealkoholických nápojů způsobující nežádoucí sensorické změny, zdrojem takové kontaminace je pak ovocná složka sloužící k ochucení nápoje. Následně byly *Asaia bogorensis* a *As. lannensis* izolovány i z klinického materiálu. Bakterie *Asaia* se také vyskytuje v symbiotickém vztahu s hmyzími přenašeči, konkrétně byla detekována v různých druzích komárů, kteří jsou vektorem při přenosu malárie, jako je *Anopheles stephensi* a *Anopheles gambiae*, nebo v *Aedes aegypti* a *Aedes albopictus*, kteří jsou přenašeči horečky dengue, žluté zimnice či viru zika. *Asaia* byla nalezena u dospělých jedinců komárů ve střevech, slinných žlázách a pohlavních orgánech. (Yamada et al., 2000; Katsura et al., 2001; Yukphan et al., 2004; Tuuminen et al., 2006; Kommanee et al., 2010; Malimas et al., 2008; Chouaia et al., 2010)

4.1 Kontaminace ochucených nealkoholických nápojů

Nealkoholické nápoje jsou všechny nápoje, které obsahují méně než 0,5 obj. % etanolu, základními surovinami pro výrobu je především voda z vodovodní sítě nebo minerální voda, přírodní sladidla, kterými jsou typicky sacharóza nebo glukóza, používají se ale i náhradní sladidla. Dále ovocná nebo zeleninová složka ve formě šťávy či koncentrátu. Nápoj může být také sycený oxidem uhličitým (3-8 g/l) nebo nesycený, dále se za účelem prodloužení údržnosti a zlepšení sensorických vlastností používají různá aditiva, jako jsou konzervační látky, antioxidanty, kyseliny a regulátory kyselosti nebo barviva, která jsou vždy uvedena na obalu nápoje. Konzervačními látkami jsou nejčastěji kyselina benzoová, kyselina sorbová nebo dimetyldikarbonát (tzv. velcorin). Podle platným předpisů je možné použít maximálně 250 mg/l těchto konzervačních látek a jejich použití je nezbytné, pokud není údržnost zajištěna například pasterací nebo oxidem uhličitým. (Kadlec et al., 2002; Kregiel, 2015; Čížková, 2016)

Mikrobiální kontaminace nealkoholických nápojů většinou vzniká během samotného procesu výroby. Stabilita balených nápojů je závislá na stavu výrobního zařízení, na typu oba-

lových materiálů, na mikrobiální kvalitě a koncentraci výše uvedených složek v nápojích, a samozřejmě na celkovém hygienickém standardu závodu. (Kregiel et al, 2014)

Zkažení výrobku je výsledkem metabolických procesů mikroorganismů, kterými se nápoje stávají nevhodnými pro lidskou konzumaci nebo nepřijatelnými pro zákazníka. Kontaminace může způsobit změnu barvy či vůně, turbiditu, flokulaci, nadouvání obalů nebo jiné defekty. Změny se projeví, když je mikrobiální kontaminace vyšší než 10^5 CFU/ml. Nealkoholické nápoje jsou charakterizovány vysokou vodní aktivitou a ochucující složky, jako jsou přírodní aroma, šťávy a koncentráty z ovoce používané k ochucení nápojů, jsou dobrým zdrojem sacharidů, vitaminů a minerálních látek pro mikroorganismy. Ani nízké pH (2,5-4), konzervační látky nebo sycení oxidem uhličitým nemusí zabránit mikrobiálnímu růstu, nicméně díky těmto podmínkám je diverzita mikroorganismů značně omezena a vyskytují se pouze takové mikroby, které jsou schopny překonat tyto bariéry. Dalším ovlivňujícím faktorem jsou obalové materiály, které se liší svou permeabilitou pro kyslík, jeho obsah se v plastových obalech s časem zvyšuje, kdežto skleněné láhve jsou pro vzduch nepropustné, což zamezuje růstu aerobních mikroorganismů. (Kregiel et al, 2014 a 2015; Azeredo et al., 2016)

Nejvýznamnějšími mikroorganismy kontaminující nealkoholické nápoje bývají kvasinky, zvláště díky své toleranci vůči vysokým koncentracím oxidu uhličitého a nízkému pH. Mezi kontaminující rody patří například *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Brettanomyces*, *Rhodotorula* a *Pichia*. Kvasinky produkují etanol jako konečný produkt fermentace, díky čemuž může dojít k překročení legislativního limitu pro nealkoholické nápoje, dále mohou způsobovat nadouvání obalů, zakalení, tvorbu povrchové blanky nebo kvasinkový odér. (Kregiel et al, 2014; Azeredo et al., 2016)

Plísně jako jsou rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium* či *Cladosporium* vytváří v nápojích bílé nadýchané shluky a způsobují diskoloraci. Některé rody mohou také produkovat mykotoxiny. (Kregiel et al, 2014; Azeredo et al., 2016)

Co se týče bakterií, mohou se vyskytovat určité rody bakterií mléčného kvašení (BMK) patřící do rodů *Lactobacillus* a *Leuconostoc*. BMK byly izolovány z ovoce, ovocných džusů a obalových materiálů, jsou také rezistentní vůči kyselině benzoové a sorbové. Běžnými kontaminujícími druhy této skupiny mikroorganismů jsou *Lactobacillus paracaei*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. buchneri* a *Leuconostoc mesenteroides*. V závislosti na druhu a růstových podmínkách může katabolismus cukrů vést k tvorbě kyseliny mléčné, etanolu, ace-

tátu, sukcinátu nebo formiátu, takové metabolity jsou zodpovědné za ztrátu nasycení a trpkost nápoje. Některé kmeny produkují diacetyl, který dává nápoji nežádoucí máslovou chuť a aroma. *Leuconostoc mesenteroides* je schopný vytvářet extracelulární polymery z fruktózy nebo glukózy zodpovědné za slizovitou konzistenci či tvorbu biofilmu na technologickém zařízení. (Kregiel et al, 2014; Azeredo et al., 2016)

Bakterie octového kvašení se vyskytují v nealkoholických nápojích méně často než BMK, jsou to striktně aerobní mikroorganismy a mohou představovat závažný problém u nápojů balených do permeabilních obalů pro kyslík. Jejich přítomnost může způsobovat změny chutě, nadouvání obalů, turbiditu nebo tvorbu sedimentu a kyselý odér. Mnoho rodů této skupiny má schopnost tvořit biofilm, který může výrazně zkomplikovat sanitaci provozních povrchů. Většinou bývají izolovány rody *Acetobacter*, *Gluconobacter* a *Gluconacetobacter*, nicméně poměrně nedávno bylo zjištěno, že za zhoršením kvality nápojových výrobků mohou být i bakterie *Asaia*. (Kregiel et al, 2014; Azeredo et al., 2016)

Prvním zaznamenaným případem kontaminace ochucených nealkoholických nápojů způsobené bakterií *Asaia* se datuje do roku 2002, když bylo izolováno několik gramnegativních kmenů z ovocných balených vod v průběhu produkce ve Spojených státech amerických. Zkažený produkt byl turbidní a měl kyselý odér. Pro identifikaci byla použita metoda založená na sekvencování 16S rRNA a metoda PCR. Předpokládalo se, že zdrojem kontaminace byla přírodní ovocná šťáva použitá k ochucení nápoje. (Moore et al., 2002)

V Polsku bylo podrobena analýze několik vzorků ovocné minerální vody s vizuálním defektem a přírodní jahodový koncentrát, ze kterého byly balené nápoje vyrobeny. Ochucené vody byly zakalené, pH se pohybovalo mezi 3,3 až 3,6. Inkubace demonstrovala přítomnost smíšených kultur sestávajících z několika morfotypů, z nichž byly purifikovány jednotlivé kolonie. Jeden z morfotypů byl dominantní a velmi charakteristický, bakterie rostly nejlépe za teploty 25°C na agaru obsahujícím CaCO₃, pepton, kvasničný extrakt a D-glukózu a vytvořily světle růžové, hladké a malé kolonie se zónou vyčeření po 72 hodinové inkubaci. Díky molekulárním metodám bylo zjištěno, že se jedná o *Asaia lannensis*. (Kregiel et al., 2014)

V nedávné publikaci byla studována buněčná konsorcia vytvořená kvasinkami a bakteriemi *Asaia* v ochucených nealkoholických nápojích s vizuálním defektem ve formě vloček. Mechanismus jejich koexistence je stále neprobádanou oblastí, nicméně přítomnost izolovaných kvasinek *Wickerhamomyces anomalus*, *Dekkera bruxellensis* a *Rhodotorula mucila-*

ginosa podpořila zesílit celkovou strukturu vloček způsobené bakterií *Asaia* a bylo obtížné je od sebe oddělit. (Kregiel et al., 2018)

Tyto bakterie mohou díky svým povrchovým vlastnostem kolonizovat různé povrchy obecně používané při výrobě v potravinářském průmyslu, jako je nerezová ocel, sklo, polyethylen a polystyren. Kolem svých buněk tvoří polysacharidovou kapsuli, buňky se pak shromažďují do aglomerátů tvořících velmi odolný a těžko odstranitelný biofilm, který přilne na výrobní zařízení nebo obaly, což přináší závažné hygienické problémy a ekonomické ztráty v důsledku znehodnocení nápoje. (Horsáková et al., 2009; Sedláčková et al., 2011)

Tato vlastnost byla potvrzena i v jiných studiích. Bylo zjištěno, že přilnavost na plastové materiály je mnohem vyšší ve srovnání se skleněným materiálem. Použití skla jako obalového materiálu, které má větší povrchové napětí, může výrazně snížit adhezní vlastnosti *Asaia* sp. a přispět tak k lepší mikrobiologické stabilitě ochucených nealkoholických nápojů. (Kregiel et al., 2013 a 2014)

Asaia je také rezistentní vůči běžně používaným konzervačním látkám a sanitačním procedurám, bakterie jsou schopny růst v přítomnosti kyseliny benzoové, sorbové a dimetyldikarbonátu (DMDC) v koncentracích 1,5 mmol/l a vyšších. Kyselina benzoová má o něco vyšší inhibiční účinek než kyselina sorbová, DMDC je nejméně efektivní. Jejich eliminace bude tedy vyžadovat silnější prostředky, jako je například horký hydroxid sodný a mechanické čištění. (Horsáková et al., 2009)

Vzhledem k rezistenci bakterie *Asaia* k používaným konzervačním látkám se nové studie zaměřují na využití přírodních bioaktivních látek, jako jsou rostlinné polyfenoly a organické kyseliny, které by kontaminaci mohly zabránit. Bylo zjištěno, že přídatek šťávy z americké brusinky (*Vaccinium macrocarpon*), černého rybízu (*Ribes nigrum* L.) a brusnice borůvky (*Vaccinium myrtillus*), které jsou přirozeně bohaté na polyfenolické sloučeniny, mohou značně snížit růst těchto bakterií a jejich přilnavost na povrchy. Výhodou bobulovitých plodů je, že jsou prokazatelně prospěšné pro lidské zdraví, což z nich činí hodnotný přídatek do nealkoholických nápojů i zajímavou alternativu zajišťující mikrobiální stabilitu konečného výrobku. (Antolak et al., 2015 a 2016; Šístková et al., 2019)

V další studii byly prozkoumány antibakteriální a antiadhezivní účinky etanolových extraktů ze skořice (*Cinnamomum zeylanicum*), lékořice (*Glycyrrhiza radix*), kopřivy (*Urtica dioica*), zeleného čaje (*Camellia sinensis*) a černého bezu (*Sambucus nigra*), které jsou

bohaté na flavonoidy a fenolické sloučeniny jako jsou kyselina gallová, chinová, chlorogenová, kávová, kumarová, ferulová a jiné. Všechny extrakty měly inhibiční účinek na testované kmeny, bylo však prokázáno, že médium obsahující 10% extraktu z černého bezu (*Sambucus nigra*) bylo nejúčinnější. (Antolak et al., 2017; Šístková et al., 2019)

Stejně tak byly prostudovány vlastnosti máty peprné (*Mentha piperita* L.), která je známá pro své antibakteriální účinky. Výsledky indikovaly bakteriostatický efekt extraktu proti testovaným kmenům *Asaia bogorensis* a *As. lannensis*, přítomnost 10% etanolového extraktu z máty omezila jejich adhezivní schopnosti. (Antolak et al., 2018)

4.2 Výskyt *Asaia* sp. na hroznech révy vinné

V roce 2014 byla provedena studie, jejímž cílem bylo prozkoumat diverzitu bakterií octového kvašení nacházejících se na hroznech révy vinné, které jsou hlavní surovinou pro výrobu vína, a jeho kvalita je závislá na přítomných mikroorganismech. (Mateo et al., 2014).

Nežádoucí mikroorganismy, které se podílejí na kažení vína, jsou většinou kvasinky spadající do rodu *Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia* nebo *Zygosaccharomyces*, z bakterií se může jednat o bakterie mléčného kvašení rodu *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Pediococcus*. Co se týče bakterií octového kvašení, byly původně s hroznou a vínem spojovány pouze rody *Acetobacter* a *Gluconobacter*, které způsobují typické octovatění vína, nicméně díky molekulárně založeným metodám sloužící k identifikaci mikroorganismů se zjišťuje, že mikroflóra hroznů může být mnohem rozmanitější. (Valera et al., 2017)

Ze tří vinogradů v jižní Austrálii byly sesbírány vzorky ze zdravých i nahnilých a poškozených hroznů bílých a červených odrůd. Identifikovány byly druhy *Gluconobacter frateurii*, *G. cerinus*, *G. albidus*, *G. oxydans*, *Acetobacter malorum* a méně typické *Ameyamaea chiangmaienis*, *Asaia lannensis* a *As. siamensis*. (Mateo et al., 2014) Již dříve byla *Asaia siamensis* detekována během malolaktického kvašení červeného vína Tempranillo ve Španělsku, nicméně jejich vliv na proces a na organoleptické vlastnosti vína není znám. (Ruiz et al., 2010)

4.3 Patogenita

Bakterie *Asaia* samy o sobě nepředstavují zdravotní riziko, nicméně některé kmeny mohou být oportunními patogeny v kombinaci s jiným onemocněním a oslabeným imunitním systémem a vést tak ke zhoršení zdravotního stavu. (Alauzet et al., 2010; Antolak a Kregiel., 2015)

Jeden z prvních zdokumentovaných případů bakteriémie způsobené rodem *Asaia* je popsán ve studii z roku 2006 (Tuuminen et al.). Pacientem byl mladý muž původem z Estonska, který byl přijat do Fakultní nemocnice v Helsinkách s bolestmi hlavy a horečkou, v minulosti prodělal chronickou enterokokovou artritidu. Konkrétní příčina onemocnění nebyla známa, jednalo se však o kombinaci snížené imunity a nitrožilního užívání drog. Pacientovi byly odebrány vzorky krve a jeho hodnota C-reaktivního proteinu (CRP), což je reaktant akutní fáze, kdy se rozvíjí zánět, byla velmi vysoká. Po dvoudenní inkubaci byly izolovány velmi rezistentní striktně aerobní gramnegativní tyčinky, které bylo těžké identifikovat klasickými metodami, až díky sekvencování 16S rRNA a porovnáním se sekvencemi v databázi bylo zjištěno, že se jedná o *Asaia bogorensis*. Bakterie byla velmi rezistentní vůči většině antibiotik rutinně testovaných pro gramnegativní bakterie, například minimální inhibiční koncentrace kolistinu byla více než 1000mg/l. Pacient byl hospitalizován po dobu 13 dní a léčen pomocí antibiotik tobramycinu a ceftriaxonu podávaných intravenózně. Zdroj bakteriémie nebyl jasný, předpokládalo se však, že bakterií byla kontaminována narkotika. (Tuuminen et al., 2006)

Dalším pacientem byla žena středního věku, která se nacházela v poslední fázi selhávání ledvin. Nákaza bakterií *Asaia bogorensis* u ní způsobily hypotenzi a tachykardii. V jiném případě byla *As. bogorensis* dekována u pacienta, kterým byl dvouletý chlapec, trpící cystickou fibrózou. (Tuuminen et al., 2006; Alauzet et al., 2010; Antolak a Kregiel., 2015)

V roce 2010 byla prokázána bakteriémie zapříčiněná druhem *Asaia lannensis* u dvou dětských pacientů. Obě děti byly léčeny s dilatační kardiomyopatií a čekaly na transplantaci srdce. Během nemocničního pobytu se u nich projevil podobné symptomy, jako zvýšená teplota, hypotenze a mírná leukopenie. (Juretschko et al., 2010)

5 MOŽNOSTI STANOVENÍ *ASAIA* V POTRAVINÁCH A NÁPOJÍCH

Základem k identifikaci bakterií *Asaia* je znalost morfologických, fyziologických a biochemických vlastností spolu s využitím molekulárních metod. Prakticky nemožné je identifikovat tyto bakterie komerčními biochemickými testy jako je například API20NE, Rapid NF nebo Vitek, jejich použití totiž vede k mylným interpretacím. Když Moore et al. ve své studii použil metodu API20NE pro izolované buňky z ochucených vod, výsledkem byla chybná identifikace jako *Pasturella* sp. Stanovení *Asaia* sp. v potravinách a nápojích není jednoduché, nejvhodnějšími a nejpřesnějšími metodami pro stanovení těchto bakterií je využití molekulárně biologických metod, konkrétně polymerázové řetězové reakce. Při identifikaci bakterií octového kvašení se uplatňuje také metoda MALDI TOF-MS, kdy se specifická hmotnostní spektra získaná během analýzy porovnají s referenčními v databázi, nicméně v současných studiích není zmínka o použití této metody k identifikaci bakterií *Asaia* izolovaných z potravin a nápojů. (Kregiel et al., 2011; Moore et al., 2002; Antolak a Kregiel., 2015; Andés-Barrao et al., 2017)

5.1 Izolace a kultivace

Pro izolaci a kultivaci bakterií *Asaia* se používají média obsahující jako zdroj energie a uhlíku glukózu nebo sacharózu, dalšími základními složkami jsou pepton a kvasničný extrakt, základní médium bývá obohaceno o uhličitan vápenatý a inkubuje se při teplotě 25-30°C po dobu 48-72 hodin. Velmi dobrý růst vykazují na půdě obsahující glukózu a síran amonný, dále na manitolovém nebo glutamátovém agaru, ale žádný druh neroste v přítomnosti metanolu. (Katsura et al., 2001; Sedláčková et al., 2011; Yukphan et al., 2004)

Kmeny izolované z klinického materiálu vykazovaly růst na krevním a čokoládovém agaru po 48 hodinové inkubaci při teplotě 30°C a 35°C. (Tuuminen et al., 2006)

Ve studii Yamada et al., která jako první představila bakterie rodu *Asaia*, bylo pro izolaci použito médium obsahující 2,0% sorbitolu, 0,5% peptonu, 0,3% kvasničného extraktu a 100 p.p.m. cykloheximidu, poté bylo médium upraveno pomocí kyseliny chlorovodíkové na pH 3,5. Izolovaný materiál byl inkubován a po mikrobiálním nárůstu byly mikroorganismy přeneseny na CaCO₃ agar obsahující 2,0% glukózy, 0,5% etanolu, 0,8% kvasničného extraktu, 0,7% uhličitanu vápenatého a 1,2% agaru. Médium nebylo obohaceno kyselinou octovou, čímž se lišilo od těch, které Yamada et al. použil ve svých předešlých studiích

k izolaci a kultivaci jiných rodů octových bakterií. (Yamada et al., 2000)

5.2 Molekulárně biologické metody

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je spolehlivou metodou při identifikaci bakterií *Asaia* izolovaných z potravin. Tato metoda je založena na replikaci nukleových kyselin a podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců z vybraných úseků dvouřetězcové DNA pomocí DNA-polymerázy, jež bývá izolovaná z termofilních mikroorganismů jako je například *Thermus aquaticus* (tzv. *Taq* DNA-polymeráza). (Šmarda et al., 2005)

Během PCR se opakovaně střídají tři kroky, a to denaturace, annealing a elongace. Během denaturace se DNA po dobu 20-30 sekund zahřívá při teplotě 94-98°C, po tomto zákroku dochází k uvolnění vodíkových můstků z dvouřetězcové DNA (dsDNA) a vznikají dvě jednořetězcové DNA (ssDNA). Při tzv. annealingu, který probíhá při teplotě 50-65°C, dojde k připojení primerů k templátové ssDNA, a tím dochází k ohraničení cílové sekvence, která bude amplifikována. Posledním krokem je elongace, tedy syntéza nového vlákna ve směru od 5' konce ke 3' konci komplementárně k původní molekule DNA prostřednictvím DNA-polymerázy. Výsledným produktem PCR jsou pak amplikony, tedy úseky DNA o definované délce a o velikosti většinou desítky až tisíce párů bází. K analýze produktů PCR poté slouží různé metody jako například hybridizace, ELISA, sekvenční analýza, ale nejvyužívanější je agarózová gelová elektroforéza. (Bursová et al., 2014; Šmarda et al., 2005)

Pro tuto metodu jsou zapotřebí specifické primery, které se komplementárně vážou k templátové DNA. V jedné z prvních studií zabývajících se kontaminací nápojů bakterií *Asaia* byly použity 16S rRNA primery 5'-AGG ATT AGA TAC CCT GGT AGT CCA-3' jako tzv. forward primer a 5'-ACT TAA CCC AAC ATC TCA CGA CAC-3' jako tzv. reverse primer. (Moore et al., 2002)

Kromě primerů je potřeba pro správný průběh PCR připravit reakční směs obsahující templátovou DNA jako matici pro tvorbu nového vlákna, pufr, vodu, hořčnaté ionty sloužící k aktivaci DNA-polymerázy, dNTPs, což jsou volné deoxynukleotidtrifosfáty, které jsou stavebními kameny pro syntézu nového vlákna DNA, a již zmíněnou DNA-polymerázu. (Bursová et al., 2014)

ZÁVĚR

Bakterie rodu *Asaia* bývá stále častěji izolována z balených ochucených nealkoholických nápojů a představuje tak poměrně nové nebezpečí v nápojovém průmyslu. Ve výrobcích způsobují organoleptické změny, díky kterým se stávají nevhodnými pro konzumaci a nepřijatelné pro zákazníka. Zdrojem kontaminace jsou šťávy a přírodní aroma, které se používají k ochucení. Je pravděpodobné, že poptávka po nových a exotických příchutích vedla k rozšíření této bakterie i mimo své původní stanoviště. (Antolak a Kregiel., 2015)

Problémem jsou především jejich adhezni vlastnosti a schopnost tvorby biofilmu, který ulpí na technologickém zařízení a je těžko odstranitelný, tím může docházet k sekundární kontaminaci, i když ve výchozí surovině *Asaia* přítomna není. Nápomocný není ani fakt, že jsou rezistentní vůči konzervačním látkám běžně používaným k zajištění mikrobiální stability nápojů. Pro odstranění je třeba použít silnější sanitální prostředky a detergenty spolu s mechanickým čištěním. (Horsáková et al., 2009; Sedláčková et al., 2011)

Zajímavé jsou studie zabývající se použitím přírodních bioaktivních látek k eliminaci těchto bakterií. Polyfenolické látky extrahované z rostlin a ovoce bohatých na tyto sloučeniny by tak mohly být jedním z řešení, jak snížit přítomnost těchto nežádoucích mikroorganismů a zároveň přispět ke zdraví konzumenta. (Šístková et al., 2019)

Přestože se nejedná o patogenní mikroorganismy, byly detekovány v klinickém materiálu pacientů se sníženou imunitou a přispěly ke zhoršení jejich zdravotního stavu. Dále byly izolovány ze střev, slinných žláz a reprodukčních orgánů komárů, kteří jsou vektory při přenosu malárie nebo různých virů. (Tuuminen et al., 2006; Chouaia et al., 2010)

Asaia byla objevena poměrně nedávno, jedná se tedy o stále málo probádanou bakterii. Budoucí studie a tím lepší porozumění jejich vlastnostem proto přispějí k zamezení tohoto nežádoucího mikroorganismu v potravinářském průmyslu a rozvoji nových technologií nebo zlepšení stávajících. (Antolak a Kregiel., 2015)

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ALAUZET, Corentine, Corinne TEYSSIER, Estelle JUMAS-BILAK, et al., 2010. *Gluconobacter* as Well as *Asaia* Species, Newly Emerging Opportunistic Human Pathogens among Acetic Acid Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. American Society for Microbiology, 48(11), 3935-3942 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1128/JCM.00767-10. ISSN 00951137. Dostupné z: <https://jcm.asm.org/content/jcm/48/11/3935.full.pdf>
- ANDRÉS-BARRAO, Cristina, François BARJA, Ruben ORTEGA PÉREZ, Marie-Louise CHAPPUIS, Sarah BRAITO a Ana HOSPITAL BRAVO, 2017. Identification Techniques of Acetic Acid Bacteria: Comparison between MALDI-TOF MS and Molecular Biology Techniques. In: SENGUN, Ilkin Yucel (Ed.). *Acetic Acid Bacteria: Fundamentals and Food Applications*. CRC Press, s. 398-429. ISBN 978-1-4987-6370-7.
- ANO, Yoshitaka, Hirohide TOYAMA, Osao ADACHI a Kazunobu MATSUSHITA, 2008. Energy Metabolism of a Unique Acetic Acid Bacterium, *Asaia bogorensis*, That Lacks Ethanol Oxidation Activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 72(4), 989-997 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1271/bbb.70740. ISSN 09168451. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1271/bbb.70740>
- ANTOLAK, Hubert, Dorota KREGIEL a Agata CZYZOWSKA, 2015. Adhesion of *Asaia bogorensis* to glass and polystyrene in the presence of cranberry juice. *Journal of Food Protection* [online]. Int Assoc Food Protection, 78(6), 1186-1190 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-14-440. ISSN 0362028X. Dostupné z: <https://search.proquest.com/docview/1686396141/fulltext/D13C64A9904F41ADPQ/1?accountid=15518>
- ANTOLAK, Hubert a Dorota KREGIEL, 2015. Bakterie *Asaia* sp. - niebezpieczeństwo w przemyśle wód mineralnych i napojów. *Asaia* sp. – a threat to the bottled water and beverage industry. *Laboratorium – Przegląd Ogólnopolski. Techniki i badania laboratoryjne*. [online]. 11-12/2015, 33-38. [cit. 2019-05-04]. Dostupné z: <https://laboratorium.elamed.pl/uploads/lab/articles/27926/33-38.pdf>
- ANTOLAK, Hubert, Agata CZYZOWSKA a Dorota KREGIEL, 2016. Black Currant (*Ribes nigrum* L.) and Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Fruit Juices Inhibit Adhesion of *Asaia* spp. *BioMed Research International* [online]. Hindawi Limited, 2016, 3671306 [cit.

2019-05-04]. DOI: 10.1155/2016/3671306. ISSN 23146133. Dostupné z:

<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/3671306/>

ANTOLAK, Hubert, Agata CZYZOWSKA a Dorota KREGIEL, 2017. Antibacterial and antiadhesive activities of extracts from edible plants against soft drink spoilage by *Asaia* spp. *Journal of Food Protection* [online]. Int Assoc Food Protection, 80(1), 25-34 [cit.

2019-05-04]. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-16-134. ISSN 0362028X. Dostupné z:

<https://search.proquest.com/docview/1854279971?pq-origsite=summon>

ANTOLAK, Hubert, Agata CZYZOWSKA a Dorota KREGIEL, 2018. Activity of *Mentha piperita* L. ethanol extract against acetic acid bacteria *Asaia* spp. *Foods* [online]. MDPI,

7(10), 171-180 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.3390/foods7100171. ISSN 23048158. Dostupné

z: <https://www.mdpi.com/2304-8158/7/10/171/htm>

AZEREDO, Denise R.P, Verônica ALVARENGA, Anderson S. SANT'ANA a Armando U.O. SABAA SRUR, 2016. Overview of microorganisms and factors contributing for the microbial stability of carbonated soft drinks. *Food Research International* [online]. El-

sevier, 82, 136-144 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.01.024. ISSN

09639969. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996916300230#s0015>

BURSOVÁ, Šárka, 2014. *Mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-675-9.

CROTTI, Elena, Aurora RIZZI, Bessem CHOUAIA, et al., 2010. Acetic Acid Bacteria, Newly Emerging Symbionts of Insects. *Applied and Environmental Microbiology* [online].

American Society for Microbiology, 76(21), 6963-6970 [cit. 2019-05-04]. DOI:

10.1128/AEM.01336-10. ISSN 00992240. Dostupné z:

<https://aem.asm.org/content/76/21/6963>

ČÍŽKOVÁ, Helena, 2016. *Nealkoholické nápoje*. Praha: Sdružení českých spotřebitelů, z.ú.. Jak poznáme kvalitu?. ISBN 978-80-87719-39-8

GOMES, Rodrigo José, Maria de Fatima BORGES, Morsyleide de Freitas ROSA, Raúl Jorge Hernan CASTRO-GÓMEZ a Wilma Aparecida SPINOSA, 2018. Acetic acid bacteria in the food industry. *Food Technology and Biotechnology* [online]. Faculty Food Technology Biotechnology, 56(2), 139-151 [cit. 2019-05-04]. DOI:10.17113/ftb.56.02.18.5593.

ISSN 13309862. Dostupné z: <https://doaj.org/article/5efc866e813a41798c8ac278492c30c5>

HORSÁKOVÁ, I., M. VOLDŘICH, M. ČEŘOVSKÝ, P. SEDLÁČKOVÁ, P. ŠICNEROVÁ a P. ULBRICH, 2009. *Asaia* sp. as a bacterium decaying the packaged still fruit beverages. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. Czech Academy Agricultural Sciences, 27(Special 1), S362-S365 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.17221/970-CJFS. ISSN 12121800. Dostupné z: <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/07951.pdf>

CHOUAIA, Bessem, Paolo ROSSI, Matteo MONTAGNA, et al., 2010. Molecular Evidence for Multiple Infections as Revealed by Typing of *Asaia* Bacterial Symbionts of Four Mosquito Species. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. American Society for Microbiology, 76(22), 7444-7450 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1128/AEM.01747-10. ISSN 00992240. Dostupné z: <https://aem.asm.org/content/76/22/7444>

JURETSCHKO, Stefan, Toni K. BEAVERS-MAY a Stephanie H. STOVALL, 2010. Nosocomial infection with *Asaia lannensis* in two paediatric patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Medical Microbiology* [online]. Soc General Microbiology, 59(7), 848-852 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1099/jmm.0.019067-0. ISSN 00222615.

Dostupné z:

<https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/59/7/848.pdf?expires=1557235517&id=id&accname=guest&checksum=A59E072465AC7995517B93C676AF9B0E>

KADLEC, Pavel, 2002. *Technologie potravin*. I. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-7080-509-9.

KATSURA, Katsura, Hiroko KAWASAKI, Wanchern POTACHAROEN, Suson SAONO, Tatsuji SEKI, Yuzo YAMADA, Tai UCHIMURA a Kazuo KOMAGATA, 2001. *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. Soc General Microbiol, 51(2), 559-563 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1099/00207713-51-2-559. ISSN 14665026. Dostupné z: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/51/2/559>

KOMMANEE, Jintana, Somboon TANASUPAWAT, Pattaraporn YUKPHAN, Taweesak MALIMAS, Yuki MURAMATSU, Yasuyoshi NAKAGAWA a Yuzo YAMADA, 2010. *Asaia spathodeae* sp. nov., an acetic acid bacterium in the .ALPHA.-Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology* [online]. 公益財団法人 応用微生物学・分子細胞生物学研究奨励会, 56(1), 81-87 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.2323/jgam.56.81. ISSN 00221260. Dostupné z:

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam/56/1/56_1_81/_article

- KREGIEL, Dorota, Anna RYGALA, Zdzislava LIBUDZISZ, 2011. Bakterie z rodzaju *Asaia* – nowe zanieczyszczenie smakowych wód mineralnych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* [online]. 75, 5-16. [cit. 2019-05-04]. Dostupné z: <http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.ekon-element-000171344695>
- KREGIEL, Dorota, 2013. Attachment of *Asaia lannensis* to materials commonly used in beverage industry. *Food Control* [online]. Elsevier, 32(2), 537-542 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.01.037. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513000601>
- KREGIEL, Dorota, Anna OTLEWSKA a Hubert ANTOLAK, 2014. Attachment of *Asaia bogorensis* originating in fruit-flavored water to packaging materials. *BioMed Research International* [online]. Hindawi Limited, 2014, 514190 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1155/2014/514190. ISSN 23146133. Dostupné z: <https://search.proquest.com/docview/1563919175?pq-origsite=summon>
- KREGIEL, Dorota, 2015. Health safety of soft drinks. *BioMed Research International* [online]. Hindawi Limited, 2015, 128697-128615 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1155/2015/128697. ISSN 23146133. Dostupné z: <https://search.proquest.com/docview/1652320384?pq-origsite=summon>
- KREGIEL, Dorota, Steve JAMES, Anna RYGALA, Joanna BERLOWSKA, Hubert ANTOLAK a Ewelina PAWLIKOWSKA, 2018. Consortia formed by yeasts and acetic acid bacteria *Asaia* spp. in soft drinks. *Antonie Van Leeuwenhoek* [online]. Springer International Publishing, 111(3), 373-383 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1007/s10482-017-0959-7. ISSN 00036072. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10482-017-0959-7>
- LPSN ©1997-2018 [online]: *List of prokaryotic names with standing in nomenclature*. [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: <http://www.bacterio.net/-classifphylo.html#acetobacteraceae>
- MALIMAS, Taweesak, Pattaraporn YUKPHAN, Mai TAKAHASHI, et al., 2008. *Asaia lannaensis* sp. nov., a New Acetic Acid Bacterium in the Alphaproteobacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 72(3), 666-671 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1271/bbb.70233. ISSN 09168451. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1271/bbb.70233>

- MATEO, E, M.J. TORIJA, A. MAS a E.J. BARTOWSKY, 2014. Acetic acid bacteria isolated from grapes of South Australian vineyards. *International Journal of Food Microbiology* [online]. Elsevier B.V, 178, 98-106 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.010. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160514001238>
- MOORE, John, Mark MCCALMONT, Jiru XU, B. Cherie MILLAR a Neville HEANEY, 2002. *Asaia* sp., an Unusual Spoilage Organism of Fruit-Flavored Bottled Water. *Applied and Environmental Microbiology*[online]. American Society for Microbiology, 68(8), 4130-4131 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1128/AEM.68.8.4130-4131.2002. ISSN 00992240. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC123994/pdf/0072.pdf>
- RUIZ, Patricia, Susana SESEÑA, Pedro IZQUIERDO a María PALOP, 2010. Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a culture-independent method (PCR-DGGE). *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. Springer-Verlag, 86(5), 1555-1562 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1007/s00253-010-2492-8. ISSN 01757598. Dostupné z: <https://search.proquest.com/docview/229579707/fulltextPDF/A2BF39A59C8C432CPQ/1?accountid=15518>
- SAMADDAR, Neeloy, Arundhati PAUL, Somnath CHAKRAVORTY, Writachit CHAKRABORTY, Joydeep MUKHERJEE, Debarati CHOWDHURI a Ratan GACHHUI, 2011. Nitrogen fixation in *Asaia* sp. (Family Acetobacteraceae). *Current Microbiology* [online]. SPRINGER, 63(2), 226-231 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1007/s00284-011-9968-3. ISSN 03438651. Dostupné z: <https://search.proquest.com/docview/875670961?pqorigsite=summon>
- SEDLÁČEK, Ivo, 2007. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4207-0.
- SEDLÁČKOVÁ, Petra, Miroslav ČEŘOVSKÝ, Iveta HORSÁKOVÁ a Michal VOLDRICH, 2011. Cell surface characteristic of *Asaia bogorensis*-spoilage microorganism of bottled water. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. Czech Academy Agricultural Sciences, 29(4), 457-461 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.17221/96/2011-CJFS. ISSN 12121800. Dostupné z: https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/96_2011-CJFS.pdf
- SENGUN, Ilkin yucel a Seniz KARABIYIKLI, 2001. Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control* [online]. Elsevier, 22(5), 647-656 [cit. 2019-05-04]. DOI:

10.1016/j.foodcont.2010.11.008. ISSN 09567135. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713510003762>

SUZUKI, Rei, Yi ZHANG, Takao IINO, Yoshimasa KOSAKO, Kazuo KOMAGATA a Tai UCHIMURA, 2010. *Asaia astilbes* sp. nov., *Asaia platycodi* sp. nov., and *Asaia prunellae* sp. nov., novel acetic acid bacteria isolated from flowers in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology* [online]. 公益財団法人 応用微生物学・分子細胞生物学研究奨励会, 56(4), 339-346 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.2323/jgam.56.339. ISSN 00221260. Dostupné z: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam/56/4/56_4_339/_article

ŠMARDÁ, Jan, 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.

ŠÍSTKOVÁ, Iveta, Iveta HORSÁKOVÁ, Mariana HANKOVÁ a Helena ČÍŽKOVÁ, 2019. *Asaia* spp., acetic acid bacteria causing the spoilage of non-alcoholic beverages. *Kvasný Průmysl* [online]. Research Institute of Brewing and Malting, 65(1), 1-5 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.18832/kp2019.65.1. ISSN 25708619. Dostupné z: <http://www.kvasnyprumysl.eu/index.php/kp/article/view/54>

TABAN, Birce Mercanoglu a Natsaran SAICHANA, 2017. Physiology and Biochemistry of Acetic Acid Bacteria. In: SENGUN, Ilkin Yucel (Ed). *Acetic Acid Bacteria: Fundamentals and Food Applications*. CRC Press, s. 101-132. ISBN 978-1-4987-6370-7.

TUUMINEN, Tamara, Terhi HEINÄSMÄKI a Tuija KERTTULA, 2006. First Report of Bacteremia by *Asaia bogorensis*, in a Patient with a History of Intravenous-Drug Abuse. *Journal of Clinical Microbiology*[online]. American Society for Microbiology, 44(8), 3048-3050 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1128/JCM.00521-06. ISSN 00951137. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1594642/?tool=pmcentrez&report=abstract>

VALERA, Maria José, Maria Jesús TORIJA a Albert MAS, 2017. Detrimental Effects of Acetic Acid Bacteria in Foods. In: SENGUN, Ilkin Yucel (Ed.). *Acetic Acid Bacteria: Fundamentals and Food Applications*. CRC Press, s. 398-429. ISBN 978-1-4987-6370-7.

YAMADA, Y, K KATSURA, H KAWASAKI, Y WIDYASTUTI, S SAONO, T SEKI, T UCHIMURA a K KOMAGATA, 2000. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. Soc General Microbiol, 50(2), 823-829 [cit. 2019-05-

04]. DOI: 10.1099/00207713-50-2-823. ISSN 14665026. Dostupné z:

<http://ijs.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/50/2/823>

YAMADA, Yuzo, 2016. Systematics of Acetic Acid Bacteria. In: MATSUSHITA, Kazunobu, Hirohide TOYAMA, Naoto TONOUCI a Akiko OKAMOTO-KAINUNA (Eds.). *Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology*, Springer, s. 1-36. ISBN 978-4-431-55933-7

YUKPHAN, Pattaraporn, Wanchern POTACHAROEN, Somboon TANASUPAWAT, Morakot TANTICHAROEN a Yuzo YAMADA, 2004. *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. Soc General Microbiology, 54(2), 313-316 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1099/ijs.0.02734-0. ISSN 14665026. Dostupné z:

<https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/54/2/313.pdf?expires=1557236510&id=id&accname=guest&checksum=3E2802BD5CD3670FF3FBF32D32F50A6C>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADH	alkoholdehydrogenáza
ALDH	aldehyddehydrogenáza
BMK	bakterie mléčného kvašení
CFU	kolonii tvořící jednotka (Colony Forming Units)
CRP	C-reaktivní protein
DMDC	dimetyldikarbonát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfáty
dsDNA	dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina (double-stranded DNA)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GC báze	guanin a cytozin báze
MALDI-TOF MS	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)
MIC	minimální inhibiční koncentrace
PCR	polymerázová řetězová reakce
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
ssDNA	jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina (single-stranded DNA)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Ukázka kolonie *Asaia* sp. na médiu s glukózou (Kregiel et al., 2011).....17

SEZNAM TABULEK

Tab. č. 1: Taxonomické zařazení bakterií rodu <i>Asaia</i> (zpracováno podle Sedláček, 2006; LPSN, © 1997-2018).....	13
Tab. č. 2: DNA příbuznost mezi izoláty rodu <i>Asaia</i> a referenčními kmeny bakterií octového kvašení (zpracováno podle Yamada et al., 2000).....	15
Tab. č. 3: Rezistence vybraných antibiotik vůči <i>Asaia bogorensis</i> izolované z klinického materiálu (zpracováno podle Tuuminen et al., 2006).....	18
Tab. č. 4: Vlastnosti vybraných rodů z čeledi <i>Acetobacteraceae</i> (zpracováno podle Yamada et al., 2000; 2016; Kregiel et al., 2011).....	19