

Izolace a charakterizace grampozitivních koků z potravin nepodporujících rozvoj mikroorganismů

Bc. Tereza Bečicová

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. Tereza Bečicová
Osobní číslo: T22405
Studijní program: N0721A210004 Technologie potravin
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Izolace a charakterizace gram pozitivních koků 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 gram pozitivní koky a faktory, které mohou ovlivňovat jejich růst.

II. Praktická část

Z mikrobiologicky nerizikových potravin izolujte a dostupnými metodami identifikujte gram pozitivní koky.

Proveďte charakterizaci vybraných identifikovaných gram pozitivních koků.

Výsledky vyhodnotte, 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
- CHITRAKAR, B., ZHANG, M., ADHIKARI, B. Dehydrated foods: Are they microbiologically safe? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59: 2734-2745. 2019
- [2] 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
- [3] ZARZECKA U., ZADERNOWSKA, A. CHAJECKA-WIERZCHOWSKA W. Effects of osmotic and high pressure stress on expression of virulence factors among *Enterococcus* spp. isolated from food of animal origin. *Food Microbiology*, 102: 103900. 2022
- [4] ICMSF – International Commission on Microbiological Specification for Foods. *Microorganisms in foods 6*. 2nd ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 2005
- [5] 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

Tato diplomová práce se zabývá charakterizací vybraných grampozitivních koků izolovaných z mikrobiologicky nerizikových potravin. Cílem bylo izolovat grampozitivní koky ze vzorků sušeného a lyofilizovaného ovoce a masových konzerv a následně provést charakterizaci jejich určitých vlastností.

V rámci charakterizace byl sledován růst izolátů v různých teplotních podmínkách, byla zjišťována tvorba biofilmu pomocí modifikované Christensenovy metody. Dále byla diskovou difuzní metodou testována citlivost izolátů na vybraná antibiotika a na základě fenotypu byla provedena detekce příslušných genů rezistence pomocí klasické PCR metody.

Výzkumem bylo zjištěno, že v analyzovaných vzorcích se vyskytovaly rody *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Aerococcus* a *Rothia*. Z výsledků vyplývá, že většina testovaných grampozitivních koků rostla v rozmezí testovaných teplot 20–40 °C, většina vykazovala rezistenci k více skupinám antibiotik zároveň a u zástupců *Staphylococcus* a *Kocuria* byla prokázána multirezistence. Většina testovaných genů byla u grampozitivních koků přítomná, nejčastěji detekovaným genem antibiotické rezistence byl gen *blaZ* determinující rezistenci k β -laktamovým antibiotikům, gen *ermA* podmiňující rezistenci k erytromycinu a gen *norA* determinující fluorochinolonovou rezistenci. Tvorba biofilmu byla prokázána u zástupců *Staphylococcus* a *Kocuria*. Tato práce přispěla k rozšíření povědomí ohledně významu výskytu grampozitivních koků v mikrobiologicky nerizikových potravinách.

Klíčová slova: sušené ovoce, lyofilizované ovoce, konzervované masné výrobky, grampozitivní koky, antibiotická rezistence, biofilm, PCR

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the characterization of selected Gram-positive cocci isolated from microbiologically safe foods. The aim was to isolate gram-positive cocci from dried and freeze-dried fruit and canned meat samples and then to characterize their specific properties.

As part of the characterization, the growth of the isolates was monitored under different temperature conditions, and biofilm formation was investigated using the modified Christensen method. In addition, the susceptibility of the isolates to selected antibiotics was tested by the disc diffusion method and the detection of the corresponding resistance genes was performed based on the phenotype using the classical PCR method.

The study revealed that the genera *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Micococcus*, *Aerococcus* and *Rothia* were present in the analysed samples. The results show that most of the tested gram-positive cocci grew in the tested temperature range of 20-40 °C, most of the tested cocci showed resistance to multiple antibiotic groups simultaneously, and multidrug resistance was demonstrated in *Staphylococcus* and *Kocuria* species. Most of the tested genes were present in Gram-positive cocci, with the most frequently detected antibiotic resistance genes being *blaZ* gene determining resistance to β -lactam antibiotics, the *ermA* gene conferring resistance to erythromycin and the *norA* gene determining fluoroquinolone resistance. Biofilm formation was demonstrated in some species of *Staphylococcus* and *Kocuria*. This study has contributed to the widespread awareness of the importance of gram-positive cocci in microbiologically safe foods.

Keywords: dried fruit, freeze-dried fruit, canned meat products, gram-positive cocci, antibiotic resistance, biofilm, PCR

Ráda bych zde poděkovala vedoucí mé diplomové práce prof. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za možnost zpracovávat zajímavé téma, za odborné rady, které mi během vypracování práce poskytla, a především za její ochotu, trpělivost a vstřícnost. Také bych ráda poděkovala Ing. Veronice Kučabové za cenné rady a pomoc při práci v laboratoři. Mé poděkování patří také prof. Ing. Miroslavě Kačániové, Ph.D. za pomoc při identifikaci bakteriálních izolátů. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, blízkým přátelům a mému partnerovi za jejich velkou podporu během celého mého studia.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 POTRAVINY S NÍZKOU HODNOTOU VODNÍ AKTIVITY	13
1.1 VÝZNAM VODY V POTRAVINÁCH.....	13
1.2 POTRAVINY S NÍZKOU VODNÍ AKTIVITOU	13
1.3 SUŠENÉ POTRAVINY	15
1.3.1 Proces sušení	15
1.3.2 Výhody a nevýhody sušení	16
1.3.3 Sušené ovoce	16
1.4 LYOFILIZOVANÉ POTRAVINY	18
1.4.1 Proces lyofilizace	18
1.4.2 Výhody a nevýhody lyofilizace	19
1.4.3 Lyofilizované ovoce.....	20
2 TEPelnĚ OPRACOVANÉ POTRAVINY	21
3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ RŮST A MNOŽENÍ MIKROORGANISMŮ	23
3.1 BAKTERIÁLNÍ RŮST	23
3.1.1 Lag fáze	23
3.1.2 Exponenciální fáze	23
3.1.3 Stacionární fáze	24
3.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ RŮST A MNOŽENÍ MIKROORGANISMŮ.....	25
3.2.1 Vnitřní faktory.....	25
3.2.2 Vnější faktory.....	28
3.2.3 Implicitní faktory	30
3.2.4 Procesní faktory	30
3.3 BARIÉROVÁ TEORIE.....	30
3.4 TVORBA BIOFILMU	31
4 VÝSKYT GRAMPOZITIVNÍCH KOKŮ V POTRAVINÁCH NEPODPORUJÍCÍCH MIKROBIOLOGICKÝ ROZVOJ	32
4.1 SUŠENÉ OVOCE.....	32
4.2 KONZERVY.....	33
4.3 ROD <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	34
4.4 ROD <i>MICROCOCCUS</i>	35
4.5 ROD <i>KOCURIA</i>	36
4.6 ROD <i>ROTHIA</i>	37
4.7 ROD <i>AEROCOCCUS</i>	37
II PRAKTICKÁ ČÁST	38
5 CÍLE PRÁCE	39

6	POUŽITÝ MATERIÁL.....	40
6.1	TESTOVANÉ BAKTERIÁLNÍ IZOLÁTY	40
6.2	KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	40
6.3	CHEMIKÁLIE A ROZTOKY.....	41
6.4	ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY	42
6.5	POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	43
7	METODIKA	45
7.1	IZOLACE GRAMPOZITIVNÍCH KOKŮ Z POTRAVIN	45
7.2	IDENTIFIKACE GRAMPOZITIVNÍCH KOKŮ	45
7.2.1	Gramovo barvení.....	46
7.2.2	Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	46
7.2.3	Sekvenace genu pro 16S rRNA.....	46
7.3	CHARAKTERIZACE IZOLOVANÝCH GRAMPOZITIVNÍCH KOKŮ.....	52
7.3.1	Sledování růstu grampozitivních koků.....	52
7.3.2	Skrínink antibiotické rezistence u grampozitivních koků.....	53
7.3.3	Identifikace přítomnosti genů antibiotické rezistence.....	54
7.3.4	Stanovení schopnosti tvorby biofilmu Christensenovou metodou.....	56
8	VÝSLEDKY.....	58
8.1	IDENTIFIKACE BAKTERIÁLNÍCH IZOLÁTŮ.....	58
8.1.1	MALDI-TOF	58
8.1.2	Sekvenace 16S rRNA.....	60
8.2	SLEDOVÁNÍ RŮSTU GRAMPOZITIVNÍCH KOKŮ	61
8.2.1	Souhrn sledování růstu grampozitivních koků.....	68
8.3	SKRÍNINK ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE U GRAMPOZITIVNÍCH KOKŮ	69
8.3.1	Antibiotická rezistence u <i>Staphylococcus</i> spp.	70
8.3.2	Antibiotická rezistence u izolátů rodů <i>Aerococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Kocuria</i> a <i>Rothia</i>	73
	<i>Micrococcus</i> spp.....	73
	<i>Kocuria</i> spp.	74
	<i>Rothia</i> spp.....	75
8.3.3	Souhrn fenotypové antibiotické rezistence u grampozitivních koků	77
8.4	IDENTIFIKACE PŘÍTOMNOSTI GENŮ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE	78
8.4.1	Optimalizace metody pomocí gradientové PCR	78
8.4.2	Detekce genů rezistence u <i>Staphylococcus</i> spp.	78
8.4.3	Detekce genů rezistence u <i>Aerococcus</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp., <i>Kocuria</i> spp. a <i>Rothia</i> spp.	79
8.4.4	Souhrn výsledků detekce genů antibiotické rezistence u grampozitivních koků.....	81
8.5	STANOVENÍ SCHOPNOSTI TVORBY BIOFILMU CHRISTENSENOVOU METODOU	84
9	DISKUZE	87

9.1	IZOLACE A IDENTIFIKACE KMENŮ	88
9.2	VLIV TEPLoty NA RŮST IZOLÁTŮ	89
9.3	ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE	90
9.4	TVORBA BIOFILMU	92
ZÁVĚR		94
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		95
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		104
SEZNAM OBRÁZKŮ		105
SEZNAM TABULEK.....		107

ÚVOD

Potraviny jsou bohatým zdrojem živin a poskytují vynikající médium pro růst mikroorganismů způsobujících jejich kažení nebo mohou být u konzumentů původci alimentárních onemocnění. Bezpečnost potravin je globální problém a měla by být hlavním cílem všech provozovatelů potravinářských podniků produkujících potravinářské výrobky.

Konzervované produkty jako sušené či sterilované výrobky patří do skupiny mikrobiologicky nerizikových potravin. Popularita sušeného a lyofilizovaného ovoce roste, a to zejména díky jeho nízké hmotnosti, vysokému obsahu nutričně bohatých látek, skladovatelnosti a dlouhé trvanlivosti, která je zajištěna nízkým obsahem vody. Sterilované konzervované produkty jsou ošetřeny termosterilací, která zajišťuje trvanlivost produktu až po dobu několika let. I přes to, že tyto potraviny nepodporují mikrobiální růst, mohou být zdrojem mikrobioty způsobující jejich kažení nebo může dojít k jejich kontaminaci patogenními či oportunně patogenními kmeny. Mezi tyto mikroorganismy lze zařadit mimo jiné také grampozitivní koky. Zmíněné komodity mohou poskytovat vhodný substrát pro dlouhodobé přežívání patogenních bakterií a mohly by tak představovat zdravotní riziko pro spotřebitele.

S možnou kontaminací a přežíváním grampozitivních koků v potravinářských produktech nepodporujících jejich rozvoj souvisí mimo jiné i jejich schopnost tvořit biofilm. Kromě zvýšené odolnosti buněk biofilmu vůči suchému prostředí, záhřevu, antimikrobiálním látkám či sanitacím přípravkům, by mohly biofilmy poskytovat vhodné prostředí pro horizontální přenos genů, včetně genů antibiotické rezistence mezi mikroorganismy nacházejícími se v biofilmu. Velkou hrozbu v dané problematice pak představuje zejména přenos genů antibiotické rezistence z nepatogenních druhů na druhy schopné vyvolávat onemocnění z potravin, např. *Staphylococcus aureus*. Z těchto důvodů je charakterizace grampozitivních koků nezbytná pro pochopení významu jejich výskytu v mikrobiologicky nerizikových potravinách.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POTRAVINY S NÍZKOU HODNOTOU VODNÍ AKTIVITY

Voda je nejhojnější složkou potravin a hraje důležitou roli v různých biochemických reakcích, ovlivňuje fyzikální strukturu potravin a má velký dopad na organoleptické vlastnosti a skladovatelnost potravinářských výrobků (Malekjani, Jafari, 2023).

Mikrobiální buňky pro svůj růst vodu nezbytně potřebují, jelikož samotná buňka obsahuje až 90 % vody, která představuje prostředí, ve kterém probíhají veškeré metabolické pochody. Voda je nezbytná např. pro transport živin do buňky a odstraňování odpadních látek z buňky ven. Pro zabránění ztrátě vnitrobuněčné vody musí vnější prostředí obsahovat dostatečné množství vody (Doyle, Buchanan, 2013).

1.1 Význam vody v potravinách

Potravinářské produkty mají obecně složitou strukturu a voda je v tomto systému vázána na další látky, ale může se vyskytovat i volně. Voda se v potravinách vyskytuje volná nebo vázaná fyzikálními či chemickými vazbami. Schopnost vázat vodu mají např. hydroxylové skupiny polysacharidů či aminoskupiny bílkovin.

Voda, která se nachází v mezibuněčném prostoru potravinových matric a není vázaná na složky potravin, se nazývá voda volná neboli dosažitelná (Malekjani, Jafari, 2023). Pro růst mikroorganismů je důležitá právě voda dosažitelná, tedy chemicky nevázaná. Tuto dosažitelnou vodu mohou mikroorganismy využívat pro své buněčné pochody. Snížením obsahu využitelné vody lze dosáhnout omezení mikrobiálního metabolismu, množení a prodloužení trvanlivosti potravin (Doyle, Buchanan, 2013). Velmi užitečným parametrem, který pomáhá pochopit pohyb vodné fáze z prostředí do buňky a opačně, je aktivita vody (Adams, Moss, 2016). Působení aktivity vody na mikroorganismy je popsáno v kapitole 3.2.1

1.2 Potraviny s nízkou vodní aktivitou

V případě potravin s nízkou hodnotou a_w se bavíme o potravinách s a_w 0,85 a nižší. Do této kategorie patří potraviny jako např. cereálie, sušené ovoce, sušená zelenina, mouka, krupice, bylinky, koření, sušené mléko a jiné (Beuchat et al., 2013).

Aktivitu vody lze snížit např. sušením, lyofilizací, proslazováním, solením nebo zahuštěním. Těmito procesy klesá aktivita vody a dochází ke zvyšování osmotického tlaku v kapalné části potravin (Alp, Bulantekin, 2021). Pokles obsahu vody navíc snižuje hmotnost

produktu, usnadňuje ekonomické skladování, přepravu a nabízí tak širší distribuční potenciál. Snížená aktivita vody také inhibuje oxidační a enzymatické reakce, čímž výrazně prodlužuje trvanlivost produktu (Bourdoux et al., 2016). Klesá množství využitelné vody pro přítomné mikroorganismy, u kterých následkem toho dochází ke zpomalení buněčného metabolismu. Poklesem aktivity vody v potravině na určitou úroveň je do značné míry zabráněno růstu a množení většiny mikroorganismů v potravinách (Beuchat et al., 2013).

Potraviny s nízkým obsahem aktivity vody by však neměly být považovány za sterilní, Ovoce či zeleninu můžou mikroby kontaminovat již během procesů prvovýroby, přepravy či během procesu sušení. Kontaminace by mohla nastat zejména tehdy, jestliže nejsou dodržovány správné hygienické podmínky a postupy. Potravina, u které nedojde k dostatečnému snížení aktivity vody, může představovat vhodné podmínky pro růst a množení mikroorganismů. V sušených potravinách mohou některé patogeny, kvasinky a plísně růst i během skladování, přepravy a transportu, až do prodeje a způsobit tak jejich kažení. V případě přežití dostatečného počtu životaschopných choroboplodných buněk mohou konzumentovi přivodit zdravotní problémy (Alp, Bulantekin, 2021).

I přes určitý osmotický stres mohou mikroorganismy zůstat životaschopné. Jsou-li mikroorganismy vystaveny osmotickému stresu, jsou schopné produkovat a akumulovat v buněčné cytoplazmě různé typy osmoprotektantů, které vážou vodu, avšak tyto se neúčastní metabolických pochodů buňky. Variabilita v tvorbě osmoprotektivních látek by tak mohla vysvětlovat rozdílnost v limitních hodnotách a_w pro mikrobiální růst (Doyle, Buchanan, 2013).

Potraviny a složky potravin s nízkou a_w jsou v posledních letech stále častěji označovány za nosiče patogenů, které by mohly vyvolat onemocnění. Některé z těchto potravinových patogenů mohou v potravinách s nízkou hodnotou a_w i po zpracování potravin přežít několik měsíců, dokonce i několik let. K těmto patogenům lze zařadit mimo jiné i grampozitivní alimentární patogeny. V suchých potravinách nebo suchých složkách potravin je prakticky nemožné tyto patogeny odstranit, aniž by se nezhoršila organoleptická kvalita potravin (Beuchat et al., 2013). Vzhledem k tomu je v současné době snaha o produkci mikrobiologicky kvalitních potravin a je nezbytné, aby byly zavedeny a dodržovány správné hygienické postupy (SHP) a systémy založené na zásadách analýzy rizik a kontrolních bodů HACCP (Beuchat et al., 2013).

1.3 Sušené potraviny

Proces sušení patří mezi nejstarší a nejběžnější formy konzervace potravin. Historie tohoto způsobu konzervace potravin sahá až do pravěku, kdy lidé sušili potraviny na slunci a dokázali tak uchovat potraviny delší dobu. To jim umožnilo přežít období nedostatku (Malekjani, Jafari, 2023).

Sušením se rozumí anabiotický proces konzervace, při kterém dochází vlivem působení tepla k odpařování volné vody ze sušené hmoty na takovou úroveň, která již není vhodná pro rozvoj mikroorganismů či degradační procesy enzymů. Jak již bylo zmíněno výše, voda ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti potravin a je nezbytná pro veškeré biochemické a mikrobiologické pochody (Bourdoux et al., 2016). Při sušení potraviny nejdříve dochází k odstranění volné vody a poté fyzikálně vázané vody. Při intenzivním sušení se může odstranit i část vody chemicky vázané (Malekjani, Jafari, 2023). Většinou však k odstranění chemicky vázané vody nedojde a tato voda zůstává v potravine i po ukončení procesu sušení. Mikroorganismy chemicky vázanou vodu pro svůj růst a množení využít nemohou. (Bourdoux et al., 2016).

I přes to, že proces sušení dokáže zajistit prodloužení trvanlivosti potravinářských komodit, do značné míry ovlivňuje strukturu a kvalitu původního produktu. Pro zachování nutriční hodnoty, optimální struktury a celkové kvality, včetně mikrobiologické jakosti sušených potravin, jsou využívány různé metody sušení, které jsou v současné době předmětem dalšího zkoumání a procesů optimalizace (Malekjani, Jafari, 2023).

1.3.1 Proces sušení

Proces odnímání volné vody se označuje také jako osmoanabióza. Principem osmoanabiózy je pokles vody za současného zvyšování osmotického tlaku a koncentrace látek v potravine. Čím nižší množství vody se v potravine nachází, tím více je voda v potravine poutána a tím sušší vzduch musí být použitý k tomu, aby docházelo ke snižování vlhkosti ve vysoušeném materiálu. Změnu obsahu vody v potravine v závislosti na relativní vlhkosti vzduchu okolního prostředí znázorňují sorpční izotermy (Ingr, 2007).

Při sušení se z pevného materiálu působením tepla a proudění vzduchu odpařuje voda. Při umístění vlhkého materiálu do prostředí, kde tenze páry dosahuje nižších hodnot než na povrchu materiálu, se následně z povrchu této potraviny začne odpařovat

voda (Dobiáš, 2004). Při procesu sušení probíhají chemické pochody zvané Maillardovy reakce. Kromě Maillardových reakcí probíhají také v jisté míře reakce oxidační (Ingr, 2007).

Rychlost sušení je ovlivněna několika faktory, včetně mechanismu transportu vlhkosti z potravin, vlastností sušícího vzduchu či samotné povahy sušených potravin (Malekjani, Jafari, 2023).

1.3.2 Výhody a nevýhody sušení

Při šetrném způsobu sušení si ovoce zachovává vysoké procento nutričně bohatých a prospěšných látek. U sušeného materiálu dochází ke snižování objemu a zlepšení skladovatelnosti či zvýšení efektivnosti přepravy, jelikož sušená potravina nezabírá tolik místa jako čerstvá. Chuť sušeného ovoce je mimo jiné intenzivnější a plnější (Malekjani, Jafari, 2023).

Při sušení vysokými teplotami často potravina, zejména ovoce, velmi ztvrdne, vlivem procesu karamelizace a Maillardovy reakce hnědne a může mít až nepříjemnou nahořklou chuť. Přílišná vysoká teplota pak může mít za následek degradaci vitaminů (např. vitaminů skupiny B a vitaminu C) a jiných termolabilních sloučenin a snížení nutriční hodnoty sušené potravin. Čím je teplota zahřívaného sušeného materiálu vyšší, tím intenzivněji tyto nežádoucí změny mohou probíhat (Dobiáš, 2004).

Obzvláště důležitý je u potravin sušených vzduchem způsob balení a podmínky skladování. Pouze při rovnováze vlhkosti prostředí s vlhkostí sušené potravin lze zajistit vhodné podmínky, při kterých nebude docházet k dalšímu vysoušení, popřípadě vlhnutí sušené potravin a jejímu kažení. V případě balených sušených potravin je nutná vzduchotěsnost obalů. U potravin s velmi nízkou hodnotou a_w je nezbytné balení a následné skladování v hermeticky uzavřených obalech (Ingr, 2007).

1.3.3 Sušené ovoce

Dle Vyhlášky č. 397/2021 Sb. je sušené ovoce definováno jako ovoce konzervované sušením bez použití přírodních sladidel. Tato vyhláška též upravuje požadavky na konzistenci, vzhled, barvu, chuť a vůni sušeného ovoce, které jsou uvedeny v tabulce 1 (Vyhláška č. 397/2021 Sb.).

Tabulka 1: Požadavky na sušené ovoce dle Vyhlášky č. 397/2021 Sb.

Potravina	Konzistence a vzhled	Barva	Chuť a vůně
sušené ovoce	dostatečně vysušené, bez známek poškození škůdci s ojedinělým výskytem cizích příměsí a nevyzrálých plodů, bez znečištění zeminou či prachem	odpovídající danému druhu ovoce sušeného bez známek poškození sluncem	typická pro daný druh ovoce, bez cizích pachů a chutí

Ovoce je jednou z komodit, která díky vysokému obsahu vody a sacharidů je velmi neúdržná, a podléhá rychlé zkáze. Čerstvé ovoce představuje optimální podmínky pro enzymatickou činnost a také podporuje růst mikroorganismů. V potravinářství je proces sušení ovoce nenahraditelnou konzervační technologií, která umožňuje prodloužení jeho trvanlivosti (Jayaraman, Gupta, 2020).

Sušení ovoce bylo historicky prováděno na slunci nebo na vzduchu. Ovoce bylo nasekáno na kousky a v tenké vrstvě rozloženo na dřevěné či kamenné desky. Takto byly ponechány několik dní, dokud nedosáhly požadovaného stupně vysušení. V případě sušení vzduchem bylo ovoce zavěšeno na provazech a sušeno v proudu vzduchu (Mani, Valarmathi, 2021).

Sušení na slunci se v dnešní době využívá spíše už jen v tropických a subtropických oblastech, kde je počasí stabilní a umožňuje tak dostatečné vysušení ovoce na požadovanou vlhkost (Dobiáš, 2004). Pro konzervaci sušeného ovoce či dalších sušených výrobků se v současnosti používají různé technologické postupy založené na odnímání vlhkosti z potraviny za pomoci tepla a proudění vzduchu. Především se používá konvenční sušení teplým či horkým vzduchem v různých typech sušáren (Bourdoux et al., 2016).

Při technologii sušení je trendem optimalizace a standardizace procesu sušení pro zajištění kvalitního produktu z hlediska mikrobiologického či organoleptického a zároveň je také kladen důraz na energetickou náročnost zvolené technologie (Bourdoux et al., 2016). Ve snaze snížit provozní náklady a minimalizovat spotřebu energie při sušení jsou vyvíjeny nové trendy v postupech sušení. Mezi nově vznikající technologie patří hybridní sušicí systémy, infračervené či mikrovlnné sušicí systémy (Chua, Chou, 2014).

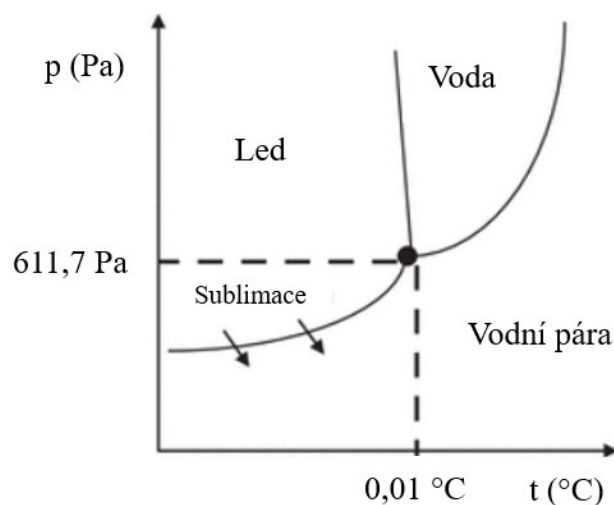
1.4 Lyofilizované potraviny

Lyofilizace je metoda založená na procesu vakuové sublimace vody z materiálu. To má za následek snížení hodnoty aktivity vody v lyofilizovaném produktu, čímž dojde k zabránění procesů kažení. V potravinářském průmyslu je tato metoda hojně využívána, jelikož se jedná o šetrnější metodu než klasické sušení za použití vysokých teplot. Lyofilizace je prováděna při nízkých teplotách, čímž je zachována barva, chuť, vzhled potravin a degradace termolabilních látek je značně minimalizována (Bourdoux et al., 2016; Shah et al., 2022).

Metoda sušení mrazem byla známa již od konce 19. století. V průmyslových odvětvích se tato metoda začala využívat až po 2. světové válce. První komerční aplikace lyofilizace se objevily ve farmaceutickém průmyslu pro konzervaci antibiotik či krevní plazmy. V potravinářském průmyslu se lyofilizace začala využívat až koncem 50. let 20. století (Berk, 2013).

1.4.1 Proces lyofilizace

Principem lyofilizace je sublimace zmražené vody z potravinového materiálu. Sublimací se rozumí přechod z pevného skupenství přímo do skupenství plynného, aniž by došlo k přechodu do přechodné kapalné fáze. K sublimaci dochází v určitém rozsahu tlaků a teplot. Pokud tlak par a teplota jsou nižší než trojný bod vody, pak může docházet k sublimaci ledu, což znázorňuje fázový diagram vody na obrázku 1 (Berk, 2013).



Obrázek 1: Fázový diagram vody a podmínky sublimace (upraveno dle Berk, 2013)

Lyofilizace obecně zahrnuje tyto kroky: předmražení, zmražení, primární sušení a sekundární sušení (Doyle, Buchanan, 2013). Obvykle je lyofilizovaný materiál upraven, co nejrychleji zmražen na teplotu pod eutektický bod ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$), kdy dochází k tvorbě velmi malých ledových krystalků. Následně vlivem nízkého tlaku (kolem 10–50 Pa) probíhá primární sublimační sušení, při kterém sublimuje zmrzlá voda. Tímto způsobem dochází k desorpci většiny vody z potraviny. Během primárního sušení klesne obsah vody v potravine přibližně na 15–20 %. Uvolněná vodní pára kondenzuje v podobě ledových krystalů na povrchu kondenzátoru. V další fázi nastává sekundární, neboli desorpční sušení, během kterého se z potravinové matrice odstraní většina nezmrzlé vody (Berk, 2013; Bourdoux et al., 2016).

1.4.2 Výhody a nevýhody lyofilizace

Při lyofilizaci se používají poměrně nízké teploty, které umožňují zachování vlastností potraviny, jako je vzhled, barva nebo chuť. Nízké teploty lyofilizace také přispívají k minimalizaci degradace termolabilních sloučenin, z nichž většina je zodpovědná za aroma či výživovou hodnotu produktu (Silva-Espinoza et al., 2020). Z metod sušení je právě lyofilizace považována za nejšetrnější způsob, jelikož umožňuje rychlé sušení za současného minimálního poškození mikrostruktury sušeného materiálu a nedochází k významným ztrátám nutričních látek, jako např. vitaminů (Prosapio, Lopez-Quiroga, 2020).

I přes mikrobiologickou kvalitu lyofilizovaného produktu může dojít ke zhoršení jeho fyzikálních a chemických vlastností. Lyofilizované produkty bývají velmi porézní a obsahují velmi nízké procento vody. To umožňuje velmi snadnou interakci rozpuštěných látek se vzdušným kyslíkem, při kterých dochází k řadě oxidačních reakcí. Lyofilizovaný produkt tak snadno podléhá reakcím, při kterých mohou být oxidovány bioaktivní sloučeniny, jako např. vitamin C, karotenoidy či fenolické sloučeniny (Silva-Espinoza et al., 2020).

Nevýhodou lyofilizace je poměrně dlouhá doba trvání a spolu s tím související vysoké náklady na provoz. Náklady jsou vysoké i díky používání nízkých tlaků při procesu sublimace. Právě z těchto důvodů se donedávna používala lyofilizace pouze ve specifických potravinářských odvětvích u produktů s vysokou přidanou hodnotou. Vzhledem k tomu je snaha o optimalizaci procesu lyofilizace včetně zkrácení doby trvání lyofilizačního procesu (Silva-Espinoza et al., 2020).

1.4.3 Lyofilizované ovoce

První komerční využití lyofilizace pro prodloužení trvanlivosti potravin, jako jsou ovoce a zelenina, je zaznamenáno až v 50. letech 20. století. Proces lyofilizace umožnil zachovat barvu, chuť a vůni těchto potravin, aniž by bylo nutné použití konzervačních látek či cukru. V současné době je lyofilizované ovoce populární zejména pro jeho delší trvanlivost v porovnání s čerstvým ovocem, je lehce přenosné a zachovává si vysoký obsah nutričně prospěšných látek (Berk, 2013).

Produkce lyofilizovaných potravin je na vzestupu a trh s těmito produkty je značně diverzifikován. Zájem o tyto výrobky stále roste. Produkty jako lyofilizované ovocné kousky či plátky jsou často používány do různých potravinářských výrobků, včetně cukrovinek, snídaňových cereálií, pekařských výrobků aj. (Bhatta et al., 2020).

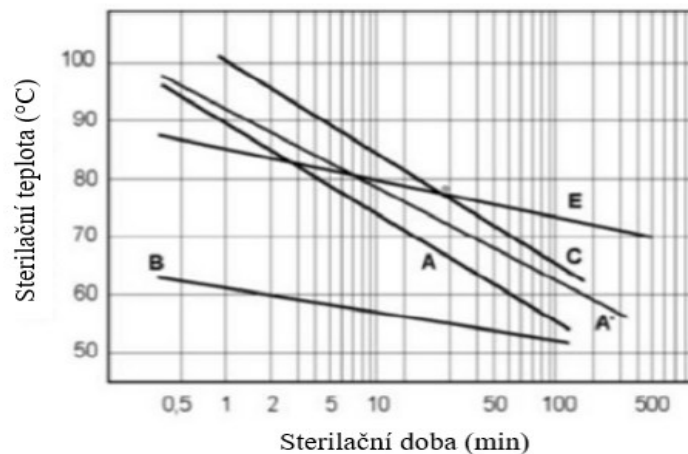
Ovoce je doporučováno jako součást zdravé výživy a jeho přiměřená konzumace hraje roli v prevenci některých onemocnění. Tyto účinky lze přisuzovat mimo jiné vysokému obsahu bioaktivních látek, mezi které patří např. některé vitaminy, flavonoidy, vláknina a další látky. Na druhou stranu je ovoce hůře údržné a důležitým aspektem je i to, že čerstvé ovoce není na trhu dostupné stále. Metoda lyofilizace je jednou z metod, která dokáže prodloužit údržnost ovoce při současném zachování jeho nutričních vlastností a zajistit tak jeho dostupnost po celý rok (Silva-Espinoza et al., 2020).

2 TEPELNĚ OPRACOVANÉ POTRAVINY

Tepelné opracování patří mezi fyzikální metody konzervace. Konzervace tepelným záhřevem spočívá v přímé devitalizaci vegetativních forem mikroorganismů. Za určitých podmínek sterilačního zákroku lze dosáhnout také inaktivace mikrobiálních spor. Vlivem záhřevu na určitou teplotu dochází k denaturaci bílkovin, a proto mohou být inaktivovány také nežádoucí enzymy, ať už mikrobiální či v potravine přirozeně se vyskytují, které mohou negativně ovlivnit vlastnosti daného produktu. Během tepelného zákroku nastává poškození buněčné membrány bakteriálních buněk, dochází k denaturaci DNA, proteinů a ke ztrátě funkčnosti ribozomů. Dostatečným záhřevem mohou být inaktivovány i některé termolabilní mikrobiální toxiny (Doyle, Buchanan, 2013).

Působení vysoké teploty je jedním z vnějších faktorů, které ovlivňují růst a množení mikroorganismů. Pokud teplota prostředí překročí optimální rozsah růstu mikroorganismů, metabolismus a množení mikroorganismů se zpomalí, až úplně ustane. Další zvýšení teploty má na mikrobiální buňku destruktivní účinek, který vede až ke usmrcení buňky. Letální teplota je definována jako minimální teplota, která je schopná usmrtit daný mikroorganismus za určitý čas. Tato teplota je pro různé druhy mikroorganismů rozdílná. Průběh a podmínky termosterilace jsou ovlivněny také počáteční kontaminací, kyselostí a aktivitou vody potraviny. (Doyle, Buchanan, 2013; Kadlec, 2003). Závislost sterilační doby na sterilační teplotě zobrazuje diagram letality mikroorganismů (obrázek 2).

Tepelný záhřev za účelem inaktivace mikrobioty potravin lze dle zvolených podmínek zákroku rozdělit na pasteraci a sterilaci. Pasteraci se rozumí tepelné ošetření, které umožňuje devitalizaci vegetativních forem mikroorganismů. Oproti tomu při sterilaci se používají teploty vyšší, zpravidla nad 100 °C, a kromě vegetativních forem dochází k inaktivaci také většiny bakteriálních spor. Sterilační teplotou 120 °C a vyšší se konzervují zejména nekyselé potraviny (Kadlec, 2003; Vinnikova et al., 2019).



Obrázek 2: Termoinaktivační křivky mikrorganismů pro kyselé potraviny (upraveno dle Konzervářství, 2024)

(A – mikrobiota kyselých potravin, B – bakterie kyselých potravin, C – oxidoreduktázy ovoce, E – *Byssochlamys spectabilis*)

Konzervy – masné výrobky

Maso a masné výrobky jsou příznivým prostředím pro rozvoj a dlouhodobé přežívání řady mikroorganismů způsobujících kažení či patogenních mikroorganismů schopných vyvolat onemocnění člověka. Mikroorganismy mohou primárně kontaminovat maso či sekundárně kontaminovat masný výrobek během zpracování (Vinnikova et al., 2019).

Dle Vyhlášky č. 69/2016 Sb. je konzerva definována jako sterilovaný výrobek, neprodyšně uzavřený v obalu. Konzervy musí být tepelně ošetřeny ve všech částech na teplotu, jejíž účinky odpovídají účinkům teploty +121 °C působící po dobu nejméně 10 minut (Vyhláška č. 69/2016 Sb.).

Pro sterilaci nekyselých konzerv se nejčastěji používají autoklávy. Jedná se o tlakové nádoby, ve kterých díky přetlaku lze dosáhnout sterilační teploty vyšší než 100 °C. Sterilátory mohou pracovat kontinuálně či vsádkově (Kadlec, 2003).

Při sterilaci konzerv nedosahujeme absolutní sterility, avšak jedná se o sterilitu obchodní, která zaručuje snížení kontaminace na úroveň zaručující zdravotní nezávadnost produktu po dobu jeho trvanlivosti. Při obchodní sterilitě je dosaženo stavu, při kterém jsou potraviny zbaveny mikroorganismů schopných rozmnožování za běžných podmínek skladování a také životaschopných mikrobiálních buněk nebo spor, které mají význam pro veřejné zdraví. Cílem termosterilace konzervy je snížit riziko jejího znehodnocení na určitou mez. (Doyle, Buchanan, 2013).

3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ RŮST A MNOŽENÍ MIKROORGANIZMŮ

Mikroorganismy jsou živé mikroskopické organizmy, které zahrnují bakterie, viry, kvasinky, plísně, řasy a prvoky. Všechny tyto mikroorganismy hrají v ekosystémech či jiných organizmech určitou roli, která může být jak žádoucí, tak nežádoucí. Mikroorganismy využívají z potravin živiny jako např. bílkoviny, cukry, minerální látky aj., jejichž rozkladem následně získávají energii pro svůj růst. (Erkmen, Bozoglu, 2016).

3.1 Bakteriální růst

Mikrobiální růst je autokatalytický proces. Růst a množení mikroorganismů nenastane, pokud nebude přítomná alespoň jedna životaschopná buňka. Rychlost růstu se pak s množstvím životaschopné biomasy zvyšuje (Adams, Moss, 2008).

Rychlost růstu u bakterií a charakteristiky mikrobiální populace lze určovat přímým zjišťováním počtu buněk zejména metodami počítání na miskách anebo nepřímou detekcí počtu buněk, a to např. měřením vytvořeného zákalu. Růst bakteriálních populací můžeme jednoduše zjišťovat pomocí růstové křivky (obrázek 3). Růstová křivka znázorňuje závislost množství vzniklých buněk $\log x$ na čase (Erkmen, Bozoglu, 2016). Obvykle se růstová křivka skládá ze 4 hlavních růstových fází: lag fáze, logaritmická fáze (exponenciální), stacionární fáze a fáze odumírání (Adams, Moss, 2008). Jednotlivé růstové fáze jsou popsány v následujících podkapitolách.

3.1.1 Lag fáze

Lag fáze neboli adaptační fáze je charakterizována tím, že dochází k přizpůsobení mikrobiálních buněk na prostředí tím, že zahajují syntézu enzymů, dochází k replikaci chromozomů a plazmidů atd. Buňky opravují jakákoliv poškození, která byla způsobena např. zmrazením, sušením či záhřevem. (Adams, Moss, 2008). Buňky se v této přípravné fázi nemnoží a populace tak nepřibývá. Udává se, že délka lag fáze závisí mimo jiné na počtu buněk, kdy s rostoucím počtem buněk klesá délka lag fáze. Doba lag fáze je závislá také na teplotě, dostupnosti živin a na dalších růstových faktorech (Erkmen, Bozoglu, 2016).

3.1.2 Exponenciální fáze

Po lag fázi nejdříve následuje pomalé navyšování počtu buněk, tato fáze se nazývá fáze zrychleného růstu. V tomto stadiu se množí pouze některé buňky. Množení buněk následně

zrychluje až do fáze exponenciálního růstu, kdy dochází k binárnímu dělení již u všech buněk, a proto je růst a množení v této fázi nejrychlejší (Erkmen, Bozoglu, 2016). Během buněčného dělení vznikají z 1 buňky celkem 2 buňky dceřiné, po uplynutí další doby zdvojnásobení je celkový počet buněk 4, po dalším následujícím zdvojení se zvýší na 8 atd. Rychlost nárůstu i celkový počet buněk se tedy s každým dalším zdvojnásobením v čase zdvojnásobí. Generační doba je charakterizována jako doba potřebná k rozdělení jedné bakteriální buňky na buňky dvě. V rámci bakteriálních druhů i kmenů existuje jistá diverzita a rychlost růstu, stejně tak i generační doba se u jednotlivých zástupců liší. Tento fakt je důležitý zejména pro rozvoj metod konzervace potravin. Bakteriální buňka s generační dobou 20 minut rostoucí v potravině je schopná během 8 hodin vyprodukovat populaci vyšší než 10^7 buněk. Avšak nutno podotknout, že generační doba mikroorganismů je v potravinových systémech obvykle delší než při kultivaci v živných médiích při pokusech *in vitro* (Erkmen, Bozoglu, 2016).

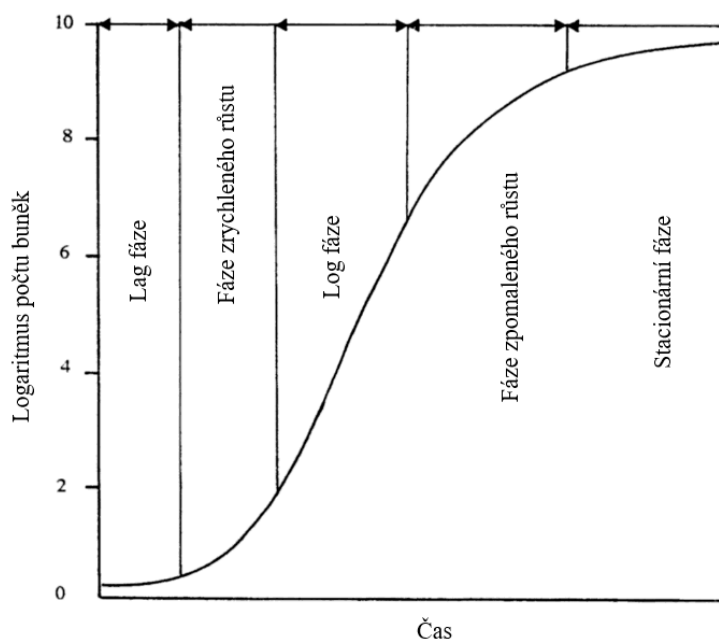
Konec fáze exponenciálního růstu nastává při vyčerpání klíčových živin nebo může dojít k akumulaci metabolitů, které inhibují růst mikrobů. Význam exponenciálního růstu tak není třeba zdůrazňovat a situaci ještě navíc komplikuje fakt, že mikrobiota potravin se pravděpodobně v žádném případě neskládá z jediné čisté kultury (Adams, Moss, 2008).

Na konci logaritmické fáze je rychlost růstu zpomalována. Tato fáze se nazývá také jako fáze zpomaleného růstu. Dochází k vyčerpávání živin v potravině a hromadění toxických metabolitů, které růst mikrobů inhibují (Adams, Moss, 2008).

3.1.3 Stacionární fáze

Fáze, která následuje po fázi exponenciální, a při které se počet buněk nemění, je označována jako fáze stacionární. Po vyčerpání všech živin nastává fáze odumírání buněk, kdy dochází k úbytku populace. Rychlost odumírání pak závisí mimo jiné také na odolnosti buněk vůči nepříznivým podmínkám prostředí (Erkmen, Bozoglu, 2016).

Stádium, kdy buňky i nadále odolávají a přežívají v nepříznivých podmínkách prostředí, se nazývá fáze kryptického růstu. V této fázi mohou mikrobiální buňky měnit svůj tvar, může docházet k větvení buňky či pozměnění buněčné struktury, např. může dojít ke ztrátě buněčné stěny (Erkmen, Bozoglu, 2016).



Obrázek 3: Růstová křivka (upraveno dle Adams, Moss, 2008)

3.2 Faktory ovlivňující růst a množení mikroorganismů

Mikrobiální růst v potravinách je ovlivněn vnitřními a vnějšími faktory, které zároveň určují povahu kažení, druhy změn či případná zdravotní nebezpečí. Tyto faktory lze rozdělit celkem do 4 skupin: vnitřní faktory (fyzikálně-chemické) projevující se zejména při zpracování potravin, vnější faktory úzce související s podmínkami skladovacího prostředí dané potraviny, implicitní faktory (vlastnosti a interakce mikroorganismů) a faktory procesní, mezi které patří např. fyzikální úpravy potravin (Erkmen, Bozoglu, 2016).

3.2.1 Vnitřní faktory

Jak již bylo zmíněno výše, vnitřní faktory úzce souvisí se složením potraviny a projevují se při jejich zpracování. Mezi vnitřní faktory ovlivňující rozvoj mikrobů patří zejména složení potraviny, aktivita vody, aktivní kyselost a pufrací kapacita, redoxní potenciál, přirozeně se vyskytující antimikrobiální látky a další (Adams et al., 2016).

3.2.1.1 Dostupnost živin

Potravinové složky jsou mikroorganismy využívány jako zdroj živin a energie. Jsou zároveň zdrojem esenciálních makronutrientů a mikronutrientů, které si mikrobiální buňky nedokážou syntetizovat. Přítomnost a koncentrace klíčových látek do jisté míry určuje rychlost mikrobiálního růstu. Většina mikroorganismů potřebuje pro svůj růst kromě

základních živin i vitaminy. Obecně platí, že grampozitivní bakterie jsou na potřebu vitaminů náročnější než gramnegativní bakterie či plísně (Adams et al., 2016).

3.2.1.2 Aktivita vody

Základním faktorem určujícím skladovatelnost produktu je aktivita vody. Voda je považována za jeden z nejdůležitějších parametrů při konzervaci potravin. Koncept vodní aktivity je znám již více než 100 let (Shams et al., 2022).

Aktivita vody je termodynamická vlastnost a je definována jako poměr tlaku vodní páry v potravinovém systému k tlaku nasycené vodní páry rozpouštědla při určité teplotě, viz rovnice 1 (Syamaladevi et al., 2016).

$$a_w = \frac{p}{p_0}$$

Rovnice 1: Vztah pro definici aktivity vody (upraveno dle Montville et al., 2012)

(a_w – aktivita vody, p – tenze vodních par nad potravinou, p_0 – tenze vodních par nad čistou vodou)

Hodnoty a_w se pohybují od 0 pro suché potraviny do 1,0 pro destilovanou vodu (Barbosa-Canovas et al., 2020). Vliv aktivity vody na rozvoj různých druhů mikroorganismů se často liší a jednotlivé mikroorganismy jsou charakterizovány limitními hodnotami a_w , při kterých jsou ještě schopny růstu. Dle hodnoty aktivity vody lze potraviny rozdělit do 3 skupin. Potraviny s vysokým obsahem vody mají hodnotu $a_w > 0,90$. Z konkrétních produktů se jedná o mléko, maso, ryby, sýry čerstvé ovoce nebo čerstvou zeleninu. Jsou-li jiné faktory prostředí příznivé, pak tyto komodity poskytují velmi vhodné prostředí pro růst a množení mikrobů. Aktivita vody středně vlhkých potravin, jako jsou např. rozinky, džemy, marmelády, některé uzeniny a sirupy, se pohybuje v rozmezí 0,65 až 0,90. Hodnota a_w 0,90 a nižší znemožňuje růst většiny patogenních mikroorganismů, neosmofilní kvasinky jsou inhibovány při a_w nižším než 0,88 a některé plísně při a_w 0,75 a nižším. U suchých potravin, jako jsou sušenky, sušené mléko či těstoviny, je $a_w < 0,65$. A_w sušeného ovoce se pohybuje v rozmezí 0,60–0,70. Potraviny s tak nízkou hodnotou a_w nepodporují růst mikroorganismů a vyznačují se dlouhou trvanlivostí (Doyle, Buchanan, 2013; Montville et al., 2012). Minimální hodnoty a_w nezbytné pro růst mikroorganismů jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2: Minimální hodnoty a_w pro růst mikroorganismů (upraveno dle Montville et al., 2012)

Skupina mikroorganismů	Minimální hodnota a_w (-)
Většina bakterií	0,91–0,88
Většina kvasinek	0,88
Některé plísně	0,80
Halofilní bakterie	0,75
Xerotolerantní plísně	0,71
Xerofilní plísně a osmofilní kvasinky	0,62–0,60

Gramnegativní bakterie jako např. *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. jsou méně odolné vůči nízkým hodnotám a_w . Většina zástupců vyžaduje pro svůj růst alespoň a_w 0,96. Grampozitivní nesporulující bakterie jsou méně senzitivní k nízkým hodnotám a_w , spousta zástupců *Lactobacillaceae* roste při a_w 0,94. Někteří zástupci z čeledi *Micrococcaceae* jsou schopni růst i při hodnotách nižších než a_w 0,90. Někteří zástupci rodu *Staphylococcus* spp. rostou při minimální hodnotě a_w 0,86; nicméně toxiny tvoří až při a_w 0,93 a vyšší. Růst většiny sporulujících bakterií je inhibován při hodnotách nižších než a_w 0,93. Minimální a_w pro germinaci spor *Clostridium perfringens* je v rozmezí 0,95 až 0,97. Nejvíce odolné vůči nízkým hodnotám a_w jsou xerofilní plísně či osmofilní kvasinky, které jsou schopny růstu při a_w 0,60 a nižším. (Montville et al., 2012).

Existuje celá řada postupů, jak snížit aktivitu vody v potravině. Nejběžnějším postupem odstraňování vody z potravin je sušení. Ke snížení aktivity vody a omezení dostupnosti volné vody pro mikrobiální růst jsou do potravin přidávány osmoticky aktivních látky, mezi které patří např. cukr a sůl (Doyle, Buchanan, 2013).

Vodní aktivita je přímo ovlivňována relativní vlhkostí vzduchu. Pokud je relativní vzdušná vlhkost příliš vysoká, může dojít ke zvýšení vlhkosti v suchých potravinách na úroveň, která umožní pomnožení mikroorganismů (Adams et al., 2016).

3.2.1.3 pH prostředí

Aktivní kyselost, neboli pH, je definována jako záporný dekadický logaritmus vodíkových iontů. Koncentrace vodíkových iontů v prostředí významně ovlivňuje stabilitu enzymů a také metabolismus mikroorganismů. Většina bakteriálních buněk je schopná růstu v neutrálním až mírně kyselém prostředí (pH kolem 6,0–8,0). Existují však bakterie, které jsou schopny snášet i kyselejší prostředí (pH kolem 5,0) jako např. bakterie mléčného

kvašení. Optimální pH pro růst kvasinek je v rozmezí 4,6–6,0. Plísňe jsou schopny růst v prostředí, kde se pH pohybuje kolem 3,5–4,0 (Adams et al., 2016).

Tabulka 3 ukazuje přibližné rozmezí pH některých vybraných potravin. Přirozená kyselost potravin, zejména u ovoce a zeleniny, může chránit pletiva před mikrobiální degradací (Grumezescu, 2017).

Tabulka 3: Rozmezí pH u vybraných potravin (upraveno dle Montville et al., 2012)

Potravina	Rozmezí pH (-)
Mléčné výrobky (jourt, máslo, mléko)	3,8–6,5
Maso (hovězí, kuřecí)	5,1–6,4
Ryby a měkkýši (tuňák, losos, krabi)	4,8–7,0
Ovoce (jablko, banán, limeta, pomeranč)	1,8–6,7

3.2.1.4 Redoxní potenciál

Mikroorganismy vykazují různou míru citlivosti k redoxnímu potenciálu prostředí neboli hodnotě E_h . V každém prostředí se vyskytují oxidační a redukční činidla a vzniká tak určité napětí zvané oxidačně redukční potenciál. Hodnotu E_h ovlivňuje mimo jiné složení potravin, přídavek antioxidantů, jako je např. kyselina askorbová, určité zpracování potravin či podmínky skladování (Grumezescu, Holban, 2018).

Mikroby mají různý vztah ke kyslíku a tím i rozdílné požadavky na redoxní potenciál. Striktně aerobní či obligátně aerobní mikroorganismy vyžadují kladné hodnoty redoxního potenciálu. Tyto mikroorganismy potřebují pro svůj růst kyslík a budou tak převládat na površích potravin vystavených vzduchu nebo všude tam kde je vzduch dostupný. Zatímco anaerobní mikroorganismy mají tendenci růst při velmi nízkých až negativních hodnotách redoxního potenciálu v prostředí bez přístupu kyslíku. Fakultativně anaerobní buňky pak mohou růst v prostředí s kladným i záporným redoxním potenciálem (Grumezescu, 2017). Anaerobní metabolismus poskytuje nižší energetický výtěžek než metabolismus aerobní. (Adams et al., 2016).

3.2.2 Vnější faktory

Vnější faktory úzce souvisejí s podmínkami skladování a uchování potravin. K těmto faktorům patří např. teplota, relativní vzdušná vlhkost, složení atmosféry obalu a další (Erkmen, Bozoglu, 2016).

3.2.2.1 Teplota

Mikrobiální růst může probíhat v teplotním rozmezí zhruba od -8 °C do 100 °C. Každý mikroorganismus má definovaný teplotní rozsah, ve kterém může růst, přičemž je definována teplota minimální, optimální a maximální. Při minimální teplotě daný druh je už schopen růstu. Pokles pod tuto hraniční teplotu má za následek zpomalování metabolismu buňky, enzymatických reakcí a snížení fluidity cytoplazmatické membrány. Teplota optimální je teplota, při které je schopnost růstu buněk nejvyšší. Maximální teplota představuje horní hranici, při jejímž překročení může dojít až k denaturaci buněčných součástí (Grumezescu, Holban, 2018).

Termostabilita mikroorganismů je zpravidla spojená s optimální teplotou jejich růstu a mezidruhově se liší. Nejméně odolné vůči záhřevu jsou mikroorganismy psychrofilní, poté mezofilní a nejodolnější jsou termofilní. Mezi termostabilní mikroorganismy patří bakterie tvořící spóry (Vinnikova et al., 2019). Tabulka 4 shrnuje kategorie mikroorganismů dle jejich teplotního rozmezí růstu.

Tabulka 4: Kategorie mikroorganismů dle jejich teplotního rozmezí růstu (upraveno dle Adams et al., 2016)

Kategorie mikroorganismů	Teplota (°C)		
	Minimální	Optimální	Maximální
Termofilní	40–45	55–75	60–90
Mezofilní	5–15	30–40	40–47
Psychrofilní	-5 až +5	12–15	15–20
Psychrotrofní	-5 až +5	25–30	30–35

3.2.2.2 Složení atmosféry prostředí

Přítomnost kyslíku a jeho vliv na redoxní potenciál jsou důležitými aspekty pro mikrobiální růst. Dle nároků na kyslík můžeme mikroorganismy dělit na: aerobní, fakultativně anaerobní anaerobní a mikroaerofilní (Adams et al., 2016).

Řízení atmosféry se uplatňuje zejména při procesu balení potravin do obalů a také v rámci jejich skladování ve skladovacích prostorech. Správné složení atmosféry v obalu potravin či ve skladovacích prostorech, je klíčové pro udržení její mikrobiální, senzorické a nutriční jakosti (Adams et al., 2016).

3.2.3 Implicitní faktory

Jako třetí skupina faktorů, která je důležitá pro určování povahy mikrobiální asociace nacházející se v potravinách, jsou popsány implicitní faktory. Tyto faktory se zabývají především vlastnostmi samotných mikroorganismů, jejich reakcemi na prostředí, ve kterém se nachází, nebo také jejich vzájemnými interakcemi (Adams, Moss, 2008).

Potraviny většinou obsahují smíšenou populaci mikroorganismů, díky tomu vzniká v potravině konkurenční prostředí. Konkurenceschopnost mikroorganismů pak určuje, který druh bude lépe růst, stane se ve smíšené kultuře dominantním a způsobí tak charakteristické změny v potravině. V závislosti na podmínkách prostředí se některé mikroorganismy stanou převládajícími právě díky optimálním podmínkám pro jejich růst (Erkmen, Bozoglu, 2016).

Mezi mikroorganismy existují různé vztahy. Některé vztahy mohou být prospěšné, jako např. synergický růst, symbióza, nebo komensalizmus. Existují však vztahy, kdy se mikroorganismy vzájemně ovlivňují negativně, např. antagonismus, kompetice o živiny mezi rychle rostoucími a pomalu rostoucími mikroorganismy, či predace (Erkmen, Bozoglu, 2016).

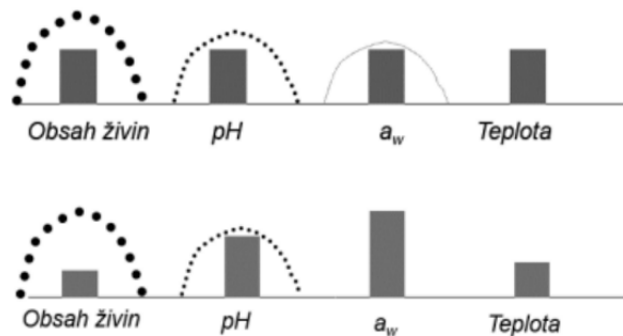
3.2.4 Procesní faktory

Tato skupina faktorů je často zahrnována mezi vnitřní faktory. Mezi procesní faktory patří např. krájení, mytí, tepelná sterilace, ozařování potravin či přidavek konzervantů. Při některých úpravách může docházet k eliminaci části mikrobiální populace. Krájení naopak může způsobit poškození pletiv, a tím se může zvýšit dostupnost živin pro přítomné mikroorganismy (Adams et al., 2016).

3.3 Bariérová teorie

K zabránění růstu a množení mikroorganismů se v současných technologických postupech čím dál častěji používá kombinace několika různých faktorů. Tento postup je označován jako „hurdle“ technologie neboli překážkový efekt, který je znázorněn na obrázku 4. Tato technologie představuje velmi efektivní nástroj pro konzervaci potravin, jelikož se účinky jednotlivých parametrů sčítají. Synergické interakce vedou ke kombinovanému účinku, který je vyšší než účinek jednotlivých překážek aplikovaných samostatně. Význam překážek pak závisí na složení potravin a vlastnostech mikroorganismu (Erkmen, Bozoglu, 2016; Rahman, Leistner, 2020).

Pro konzervaci potravin a inhibici nežádoucích mikroorganismů jedinou konzervační metodou je často za potřebí dosažení vyššího inhibičního účinku. Výhodou překážkového efektu je již zmíněné synergické působení vícero faktorů. To umožní u jednotlivých překážek snížit intenzitu jejich účinku (např. použít nižší teplotu). Bariérová teorie tak poskytuje účinné řešení pro zajištění bezpečnosti potravin za současného zachování velmi dobré organoleptické a nutriční kvality potravin (Onyeaka, Nwabor, 2022).



Obrázek 4: Bariérová teorie (upraveno dle Bariérová teorie, 2016)

3.4 Tvorba biofilmu

Biofilm je struktura tvořená komunitou různých druhů bakterií, která je schopná přilnout k různým biotickým či abiotickým povrchům. Jeho schopností je produkce exopolymerních látek, které ochraňují buňky před vnějším stresem. Buňky jsou díky biofilmu chráněny před účinkem antimikrobiálních činidel, jako např. antibiotik či dezinfekčních látek, a mají také zvýšenou odolnost vůči tepelnému záhřevu. Buňky biofilmu mezi sebou účinně komunikují. Mechanismus komunikace mezi buňkami biofilmu je označován jako *quorum sensing* (QS) (Lim et al., 2017).

Tvorba biofilmu značně komplikuje proces výroby či sanitace v potravinářském průmyslu. Tvoří se na různých površích, včetně výrobních zařízení, která přichází do kontaktu s potravinami, a mohou tak představovat trvalý zdroj kontaminace, včetně kontaminace patogenními mikroorganismy. V biofilmu se mezi buňkami velmi dobře přenáší geny, což může představovat problém při přenosu genů rezistence v rámci buněk biofilmu. Velkým problémem je pak přenos genů rezistence na buňky patogenních druhů (Zhu et al., 2022).

4 VÝSKYT GRAMPOZITIVNÍCH KOKŮ V POTRAVINÁCH NEPODPORUJÍCÍCH MIKROBIÁLNÍ ROZVOJ

4.1 Sušené ovoce

Ovoce je osídlováno různými druhy mikroorganismů již během vegetace. Ty se zde mohou dostat z prostředí pomocí prachu, vzduchu, hmyzu apod. Saprophyté se na povrchu zdravých plodů nemnoží, avšak přežívají až do doby, než se naskytnou vhodné podmínky pro jejich růst, např. při poranění plodů (Ingr, 2007).

Díky vysokému obsahu vody je ovoce vhodným prostředím pro mikrobiální rozvoj nejen bakterií, ale i kvasinek a plísní. U výrobků jako sušené ovoce je častá zejména sekundární kontaminace, kdy mikroorganismy mohou kontaminovat potravinu během jejího zpracování, balení, či skladování a dalších technologických operací, zejména při nedodržování správných výrobních a hygienických postupů (Křivská et al., 2019; Motarjemi et al., 2014). I přes nízký obsah vlhkosti mohou mikroorganismy v sušeném ovoci přežít delší dobu a při vhodných podmínkách může dojít k jejich rozvoji. Vhodné podmínky pro jejich růst mohou nastat při špatných skladovacích podmínkách, např. při kolísavé skladovací teplotě, vlivem které může zejména u balených výrobků docházet ke kondenzaci vody a zvýšení aktivity vody v potravine (Skibsted et al., 2010).

Z důvodu používání nízkých teplot při sublimačním sušení není účinek na snižování počtu příliš významný. Proto se mohou v lyofilizovaném ovoci vyskytovat vyšší počty kontaminujících mikroorganismů než v ovoci sušeném při vyšších teplotách. Navíc zde hraje roli i počáteční kontaminace suroviny, či podmínky, ve kterých je produkt skladován. Lyofilizované ovoce je navíc často baleno do ochranné atmosféry, což představuje nevhodné podmínky pro růst aerobních mikroorganismů. Ale ani při klasickém sušení se nedosahuje tak vysokých teplot, aby byla sušená potravina sterilní. (Křivská et al., 2019).

Na rozdíl od většiny bakterií, které vyžadují a_w vyšší než 0,85, byl u plísní zaznamenán růst i při a_w 0,61 (Křivská et al., 2019). Proto sušené ovoce poskytuje stále vhodné podmínky pro růst xerofilních plísní, např. rodů *Aspergillus* či *Penicillium*, či osmofilních kvasinek. Sušené ovoce může být však kontaminováno i bakteriemi rodů *Staphylococcus*, *Escherichia* či sporulujícími tyčinkami rodu *Bacillus* (ICMSF: Microorganisms in food, 2011; Ntuli et al., 2017; Shah et al., 2022).

Ve vzorcích ovoce sušeného na slunci se mohou vyskytovat patogenní rody *Salmonella* a *Shigella* (Ntuli et al., 2017). Sušené ovoce by mohlo být kontaminováno i dalšími patogenními mikroorganismy, jako např. *Staphylococcus aureus*. Výskyt indikátorových mikroorganismů, jako např. koliformních bakterií rodu *Enterobacteriaceae*, v sušeném ovoci, by mohl poukazovat na nedostatečné hygienické podmínky při zpracování (Křivská et al., 2019).

4.2 Konzervy

Nekyselé sterilované potraviny jsou baleny a skladovány v hermeticky uzavřených nádobách a jsou ošetřovány teplotami vyššími než 100 °C, masové konzervy jsou konzervovány obecně při teplotě 120 °C po dobu minimálně 10 minut. I přes tepelné ošetření však mohou konzervované potraviny podléhat mikrobiálnímu kažení. Příčinou mikrobiálního kažení pak může být kontaminace produktu během zpracování, nedostatečná devitalizace během tepelného ošetření či kontaminace produktu po tepelném ošetření. Nedostatečné tepelné ošetření může být způsobeno zvolením špatných parametrů a podmínek sterilace či příliš vysokou původní kontaminací produktu. Účinek tepelného ošetření je významně ovlivňován kyselostí suroviny (Chekol, Ashenafi, 2009).

Nežádoucí změny mohou způsobit mikroorganismy, které kontaminují konzervu díky poškození či netěsnosti víčka, závadným švům nebo pokud konzerva není po sterilaci co nejrychleji uzavřena a zchlazena. Mezi hlavní mikroorganismy způsobující kažení masových konzerv patří *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (dříve *Clostridium thermosaccharolyticum*), *Clostridium perfringens* či *Geobacillus stearothermophilus*, které díky tvorbě plynu způsobují změny projevující se vydutím víček konzerv neboli bombáže. Dále se v konzervovaných masných výrobcích může vyskytovat *Clostridium botulinum* či *Pseudomonas* spp. (Dikeman, Devine, 2014).

Díky tvorbě termorezistentních spor je *Clostridium botulinum* velkým nebezpečím v souvislosti s konzervami, jelikož anaerobní prostředí konzerv je pro něj vyhovující. Tento patogenní druh je odolný vůči tepelnému ošetření a toxin, který produkuje, je pro člověka smrtelný (Dikeman, Devine, 2014).

4.3 Rod *Staphylococcus*

Stafylokoky patří mezi grampozitivní nesporulující kokovité bakterie patřící do čeledi *Staphylococcaceae*. Dle vztahu ke kyslíku se řadí mezi fakultativní anaeroby. Rod *Staphylococcus* zahrnuje několik desítek druhů, které lze dle produkce koagulázy rozdělit na koaguláza-negativní (KoN) a koaguláza-pozitivní (KoP), které jsou považovány za více patogenní. Ke koaguláza-negativním druhům patří zástupce *S. epidermidis*, který je součástí mikrobioty lidské kůže a sliznic, zároveň se jedná o oportunní patogen a bývá izolován také z půdy či vody a je schopný tvořit biofilm. Do této skupiny patří také *S. warneri*, *S. hominis* a *S. equorum*. Nejvýznamnějším koaguláza-pozitivní patogenním druhem je *S. aureus*, který běžně osídluje lidskou kůži, sliznice a vyskytuje se i ve vzduchu, prachu či vodě (Bennett, Monday, 2003). U tohoto druhu bylo popsáno velké množství faktorů virulence, jako je např. tvorba plazmakoagulázy, proteiny umožňující adhezi k biotickým či abiotickým povrchům a v neposlední řadě tvorba enterotoxinů, díky kterým tento druh představuje významné riziko otravy z potravin (Foster et al., 2014). Stafylokokové enterotoxiny produkované primárně *S. aureus* způsobují závažné alimentární intoxikace také díky tomu, že jsou velmi odolné vůči tepelnému zákroku. Stafylokokové enterotoxiny jsou schopné přežít zahřev na teplotu 121 °C po dobu 28 minut (Sundararaj et al., 2019; Grispoldi et al., 2020).

Z bakteriálních patogenů je *S. aureus* velmi dobře adaptován na prostředí se sníženou hodnotou a_w . Dle Mezinárodní komise pro mikrobiologické specifikace potravin může *S. aureus* za optimálních podmínek růst již při hodnotě a_w nižší než 0,83 (ICMSF, 2024). U většiny potravin je však uváděna minimální hodnota a_w 0,85. Novější prediktivní model ukazuje, že spodní limit a_w pro růst patogenu je ovlivněn mimo jiné i dalším faktorem, kterým je pH prostředí potraviny, které by se pro ideální růst při a_w 0,85 mělo pohybovat kolem hodnoty 7 až 7,5. Rozsah pH pro růst *S. aureus* se však pohybuje v rozmezí 4,5 až 9,0. Kvůli toleranci stafylokoků k nízké hodnotě a_w jsou závažné i stafylokokové intoxikace (Beuchat et al., 2013).

Minimální růstová teplota zástupců rodu *Staphylococcus* je udávána kolem 5 °C. Lze tedy usuzovat, že tyto mikroorganismy porostou i v potravinách skladovaných při chladírenských teplotách. Optimální teplota pro stafylokoky je 37 °C a maximální teplota, při které jsou tyto bakterie ještě schopny růstu, je až 45 °C (Bennett, Monday, 2003).

Potraviny spojené s výskytem stafylokoků jsou především maso a masné výrobky, saláty, čerstvé ovoce, mléčné výrobky a zpracované výrobky, přičemž tyto potraviny mohou být kontaminovány během zpracování, z prostředí výrobní linky nebo díky nedostatečné hygieně pracovníků při porušení správné výrobní či hygienické praxe (Petri et al., 2014). Je známo, že především *S. aureus* a *S. epidermidis* jsou indikátorovými mikroorganismy sekundární kontaminace. Jsou zaznamenány případy výskytu *S. aureus* v sušeném mléce a těstovinách (Bennett, Monday, 2003). Výskyt stafylokoků byl prokázán také v sušeném a lyofilizovaném ovoci. Z těchto potravin nepodporujících mikrobiální rozvoj byly izolovány druhy *S. epidermidis* a *S. aureus* (Křivská et al., 2019).

4.4 Rod *Micrococcus*

Rod *Micrococcus* obsahuje nesporeující grampozitivní aerobní koky patřící do čeledi *Micrococcaceae*. Většina druhů, např. *M. luteus*, se vyskytuje jako součást kožní mikrobioty člověka a zvířat. Jsou také běžnými kontaminanty vzduchu a prachu. Jedná se o poměrně halotolerantní mikroorganismy. Mají schopnost růstu v prostředí s 10 % soli a dokáží přežít poměrně dlouhou dobu v prostředí s nízkou hodnotou a_w (Blackburn, 2006). U *M. luteus* byl prokázán růst při a_w 0,93 a některé izoláty jsou schopné růst v přítomnosti až 15 % soli (Wareing et al., 2010). Optimální teplota růstu se pohybuje v rozmezí 25–37 °C a většina druhů je psychrotrofní. Schopnost růstu si zachovávají i při chladírenských teplotách. Vůči vysokým teplotám jsou zástupci rodu *Micrococcus* poměrně odolní a jsou schopni přežít působení teploty +63 °C po dobu 30 minut. Tento rod není příliš spojován s mikroorganismy způsobujícími kažení, i přes to mohou přispívat k nežádoucím změnám pasterovaných produktů, např. masných či mléčných výrobků (Blackburn, 2006; Hamad, 2012).

Z potravin je nejčastěji izolován druh *M. luteus*, který se vyskytuje mimo jiné na povrchu masa a v masných výrobcích. Tento druh byl izolován také z pasterovaného kravského mléka či pasterovaných vaječných hmot. Ohledně výskytu rodu *Micrococcus* v sušeném ovoci či sterilovaných konzervách mnoho informací zatím nemáme, avšak v pasterovaných produktech s nízkým počtem konkurenčních mikroorganismů mohou být tyto druhy velmi problematické (Wareing et al., 2010).

4.5 Rod *Kocuria*

Rod *Kocuria* byl vyčleněn z rodu *Micrococcus*. V současné době patří do čeledi *Micrococcaceae*. Zahrnuje kokovité grampozitivní aerobní, koaguláza-negativní bakterie s respiratorním typem metabolismu. Výjimku tvoří zástupce *K. kristinae*, který je fakultativně anaerobní (Matoulková et al., 2018). Rod *Kocuria* byl pojmenován po brněnském mikrobiologovi Miloslavu Kocurovi působícím na České sbírce mikroorganismů a k roku 2021 zahrnoval zhruba 26 druhů. Teplotní optimum většiny zástupců rodu *Kocuria* se pohybuje v rozmezí 20–37 °C. Literatura udává, že kmen *K. rhizophila* při teplotě >40 °C již neroste. U některých zástupců toho rodu byla prokázána produkce biofilmu, což má pro potravinářství velký význam. Biofilm může zvyšovat odolnost buněk vůči působení tepla, např. při tepelném ošetření, a podporovat tak perzistenci patogenních mikroorganismů v daném prostředí. (Ramos et al., 2021).

Rod *Kocuria* se vyskytuje jako součást mikrobioty kůže a nosohltanu savců a ptáků a vyskytují se také ve vodě a půdě. Část z nich je klasifikována jako oportunní patogeny, nicméně některé byly zjištěny jako důležité patogeny způsobující různá onemocnění, např. endokarditidu (Ramos et al., 2021).

V poslední době jsou díky přesnějším identifikačním metodám zástupci tohoto rodu izolováni i z potravin. V potravinách jsou přítomni převážně jako komenzálové. Tyto bakterie byly izolovány např. z mléka, mléčných výrobků, mořských plodů a fermentovaných masných výrobků (Ramos et al., 2021). Bakterie rodu *Kocuria* byly izolovány také z pasterovaného piva, kde byly přítomny druhy *K. varians* a *K. kristinae*, které by mohly být původci kažení této potravinářské komodity (Matoulková et al., 2018). Produkce biofilmu, a stejně tak i produkce lipolytických a proteolytických enzymů, u druhů *K. varians* a *K. kristinae* představuje problém nejen pro mlékárenský průmysl. Ve studii Machado et al., 2020 byla zjištěna produkce biofilmu u 31 % *K. varians* izolovaných z pasterovaného mléka. Druhy *K. rhizophila*, *K. palustris* či *K. carniphila* byly nalezeny také ve vzorcích masa (Becker et al., 2008).

4.6 Rod *Rothia*

Rod *Rothia* zahrnuje nesporulující, nepohyblivé, aerobní či fakultativně anaerobní, grampozitivní koky patřící do čeledi *Micrococcaceae*. Vykytují se na sliznicích, v půdě, a pravděpodobně také ve střevním traktu lidí, prasat a hlodavců (Fatahi-Bafghi, 2021). Izolace zástupců tohoto rodu z potravinářských komodit však nebyla doposud hlášena.

Rod zahrnuje mimo jiné také druh *R. amarae*, izolovaný v rámci této práce. Optimální růstová teplota této bakterie je udávána v rozmezí 30 až 37 °C (Fatahi-Bafghi, 2021).

4.7 Rod *Aerococcus*

Zástupci rodu *Aerococcus* jsou grampozitivní fakultativně anaerobní či aerobní koky charakteristické mléčným kvašením. Patří do čeledi *Aerococcaceae* a jsou charakteristické růstem v prostředí s 40 % žluči (IFIS, 2009). Jedná se o mezofilní bakterie s rozsahem růstu 22 až 37 °C, při 45 °C již bakterie nerostou (Williams et al., 1953).

Z potravin jako např. ryby či z fermentované potraviny byl izolován druh *Aerococcus viridans*. Běžně se zástupci rodu *Aerococcus* vyskytují ve vzduchu a prachu a jsou nejčastěji izolováni převážně z klinického materiálu. Většina druhů je klasifikována jako lidské patogeny způsobující širokou škálu onemocnění (Mohan et al., 2017). Bakterie mléčného kvašení *A. viridans* byla nalezena také v sýrech a uzeninách (Deak, Farkas, 2013).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo vypracovat literární rešerši zabývající se výskytem mikroorganismů v potravinách mikrobiologicky nerizikových, které neposkytují vhodné podmínky pro jejich rozvoj. Práce se zaměřovala na grampozitivní koky a na faktory, které by mohly ovlivňovat jejich růst a množení.

Cílem experimentální části bylo izolovat z mikrobiologicky nerizikových potravin grampozitivní koky a následně je identifikovat za pomoci metody MALDI-TOF a následně i za pomoci metody sekvenace části genu 16S rRNA.

Dalším cílem byla charakterizace určitých vlastností izolovaných grampozitivních koků *in vitro*. V rámci charakterizace mělo být u vybraných grampozitivních koků provedeno:

- sledování růstu při různých kultivačních teplotách,
- zkoumání tvorby biofilmu,
- skrínink citlivosti na antibiotika a
- kvalitativní detekce genů kódujících antibiotickou rezistenci.

6 POUŽITÝ MATERIÁL

6.1 Testované bakteriální izoláty

Pro experiment bylo použito 29 bakteriálních kultur izolovaných ze vzorků sušeného ovoce ($n = 5$) a lyofilizovaného ovoce ($n = 18$) získaných z potravinářských laboratoří FT Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně a dále z modelových vzorků sterilovaných masových pomazánek s přidavkem hydrokoloidů ($n = 6$) vyrobených pod vedením prof. Buňky, Ing. Pětovou v Laboratoři výzkumu jakosti a bezpečnosti potravin na Katedře logistiky Fakulty vojenského leadershipu Univerzity obrany Brno. Izolaci bakterií ze sušeného ovoce provedla v rámci své bakalářské práce Bc. Sandra Labudová, z masových pomazánek v rámci probíhající studie Ing. Ivana Huňová. Pro úplnost práce jsou vzorky sušeného a lyofilizovaného ovoce, ze kterých byly kultury izolovány shrnuty v tabulce 5.

Tabulka 5: Testované vzorky sušeného a lyofilizovaného ovoce

č. vzorku	Vzorek	Úprava		č. vzorku	Vzorek	Úprava	
		Sušení	Lyofil.			Sušení	Lyofil.
1	Kiwi		x	16	Banán. plátky		x
2	Kiwi	x		17	Brusinky		x
3	Pitaya		x	18	Borůvky		x
4	Pitaya	x		19	Švestky		x
5	Banán	x		20	Borůvky	x	
6	Banán		x	21	Borůvky		x
7	Ananas		x	22	Jablko	x	
8	Ananas	x		23	Švestky		x
9	Mango		x	24	Švestky	x	
10	Mango	x		25	Jablko		x
11	Maliny		x	26	Meruňka		x
12	Jahody		x	27	Meruňka	x	
13	Višeň		x	28	Hrušky		x
14	Mango		x	29	Hrušky	x	
15	Jablečné plátky	x					

6.2 Kultivační média

V této práci byla použita kultivační média od společnosti HiMedia® (Indie). Seznam použitých kultivačních médií je uveden v tabulce 6. Kultivační média ve formě dehydratovaných práškových směsí byla připravována do lahví se šroubovacím uzávěrem, navážky byly zvoleny dle návodu na obale daných produktů. Navážka práškové směsi byla

dokonale rozpuštěna v daném množství destilované vody. Následně byla takto připravená média sterilována v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Sterilizované kultivační médium bylo poté rozlito za aseptických podmínek do Petriho misek. Půdy byly ponechány ve vodorovné poloze až do jejich zatuhnutí. V případě přípravy bujonů byl objem lahve pipetován dávkovačem do zkumavek po 4,5 ml, zkumavky byla uzavřeny víčky a následně sterilovány v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut.

Tabulka 6: Seznam použitých kultivačních médií

Kultivační médium	Zkratka	Výrobce	Použití
Brain Heart Infusion Broth	BHI	Himedia (Indie)	kultivace
Nutrient Broth	N	Himedia (Indie)	kultivace
Müller-Hinton agar	MHA	Himedia (Indie)	difuzní disková metoda

6.3 Chemikálie a roztoky

- Etanol 96%
- Destilovaná voda
- Krystalová violet'
- Lugolův roztok
- Safranin
- Fyziologický roztok (Navážka 4,3 g chloridu sodného byla důkladně rozpuštěna v 500 ml destilované vody. Následovala sterilace v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut)
- Komerční izolační kit DNeasy® Blood and Tissue Kit 250 (Qiagen, Německo)
- PBS pufr (Lonza, Švýcarsko)
- Forward primer FD1 (Metabion international AG, Německo)
- Reverse primer RD1 (Metabion international AG, Německo)
- Specifické primery (Metabion international, Německo), (viz tabulka 11)
- Sterilní PCR voda
- Go Taq® G2 Hot Start Green Master Mix (Promega corp., USA)
- VWR Red Taq 2x Master Mix (VWR International, USA)

- 1x TAE pufr (Tris-acetát-EDTA)
- 50x TAE pufr (Tris-acetát-EDTA)
- Red gel barvivo (etidumbromid, 5 mg/ml)
- Agaróza (SeaKem® LE, Lonza, Švýcarsko)
- 100 bp Plus DNA Ladder (ČR)
- SPRIselect (Beckman Coulter, USA)
- Etanol 86%

6.4 Antimikrobiální látky

U izolovaných grampozitivních koků byla testována citlivost na antimikrobiální látky. Pro testování citlivosti byla použita komerčně vyráběná antibiotika v podobě papírových disků o průměru 6 mm od společnosti HiMedia® (Indie). Antibiotika vybraná pro testování jsou uvedena v tabulce 7. Volba antibiotik byla provedena na základě doporučeného výběru dle EUCAST (Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti).

Tabulka 7: Seznam použitých antimikrobiálních látek

Skupina	Antimikrobiální látka	Zkratka antimikrobiální látky	Koncentrace (µg/disk)
Peniciliny	penicilin-G	P	(10 units)
	ampicilin/sulbactam	A/S	10/10
	amoxicilin	AMX	10
Cefalosporiny	cefotaxim	CTX ³⁰	30
	cefazolin	CZ	30
Fluorochinolony	levofloxacin	LE	5
	ciprofloxacin	CIP	5
	norfloxacin	NX	5
Aminoglykosidy	amikacin	AK	30
	gentamicin	HLG	120
	tobramycin	TOB	10
	streptomycin	HLS	300
Linkosamidy	klindamycin	CD	2
Makrolidová ATB	erytromycin	E	5
Rifamyciny	rifampicin	RIF	5
Tetracykliny	tetracyklin	TE	10
	doxycyklin	DO ³⁰	30
Nitrofurany	nitrofurantoin	NIT	300
Amfenikoly	chloramfenikol	C ³⁰	30
Glykopeptidy	vankomycin	VA	10

6.5 Pomůcky a přístroje

- Automatické jednobáňové a vícebáňové pipety (Eppendorf®, Německo), sterilní špičky, pinzety a bakteriologické kličky, podložní sklíčka
- Nitrilové rukavice
- Laboratorní sklo: kádinky, skleněné lahve se šroubovacím uzávěrem, Erlenmayerova baňka, zkumavky
- Sterilní eppendorfkové mikrozukavky (Eppendorf®, Německo)
- Sterilní skleněné Petriho misky (Ø 90 mm)
- Sterilní plastové Petriho misky (Ø 60 mm, Anicrin, Itálie)
- Sterilní plastové Petriho misky (Ø 90 mm, Anicrin, Itálie)
- Sterilní PCR mikrozukavky ve stripech s víčky (Eppendorf®, Německo)
- Elektroforetická vanička, hřebínky, silikonové těsnění
- Sterilní 96jamkové mikrotitrační destičky s víčky (GAMA®, ČR)
- Magnetická destička (SPRI Plate 384, Beckman Coulter, USA)
- Sterilní 50ml plastové zkumavky (TubeSPin® Bioreactor, TPP, Švýcarsko)
- Sterilní 15ml zkumavky se zátkou do DensiLametri (GAMA®, ČR)

Z přístrojového vybavení bylo použito:

- Centrifuga (MiniSpin Plus, Eppendorf®, Německo)
- Mikrocentrifuga (Z100M, Hermle, Německo)
- Stomacher (Stomacher® 400, Seward Limited, UK)
- Termoblok (Bio TDP-100, BioSan, Lotyšsko)
- Vortex Mixer (VX-200, Labnet, USA)
- Bio vortex V1 (Biosan, Lotyšsko)
- Destičkový spektrofotometr (Tecan Infinite M200 PRO, Tecan, Švýcarsko)
- Laminární box (SCS Evo II-4, MERCI®, ČR)
- Dekontaminační PCR box (Aura PCR, BioAir®, Itálie)

- Mikrovlnná trouba (Electrolux, Švédsko)
- Chladnička (Beko, Turecko)
- Binokulární mikroskop (Olympus SM 44, Japonsko)
- PCR termocykler (Aeris™, ESCO®, Singapur)
- Horizontální elektroforetická vana s víkem (Multi SUB, Cleaver scientific, UK)
- Zdroj stejnosměrného elektrického proudu (Consort EV243, Belgie)
- UV transiluminátor (Syngene InGenius LHR2, Indie)
- Osobní biorekator (RTS – 1C, Biosan, Lotyšsko)
- Denzitometr (Densi-La-Meter®, ČR)
- Biologický termostat (Mettler, Německo)
- Biologický termostat (BT 120, ČSR)
- Laboratorní autokláv (Tuttnauer, Izrael)

7 METODIKA

Experimentální část byla vypracována v laboratoři mikrobiologie na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí na FT Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. V rámci této diplomové práce byly izolované grampozitivní koky z potravin identifikovány a následně byly zkoumány jejich vlastnosti *in vitro*. V rámci charakterizace izolovaných mikroorganismů byl sledován jejich růst za použití různé teploty kultivace, byla zkoumána tvorba biofilmu, dále byl proveden skrínink citlivosti na antibiotika a kvalitativní detekce genů kódujících antibiotickou rezistenci.

7.1 Izolace grampozitivních koků z potravin

Pro experiment byly použity grampozitivní koky izolované Bc. Sandrou Labudovou v rámci její bakalářské práce. Nicméně pro úplnost práce je zde postup izolace mikroorganismů popsán. Mikroorganismy byly izolovány ze vzorků sušeného a lyofilizovaného ovoce a masových pomazánek. Potravinové matrice, ze kterých byly jednotlivé mikroorganismy izolovány, jsou uvedeny v kapitole 6.1.

Do sterilních lahví bylo naváženo vždy 5 g vzorku. K navážce bylo přidáno devítinásobné množství sterilního fyziologického roztoku. Po uzavření lahví následovala důkladná homogenizace na třepače po dobu 10 minut. Poté byla suspenze za aseptických podmínek naředěna desítkovým ředěním tak, že do zkumavky s 4,5 ml sterilního fyziologického roztoku bylo pipetováno vždy 0,5 ml výchozí suspenze nebo příslušného ředění. Zkumavka byla promíchána pomocí vortexu. Tímto způsobem byla připravena celkem 4 ředění. Jednotlivá ředění byla očkovaná na pevná živná média (PCA) metodou roztěru, kdy za aseptických podmínek byl do každé misky pipetováno 100 μ l suspenze s následným roztěrem sterilní hokejkou. Zaočkované plotny byly kultivovány při 30 ± 1 °C po dobu 24 až 48 hodin.

7.2 Identifikace grampozitivních koků

U izolovaných bakteriálních kultur byla nejprve získána čistá kultura opakovaným přeočkováním na BHI agar pomocí křížového roztěru. Pomocí Gramova barvení s následnou mikroskopií byla provedena kontrola čistoty kultury. Izolované grampozitivní koky byly následně identifikovány metodou MALDI-TOF a také pomocí molekulárně-biologické metody PCR s následnou sekvenací části genu pro 16S rRNA.

7.2.1 Gramovo barvení

Pro zjištění čistoty kultury byly vzorky barveny dle Grama a následně byly podrobeny mikroskopické analýze.

Z kolonie narostlé na BHI agaru bylo kličkou odebráno přiměřené množství biomasy a následně bylo resuspendováno v kapce fyziologického roztoku na odmaštěném podložním sklíčku s následným rozetřením. Po zaschnutí nátěru byl preparát fixován protažením nad plamenem. Poté následovala aplikace barvicích roztoků v přesně daném pořadí. Byla nanesena krystalová violet a ponechána působit 60 sekund. Preparát byl převrstven Lugolovým roztokem a ponechán působit 60 sekund. Následovalo vymývání acetonem po dobu nejdéle 20 sekund, poté byl preparát důkladně opláchnut destilovanou vodou, obarven safraninem (60 sekund) a opět následoval oplach destilovanou vodou. Takto zhotovený preparát byl jemně osušen a prohlížen v mikroskopu pod imerzním objektivem.

7.2.2 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Pro identifikaci izolovaných gram pozitivních koků byla použita hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry).

K přípravě vzorků byly použity čisté 24hodinové bakteriální kultury narostlé na BHI agaru. Z kultury byl sterilní kličkou odebrán pelet, který byl resuspendován ve 150 μ l sterilní destilované vody v eppendorfkové mikrozkušavce. Poté bylo ke směsi přidáno 450 μ l 96% etanolu a promícháno. Vzorky bakteriálních kultur byly zaslány na Slovenskou poľnohospodárskou univerzitu v Nitre do Výskumného centra AgroBioTech, kde proběhla identifikace metodou MALDI-TOF za asistence prof. Ing. Miroslavy Kačániové, Ph.D.

7.2.3 Sekvence genu pro 16S rRNA

Identifikace izolovaných gram pozitivních koků byla provedena také pomocí molekulárně-biologické metody PCR s následnou sekvenací genu pro 16S rRNA.

Pro sekvenační analýzu byla nejprve z bakteriálních kultur izolována DNA. Následně byl pomocí metody PCR amplifikován specifický úsek DNA. Přítomnost PCR produktu byla detekována pomocí agarózové elektroforézy, poté byl PCR produkt purifikován za účelem zvýšení čistoty pro následnou analýzu sekvenováním.

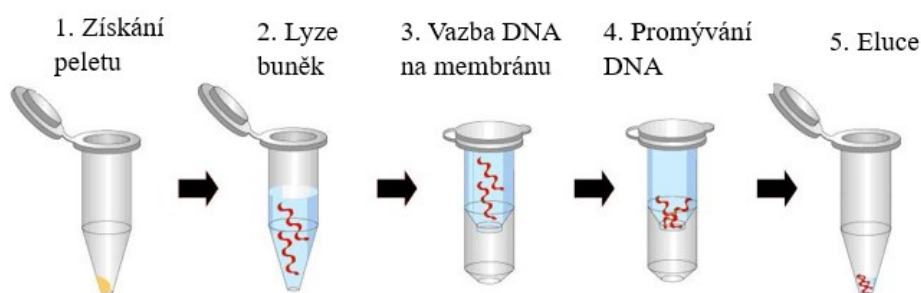
7.2.3.1 Kultivace bakterií

Mikroorganismy byly po dobu experimentu uchovávány na miskách s BHI agarem. Vybrané kolonie byly očkované na misky s BHI agarem a byly kultivovány za aerobních podmínek při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Pro další kultivaci bakteriálních kultur byl použit BHI bujon. Pomocí bakteriologické kličky byly kultury očkované z misky do BHI bujonu a inkubovány za aerobních podmínek při 37 °C po dobu 24 hodin.

7.2.3.2 Izolace bakteriální DNA

Z testovaných bakteriálních kultur byla izolována DNA pomocí komerčního kitu pro rychlou extrakci (DNeasy Blood & Tissue Kit, 2023). Postup izolace DNA pomocí komerčního kitu je znázorněn na obrázku 5.

Do eppendorfkové mikrozkušavky bylo napipetováno 1,5 ml 24hodinové kultury. Obsah byl odstředěn pomocí centrifugy (14500 ot. /min, 3 minuty). Supernatant byl opatrně slitý tak, aby nebyl odstraněn pelet. Případný zbytek supernatantu byl opatrně odpipetován. Pelet byl resuspendován ve 200 µl PBS pufru a směs byla promíchána pomocí vortexu. Ke směsi bylo přidáno 20 µl proteinázy K a 200 µl AL pufru. Po důkladném promíchání pomocí vortexu byly zkumavky umístěny do termobloku (56 °C) na dobu 10 minut. Ke směsi bylo následně přidáno 200 µl 96% etanolu a opět byl obsah důkladně promíchán. Celý objem zkumavky byl pipetován na kolonku s membránou. Poté následovalo odstředění v centrifuze (8000 ot. /min., 1 minuta). Spodní sběrná kolonka byla vylita do odpadu a umístěna zpět pod kolonku. Následovalo promytí 500 µl AW1 pufru, odstředění (8000 ot. /min., 1 minuta), vylití sběrné kolonky a promytí 500 µl AW2 pufru, opět odstředění (14500 ot. /min., 3 minuty) a vylití sběrné kolonky. Pod kolonku byla umístěna sterilní 1,5ml eppendorfková zkumavka. Eluce byla provedena pomocí 100 µl AE pufru, který byl pipetován na střed kolonky, tak aby se špička pipety nedotkla membrány. Kolonka byla ponechána 10 minut při pokojové teplotě. Nakonec byla kolonka opět odstředěna (8000 ot. /min., 1 minuta). Kapalina s DNA byla jímána do sterilní 1,5ml eppendorfkové zkumavky (DNeasy Blood & Tissue Kit, 2023).



Obrázek 5: Postup izolace DNA pomocí kitu (upraveno dle DNeasy Blood & Tissue Kit, 2023)

U izolované DNA byla zjištěna koncentrace a čistota pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200 PRO (Tecan, Švýcarsko). Na spektrofotometrickou destičku byly pipetovány 2 μ l AE pufru (blank) a po změření absorbance a očištění destičky etanolem byly pipetovány 2 μ l vzorku. Tímto bylo dosaženo změření absorbance vzorků oproti blanku. Absorbance byla měřena při vlnové délce 260 nm a 280 nm.

7.2.3.3 *Polymerázová řetězová reakce (PCR)*

Pro amplifikaci požadovaného specifického úseku DNA byla provedena PCR za použití templátové DNA izolované v předchozím kroku (kapitola 7.2.3.2). Amplifikací byl získán PCR produkt, který byl použitý pro další analýzu.

Koncentrované primery RD1 a FD1 byly naředěny sterilní PCR vodou v poměru 1:3 (1 díl primeru: 3 díly sterilní PCR vody) do 1,5ml eppendorfkové zkumavky a obsah byl důkladně promíchán pomocí vortexu.

Pro každou PCR reakci byla připravena PCR směs o objemu 20 μ l. Nejdříve byla sestavena směs společných reakčních komponent tzv. „master-mix“. Množství jednotlivých komponent pro 1 reakci byla vynásobena počtem vzorků, včetně negativní kontroly a rezervy. Tímto bylo zjištěno celkové množství připravované reakční směsi a množství jednotlivých komponent pro všechny PCR reakce. Společné reakční složky pro 1 PCR reakci jsou shrnuty v tabulce 8.

Tabulka 8: Společné reakční komponenty pro amplifikaci jednoho vzorku DNA určené k sekvenaci

Reakční složka	Množství (μl)
Go Taq® G2 Hot Start Green Master Mix	10
Sterilní PCR voda	7
Reverse primer RD1	1
Forward primer FD1	1

Všechny společné reakční komponenty byly uchovávány v mrazničce. Po vytažení z mrazničky byly komponenty ponechány při pokojové teplotě, aby došlo k jejich rozmrazení. DNA uchovávaná při mrazírenských teplotách byla taktéž ponechána při pokojové teplotě. Jednotlivé reakční komponenty byly před pipetováním řádně promíchány pomocí vortexu. Poté byly pipetovány do eppendorfkové zkumavky v pořadí dle tabulky 8. Během pipetování byly dodržovány zásady aseptické práce tak, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků. Příprava vzorků na PCR byla provedena v aseptickém prostředí dekontaminačního PCR boxu.

Připravená směs byla promíchána pomocí vortexu a rozpipetována po 19 μl do sterilních PCR mikrozkuvek spojených do stripů. K připravené směsi byl napipetován 1 μl templátové DNA. Negativní kontrola byla připravena bez DNA matrice. Vzorky byly následně odstředěny pomocí mikrocentrifugy a umístěny do PCR termocyklu. Poté byl nastaven program PCR. Průběh PCR je uveden v tabulce 9. Po ukončení PCR byly vzorky uchovávány v PCR termocyklu při 4 °C až do jejich další analýzy.

Tabulka 9: Zvolený program pro amplifikaci DNA určené k sekvenaci

Sled reakcí	Teplota (°C)	Doba trvání (min)
Denaturace (Hot start)	95	3
35 cyklů:		
Denaturace	95	0,5
Annealing	63	0,5
Extenze	72	1,5
Po proběhnutí všech cyklů:		
Závěrečná extenze	72	6
Uchování vzorků	4	neomezeně

7.2.3.4 Agarózová elektroforéza

Pomocí agarózové elektroforézy byla provedena vizualizace PCR amplifikovaného produktu.

Pro detekci PCR produktu byl připraven 1,5% agarózový gel. Gel byl připraven navážením 1,5 g agarózy do Erlenmayerovy baňky a rozpuštěním navážky ve 100 ml 1x koncentrovaného TAE pufru. Po rozpuštění byl roztok agarózy rozvařen v mikrovlnné troubě a po ochlazení přibližně na 60 °C bylo přidáno pár kapek etidiumbromidu (fluorescenční barvivo Red gel). Etidiumbromid byl v roztoku důkladně rozmíchán. Roztok byl nalitý do předem připravené vaničky s hřebínkem a byl ponechán při pokojové teplotě až do jeho zatuhnutí. Případné bublinky byly odstraněny pomocí sterilní špičky. Poté byl z gelu opatrně vyjmut hřebínek. Gel byl přemístěn do elektroforetické vany, tak aby komůrky byly umístěny u záporné katody pro zajištění migrace záporně nabitá DNA ke kladně nabitá anodě. Gel byl převrstven 1x koncentrovaným TAE pufrem tak, aby hladina pufru byla 1 až 2 mm nad povrchem gelu.

Do komůrek gelu byly automatickou pipetou nanášeny 3 µl srovnávacího markeru (100 bp Plus DNA Ladder), následně vždy 4 µl vzorku s amplifikovaným produktem včetně vzorku negativní kontroly (bez DNA matrice). Poté byla elektroforetická vana přikryta víkem a připojena ke zdroji elektrického stejnosměrného proudu. Elektroforetická separace probíhala při 90 V, 300 mA, 50 W po dobu 60 minut. Po ukončení elektroforézy byl gel opatrně přemístěn do UV-transiluminátoru (Syngene InGenius LHR2, Indie), kde byl nasvícen UV lampou a zdokumentován.

7.2.3.5 Purifikace DNA

Vzorky s amplifikovanými úseky DNA získané pomocí metody PCR byly následně purifikovány za účelem zvýšení čistoty. Purifikací byly odstraněny případné nespecifické produkty či zbylé PCR komponenty, jako např. primery, nenavázané oligonukleotidy apod. Purifikace byla provedena za použití roztoku s magnetickými kuličkami SPRIselect (SPRIselect User Guide, 2012).

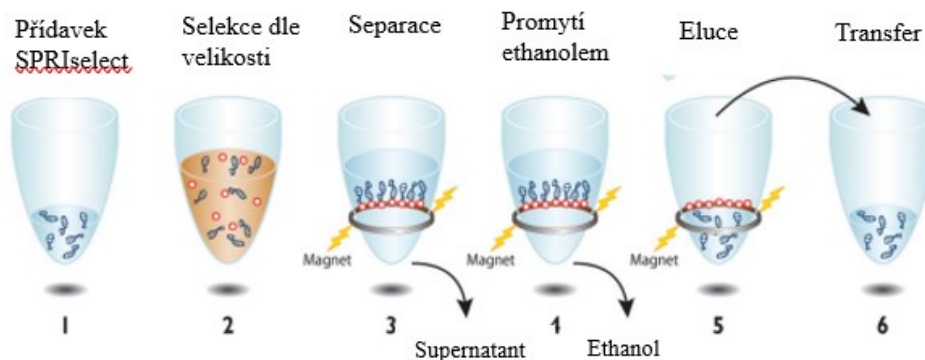
K PCR produktům v PCR mikrozkuvkách bylo přidáno vždy 15 µl roztoku SPRIselect (roztok s magnetickými kuličkami) a celý objem mikrozkuvky byl pipetován do 96jamkové mikrotitrační destičky. Mikrotitrační destička byla umístěna na magnetickou destičku SPRI Plate (Beckman) a byla ponechána při pokojové teplotě asi 10 minut, kdy byly magnetické kuličky s DNA navázány na magnet destičky (obrázek 6). Po uplynuté době

byl opatrně odpipetován supernatant, tak aby nebyl odebrán roztok magnetických kuliček s navázanou DNA. Poté bylo do jamek destičky pipetováno 180 μ l 86% etanolu. Destička byla ponechána při pokojové teplotě 10 minut. Po opatrném odpipetování etanolu byla destička umístěna na termoblok a vysoušena při 60 °C po dobu 10 minut. DNA byla důkladně rozpuštěna v 30 μ l sterilní PCR vody a následně byla destička umístěna opět na magnetickou destičku, dokud kapalina uvnitř jamek nebyla zcela vyčreňná. Čirá kapalina s DNA byla pipetována do čistých sterilních PCR mikrozkušavek (SPRIselect User Guide, 2012). Postup purifikace je znázorněn na obrázku 7.



Obrázek 6: Krok purifikace DNA za použití SPRIselect

Následovalo měření koncentrace a čistoty DNA pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200 PRO. Na spektrofotometrickou destičku byly pipetovány 2 μ l sterilní PCR vody a po změření absorbance a očištění destičky etanolem byly pipetovány 2 μ l vzorku, čímž bylo dosaženo změření absorbance vzorků oproti blanku (sterilní PCR voda). Měření probíhalo při vlnové délce 260 nm a 280 nm.



Obrázek 7: Postup purifikace DNA pomocí SPRIselect (upraveno dle SPRIselect User Guide, 2012)

7.2.3.6 *Sekvenace a úprava chromatogramů*

Vzorky DNA, které byly v předchozím kroku přečištěny, byly zaslány na sekvenaci. Sekvenaci provedla firma SEQme s.r.o. (Dobříš). Získané chromatogramy byla následně upraveny do formátu FASTA pomocí softwaru DNA Baser Assembler (Automatic DNA Sequence Assembler). Úpravou bylo umožněno porovnávat nukleotidové sekvence jednotlivých vzorků s mezinárodní databází sekvencí U.S. National Library of Medicine dle algoritmu BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool).

7.3 Charakterizace izolovaných grampozitivních koků

U izolovaných a identifikovaných grampozitivních koků byla následně provedena série experimentů s cílem charakterizace jejich vybraných vlastností. U grampozitivních koků bylo sledováno chování v závislosti na vnějších faktorech. V rámci analýzy byl sledován růst bakteriálních kultur v závislosti na různých teplotních podmínkách. Dále byla zkoumána schopnost tvorby biofilmu a také byl proveden test rezistence k antibiotikům, včetně detekce genů kódující tuto rezistenci.

7.3.1 Sledování růstu grampozitivních koků

U vybraných izolátů byl sledován růst v závislosti na teplotě kultivace. Kultivace probíhala v záznamnicích růstu (RTS-1C Bioreactor, Biosan) při teplotách 25 °C, 30 °C a 40 °C. Inkubace trvala různě dlouhou dobu v závislosti na růstu daného mikroorganismu, minimálně však 24 hodin. Postup analýzy byl zvolen dle doporučení výrobce bioreaktoru Biosan (RTS-1C Personal Bioreactor, 2018).

Pro analýzu bylo nejdříve provedeno pomožení mikroorganismů v BHI bujonu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Do sterilních 50ml plastových zkumavek (TubeSPin®, Bioreactor) bylo za aseptických podmínek pipetováno vždy 30 ml nutrient bujonu. Následně bylo pipetováno 50 µl narostlé bakteriální suspenze, která byla před pipetováním důkladně promíchána pomocí vortexu. Každou testovanou kulturou byly paralelně očkované vždy dvě zkumavky. Zkumavky byly důkladně uzavřeny víčky s membránovými filtry propustnými pro plyny k zajištění aerobní kultivace očkovaných mikroorganismů. Kultivace mikroorganismů byla provedena v bioreaktorech (RTS-1C Bioreactor, Biosan) s patentovanou technologií míchání buněčné suspenze Reverse-Spin®. Pomocí propojeného softwaru RTS control program (verze 2.7.4.3) byly navoleny parametry kultivace. Parametry kultivace jsou shrnuty v tabulce 10.

Tabulka 10: Parametry kultivace testovaných kmenů v RTS-bioreaktoru

Parametr	
Interval měření (min)	30
Počet otáček RPM ($\text{ot}/\text{min}^{-1}$)	2000
Teplota kultivace ($^{\circ}\text{C}$)	25/30/45
Objem vzorku (včetně kultivačního média) (ml)	30
Frekvence reverzních otáček (s^{-1})	1

Přístroj prováděl po dobu kultivace měření optické hustoty (OD) ve zvolených časových intervalech. Měření probíhalo při vlnové délce 850 nm za pomoci NIR světelné diody. Na základě změny optické hustoty bakteriální suspenze v průběhu kultivace byly následně sestrojeny růstové křivky.

7.3.2 Skrínink antibiotické rezistence u grampozitivních koků

Izoláty byly testovány na rezistenci k vybraným antimikrobiálním látkám. Fenotypový skrínink byl proveden pomocí difuzní diskové metody, v souladu s platnou standardizovanou difuzní diskovou metodou dle EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing); (EUCAST, 2023).

U bakteriálních izolátů byla testována rezistence k celkem 20 antibiotikům. Pro experiment byla použita antibiotika v podobě papírových disků o průměru 6 mm od společnosti Himedia®. Seznam antibiotik vybraných pro testování je uveden v kapitole 6.4.

Pro analýzu bylo provedeno pomnožení mikroorganismů v nutrient bujonu při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin. Následovala příprava bakteriální suspenze o zákalu 0,5 McFarland odpovídající přibližnému počtu buněk $1,5\text{--}2\cdot 10^8$ CFU/ml. Výchozí suspenze byla pipetována do sterilních 15ml zkumavek určených pro DensiLametr (GAMA®) a byla ředěna sterilním fyziologickým roztokem na požadovaný zákal. Zákal byl měřen pomocí denzitometru (DensiLameter, GAMA®).

Na plotnu s MH agarem byl za aseptických podmínek očkovan 1 ml naředěné suspenze s následným rozlitím po povrchu média. Inokulum bylo rozlito krouživými pohyby misky tak, aby bylo rozmístěno po celém jejím povrchu. Po zaschnutí inokula byly na povrch média sterilní pinzetou podkládány papírové disky napuštěné příslušnými antibiotiky (obrázek 8). Misky byly kultivovány při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 ± 2 hodin.



Obrázek 8: Aplikace antibiotických disků na zaočkované plotně s MH agarem (vlevo), komerční antibiotické disky (vpravo)

Po uplynulé době kultivace byly oproti tmavému pozadí měřeny průměry inhibičních zón vytvořené v okolí antibiotického disku. Citlivost k testovaným antibiotikům byla posuzována dle referenčních limitních hodnot stanovených metodikou EUCAST (EUCAST, 2023).

V práci byly použity referenční hodnoty určené pro hodnocení citlivosti na antibiotika u zástupců rodu *Staphylococcus*. Stejné referenční hodnoty byly použity i pro vyhodnocení citlivosti na antibiotika u příbuzných rodů grampozitivních koků *Micrococcus*, *Kocuria* a *Rothia*, jelikož pro tyto rody zatím nejsou definovány referenční hodnoty, dle kterých by bylo možné posuzovat citlivost k antibiotikům (Savini et al., 2010).

7.3.3 Identifikace přítomnosti genů antibiotické rezistence

Pomocí metody PCR byla provedena kvalitativní detekce vybraných genů kódujících rezistenci k antimikrobiálním látkám. Analýza zahrnovala výběr vhodných primerů, optimalizaci metody, včetně zjištění optimální teploty nasedání vybraných primerů pomocí PCR v teplotním gradientu. Amplifikace genů u jednotlivých vzorků byla provedena pomocí klasické PCR metody. Vzniklý PCR produkt byl vizualizován pomocí agarózové elektroforézy v 1,5% agarózovém gelu.

Pro analýzu byla použita izolovaná templátová DNA (kapitola 7.2.3.2). Vybrané specifické primery jsou shrnuty v tabulce 11. Primery byly nejprve naředěny příslušným objemem PCR vody dle příbalového letáku na koncentraci 100 μM , důkladně promíchány pomocí vortexu a ponechány při teplotě 65 $^{\circ}\text{C}$ v termobloku po dobu 10 minut. Takto připravené zásobní

roztoky primerů byly naředěny na pracovní koncentraci 10 μ M smícháním vždy 90 μ l sterilní PCR vody a 10 μ l příslušného zásobního roztoku primeru.

Tabulka 11: Sekvence primerů vybraných genů antibiotické rezistence, očekávané velikosti amplifikovaných produktů a použitá teplota annealingu (Duran et al., 2012)

Gen	Sekvence (5'-3')	Velikost produktu (bp)	Annealingová teplota (°C)
<i>blaZ</i>	ACTTCAAC ACCTGCTGCTTTC	173	54
	TGACCACTTTTATCAGCAACC		
<i>norAI</i>	GCACATCAAATAACGCACCT	230	55
	ATATTCAGTTGTTGTCTTAATAT		
<i>aph(3')-IIIa</i>	AAATACCGCTGCGTA	242	54
	CATACTCTTCCGAGCAA		
<i>erm(A)</i>	AAG CGG TAA ACC CCT CTGA	190	54
	TTC GCA AAT CCC TTC TCA AC		
<i>erm(B)</i>	CTATCTGATTGTTGAAGA AGGATT	142	54
	GTTTACTCTTGGTTTAGGATGAAA		
<i>erm(C)</i>	AAT CGT CAA TTC CTG CAT GT	299	54
	TAA TCG TGG AAT ACG GGT TTG		
<i>tet(K)</i>	GTA GCG ACA ATA GGT AAT AGT	360	54
	GTA GTG ACA ATAAAC CTC CTA		
<i>cat</i>	CCT GCC ACT CAT CGC AGT	623	58
	CCA CCG TTG ATA TAT CCC		

Pro PCR byla připravena reakční směs se specifickou dvojicí primerů. Pro každou jednu PCR reakci byla připravena PCR směs o objemu 25 μ l, která obsahovala 12,5 μ l VWR Red Taq 2x Master Mixu, 10,5 μ l PCR vody, 0,5 μ l reverse primeru, 0,5 μ l forward primeru a 1 μ l templátové DNA. V 1,5ml zkumavce byly smíchány nejprve společné komponenty (Master mix, PCR voda, primery). Připravená směs byla rozpipetována po 24 μ l do PCR zkumavek a k této směsi byl přidán 1 μ l templátové DNA. Zvolený program PCR je uveden v tabulce 12.

Tabulka 12: Zvolený program PCR pro amplifikaci úseků genů antibiotické rezistence

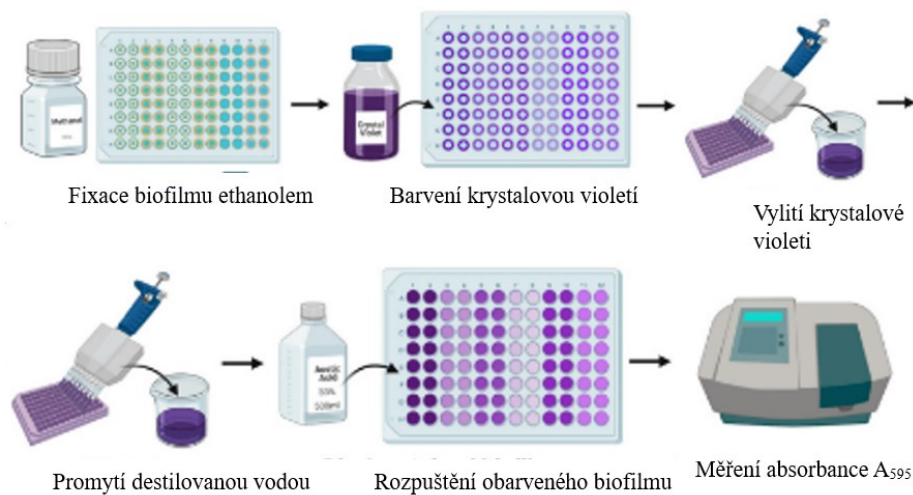
Sled reakcí	Teplota (°C)	Doba trvání (min)
Denaturace (Hot start)	95	3
35 cyklů:		
Denaturace	95	0,5
Annealing	viz tabulka 11	0,5
Extenze	72	1,0
Po proběhnutí všech cyklů:		
Závěrečná extenze	72	10

Po amplifikaci byly PCR produkty vizualizovány pomocí agarózové elektroforézy v 1,5% agarózovém gelu postupem popsáním v kapitole 7.2.3.4.

7.3.4 Stanovení schopnosti tvorby biofilmu Christensenovou metodou

U izolovaných grampozitivních koků byla dále zjišťována schopnost tvorby biofilmu. Pro průkaz tvorby biofilmu byla zvolena modifikovaná Christensenova metoda za použití polystyrenové 96jamkové mikrotitrační destičky. Postup metody je znázorněn na obrázku 9. Metoda využívá schopnosti adherence buněk biofilmu na stěny mikrotitrační destičky. Tyto buňky jsou v dalších krocích obarveny krystalovou violetí a uvolněny etanolem. Intenzita zbarvení roztoku je následně měřena spektrofotometricky (Pleva et al., 2022).

V rámci metody byla nejprve provedena kultivace mikroorganismů v BHI bujonu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Do jamek sterilní polystyrenové 96jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno 200 µl BHI bujonu a 10 µl narostlé bakteriální suspenze. Každý mikroorganismus byl testován vždy ve 3 opakováních. Paralelně se vzorky byla připravena i negativní kontrola sestávající z bujonu bez zaočkování bakteriální kulturou. Destička byla inkubována při 37 °C po dobu 48 hodin. Po uplynutí doby inkubace byl obsah jamek vylit. Pro odstranění planktonických buněk byly jamky 2x promyty destilovanou vodou. Zbytek vody byl odstraněn opatrným vyklepnutím na ubrousek. V dalším kroku byl biofilm fixován 200 µl 96% etanolu. Po slítí etanolu a vysušení jamek, byly vzorky obarveny 200 µl krystalové violeti. Destička byla ponechána 20 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby byl obsah jamek opět vylit. Jamky byly několikrát promyty destilovanou vodou. Po posledním promytí byla navázaná krystalová violet' rozpuštěna v 200 µl 96% etanolu. Intenzita zbarvení roztoku je přímo úměrná množství vzniklého biofilmu (Pleva et al., 2022).



Obrázek 9: Postup Christensenovy metody v mikrotitrační destičce pro stanovení tvorby biofilmu (upraveno dle Campo-Pérez et al., 2023)

Následně byla měřena absorbance pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200 PRO (Tecan, Švýcarsko). Absorbance byla měřena při 595 nm. Každý vzorek byl testován ve 3 opakováních. Z hodnot absorbancí vzorků a absorbancí negativních kontrol (A_{NK}) byly vypočítány průměrné hodnoty absorbance. Odečtením zprůměrovaných hodnot od průměrné hodnoty negativní kontroly byla získána výsledná hodnota absorbance A_{595} . Mezní hodnota pro biofilmpozitivitu, tzv. cut-off value (CV), byla vypočítána jako součet trojnásobku směrodatné odchylky negativní kontroly a průměrné hodnoty absorbance negativní kontroly (Pleva et al., 2022).

Na základě zjištěné limitní hodnoty byly izoláty rozděleny do tří skupin:

- netvořící biofilm ($A_{595} \leq CV$),
- slabě tvořící biofilm ($CV < A_{595} < 2CV$),
- intenzivně tvořící biofilm ($A_{595} > 2CV$).

8 VÝSLEDKY

8.1 Identifikace bakteriálních izolátů

Identifikace izolátů byla provedena pomocí metody MALDI-TOF a metody sekvenace genu pro 16S rRNA. Postup metody MALDI-TOF byl popsán v kapitole 7.2.2 a postup metody sekvenace byl popsán v kapitole 7.2.3.

Ze vzorků sterilované masové pomazánky bylo izolováno a identifikováno celkem 6 grampozitivních koků, přičemž se jednalo o tyto druhy: *Staphylococcus epidermidis* (n = 1), *Staphylococcus hominis* (n = 2), *Micrococcus luteus* (n = 2), *Kocuria rhizophila* (n = 1).

Z ovoce sušeného horkým vzduchem bylo identifikováno 5 izolátů: *Staphylococcus warneri* (n = 1), *Staphylococcus aureus* (n = 1), *Staphylococcus hominis* (n = 1), *Kocuria rhizophila* (n = 1) a *Kocuria palustris* (n = 1).

Z lyofilizovaného ovoce bylo identifikováno celkem 18 izolátů: *Staphylococcus warneri* (n = 2), *Staphylococcus epidermidis* (n = 2), *Staphylococcus aureus* (n = 4), *Staphylococcus equorum* (n = 1), *Aerococcus viridans* (n = 1), *Kocuria kristinae* (n = 3), *Kocuria rhizophila* (n = 2), *Rothia amarae* (n = 1) a *Micrococcus luteus* (n = 2).

8.1.1 MALDI-TOF

Přesnost identifikace metodou MALDI-TOF se odvíjela od skóre, které se pohybovalo v rozmezí 0 až 3. Nulová hodnota poukazovala na neshodu, přičemž hodnota 3 představovala velmi přesnou identifikaci. Čím vyšší byla tedy hodnota skóre, tím vyšší byla také pravděpodobnost správné identifikace. Hodnoty skóre vyšší než 2 bylo možné pokládat za pravděpodobné. Rozmezí skóre a míra přesnosti identifikace jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13: Interpretace výsledků MALDI-TOF

Skóre	Přesnost identifikace
2,300 – 3,000	vysoká pravděpodobnost identifikace druhu
2,000 – 2,299	jistá identifikace rodu, pravděpodobná identifikace druhu
1,700 – 1,999	pravděpodobná identifikace rodu
0,000 – 1,699	nespolehlivá identifikace

Hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF bylo na úrovni rodu spolehlivě identifikováno 16 bakteriálních kmenů. Celkem 13 bakteriálních kmenů bylo identifikováno s pravděpodobným určením rodu. Dosažená hodnota skóre se pohybovala nad hodnotou 1,700, což značí, že nespolehlivě nebyl identifikován žádný izolát. Výsledky identifikace metodou MALDI-TOF a dosažené skóre jsou shrnuty v tabulce 14.

Tabulka 14: Výsledky identifikace izolovaných kmenů metodou MALDI-TOF

Kód vzorku	Potravinová matrice	Identifikovaný izolát	Skóre
D1	masová pomazánka	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,768
11G	lyofilizované maliny	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,960
6E	lyofilizovaný banán	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,993
E2	masová pomazánka	<i>Staphylococcus hominis</i>	1,756
J1	masová pomazánka	<i>Staphylococcus hominis</i>	1,986
22C	sušené jablko	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,080
22B	sušené jablko	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,130
25A	lyofilizované jablko	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,076
9E	lyofilizované mango	<i>Rothia amarae</i>	1,867
14D	lyofilizované mango	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,004
14E	lyofilizované mango	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,835
4J	sušená pitaya	<i>Staphylococcus warneri</i>	2,159
9I	lyofilizované mango	<i>Staphylococcus warneri</i>	1,871
1D	lyofilizované kiwi	<i>Staphylococcus warneri</i>	1,927
6A	lyofilizovaný banán	<i>Staphylococcus equorum</i>	2,268
6B	lyofilizovaný banán	<i>Aerococcus viridans</i>	2,048
E6	masová pomazánka	<i>Micrococcus luteus</i>	2,211
F2	masová pomazánka	<i>Micrococcus luteus</i>	1,879
1P	lyofilizované kiwi	<i>Micrococcus luteus</i>	2,261
14H	lyofilizované mango	<i>Micrococcus luteus</i>	2,248
9B	lyofilizované mango	<i>Kocuria kristinae</i>	2,266
9F	lyofilizované mango	<i>Kocuria kristinae</i>	2,141
1C	lyofilizované kiwi	<i>Kocuria kristinae</i>	2,149
4K	sušená pitaya	<i>Kocuria kristinae</i>	2,216
4Q	sušená pitaya	<i>Kocuria palustris</i>	1,963
F1	masová pomazánka	<i>Kocuria rhizophila</i>	2,078
12B	lyofilizované jahody	<i>Kocuria rhizophila</i>	1,853
9H	lyofilizované mango	<i>Kocuria rhizophila</i>	2,149
9G	lyofilizované mango	<i>Rothia amarae</i>	1,863

Zeleně je označena jistá identifikace rodu a pravděpodobná identifikace druhu; žlutě je označena pravděpodobná identifikace rodu

8.1.2 Sekvence 16S rRNA

Sekvenací bylo na úrovni druhu spolehlivě identifikováno 29 izolovaných grampozitivních koků. U většiny izolátů byla pravděpodobnost identifikace nad hodnotou 99 %, což lze považovat za velmi pravděpodobný výsledek identifikace (tabulka 15).

Tabulka 15: Výsledky identifikace izolovaných kmenů metodou sekvenace

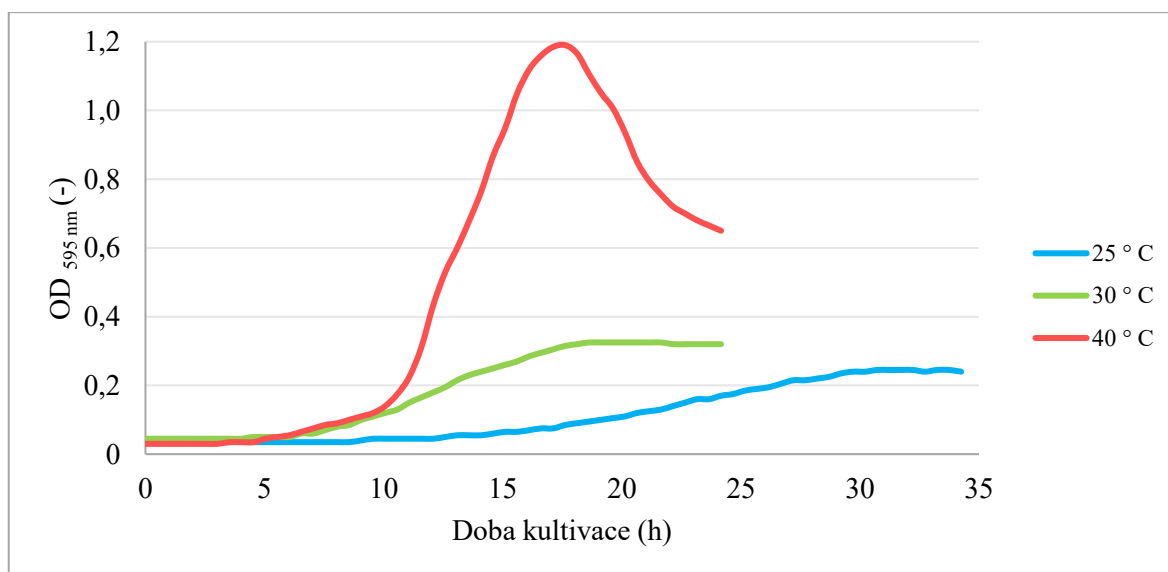
Kód vzorku	Potravinová matrice	Identifikovaný izolát	Shoda (%)
D1	masová pomazánka	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98,0
11G	lyofilizované maliny	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,6
6E	lyofilizovaný banán	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98,8
E2	masová pomazánka	<i>Staphylococcus hominis</i>	99,4
J1	masová pomazánka	<i>Staphylococcus hominis</i>	99,5
22C	sušené jablko	<i>Staphylococcus hominis</i>	99,4
22B	sušené jablko	<i>Staphylococcus aureus</i>	98,9
25A	lyofilizované jablko	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,4
9E	lyofilizované mango	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,7
14D	lyofilizované mango	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,4
14E	lyofilizované mango	<i>Staphylococcus aureus</i>	99,3
4J	sušená pitaya	<i>Staphylococcus warneri</i>	99,4
9I	lyofilizované mango	<i>Staphylococcus warneri</i>	99,9
1D	lyofilizované kiwi	<i>Staphylococcus warneri</i>	99,6
6A	lyofilizovaný banán	<i>Staphylococcus equorum</i>	98,6
6B	lyofilizovaný banán	<i>Aerococcus viridans</i>	99,4
E6	masová pomazánka	<i>Micrococcus luteus</i>	99,6
F2	masová pomazánka	<i>Micrococcus luteus</i>	99,5
1P	lyofilizované kiwi	<i>Micrococcus luteus</i>	99,5
14H	lyofilizované mango	<i>Micrococcus luteus</i>	99,8
9B	lyofilizované mango	<i>Kocuria kristinae</i>	99,5
9F	lyofilizované mango	<i>Kocuria kristinae</i>	99,7
1C	lyofilizované kiwi	<i>Kocuria kristinae</i>	99,0
4K	sušená pitaya	<i>Kocuria kristinae</i>	99,7
4Q	sušená pitaya	<i>Kocuria palustris</i>	95,0
F1	masová pomazánka	<i>Kocuria rhizophila</i>	99,3
12B	lyofilizované jahody	<i>Kocuria rhizophila</i>	99,9
9H	lyofilizované mango	<i>Kocuria rhizophila</i>	99,5
9G	lyofilizované mango	<i>Rothia amarae</i>	99,6

Zeleně je označena vysoká pravděpodobnost správné druhové identifikace; žlutě je označena menší pravděpodobnost správné druhové identifikace

Pouze u vzorku 9E došlo k rozdílné identifikaci ve srovnání s metodou MALDI-TOF. Metodou MALDI-TOF byl tento vzorek identifikován jako *Rothia amarae* a metodou sekvenace byl identifikován jako *Staphylococcus aureus*. U vzorku 4Q byla zjištěna shoda pouze 95 %, avšak kmen byl identifikován oběma metodami jako bakterie *Kocuria palustris*.

8.2 Sledování růstu grampozitivních koků

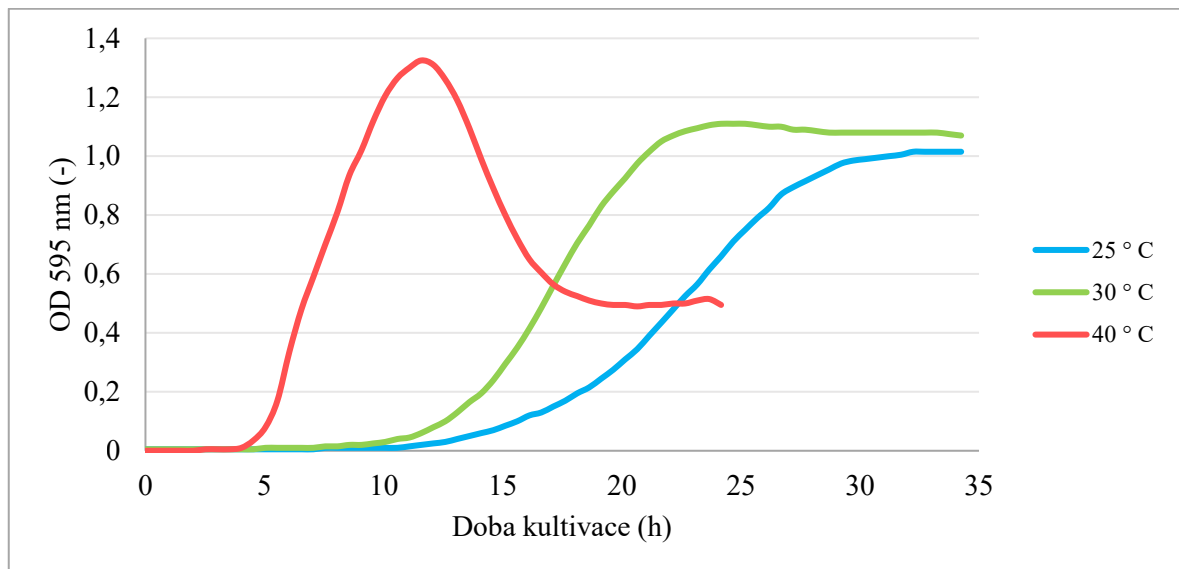
U vybraných bakteriálních izolátů byl sledován růst při teplotách 25 °C, 30 °C a 40 °C. Postup analýzy byl popsán v kapitole 7.3.1. Pro analýzu byly vybrány následující bakteriální kmeny: *Staphylococcus epidermidis* D1, *Staphylococcus hominis* J1, *Staphylococcus aureus* 22B, *Staphylococcus warneri* 4J, *Staphylococcus equorum* 6A, *Aerococcus viridans* 6B, *Micrococcus luteus* F2, *Kocuria kristinae* 9B, *Kocuria rhizophila* F1, *Kocuria palustris* 4Q a *Rothia amarae* 9G. Výsledky schopnosti růstu bakteriálních kultur při daných teplotách jsou zpracovány do podoby grafů znázorňujících závislost optické hustoty na době kultivace. Pro každou teplotu byla paralelně se vzorkem zhotovena i kontrola.



Obrázek 10: Růst *Staphylococcus epidermidis* D1 izolovaného z masové pomazánky při různých teplotách

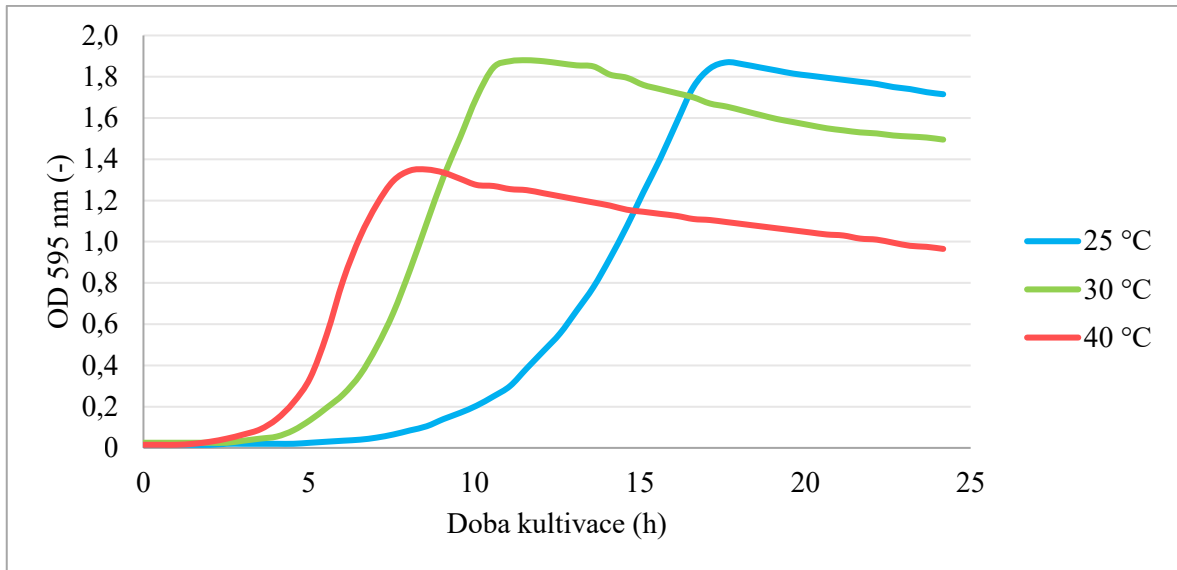
Na obrázku 10 je zobrazen průběh růstové křivky u *Staphylococcus epidermidis* D1 izolovaného z masové pomazánky. Lag fáze u tohoto kmene byla nejkratší při teplotě 40 °C a trvala 5 hodin, následovala strmá log fáze, která dosáhla vrcholu kolem 17. hodiny kultivace při OD 1,20 a následně se fáze překlenula do stacionární fáze. Nejdelší lag fáze byla pozorována při teplotě 25 °C v délce 15 hodin a následná log fáze, jejíž vrchol nastal

kolem 31. hodiny kultivace. Při teplotě 25 °C bylo zároveň dosaženo nejnižšího maxima hodnoty optické hustoty (OD), které se pohybovalo kolem 0,25. Z grafu je tedy patrné, že schopnost růstu při 25 °C byla velmi nízká. Lag fáze při teplotě 30 °C trvala okolo 7 hodin a stacionární fáze nastala kolem 18. hodiny kultivace při hodnotě optické hustoty 0,33.



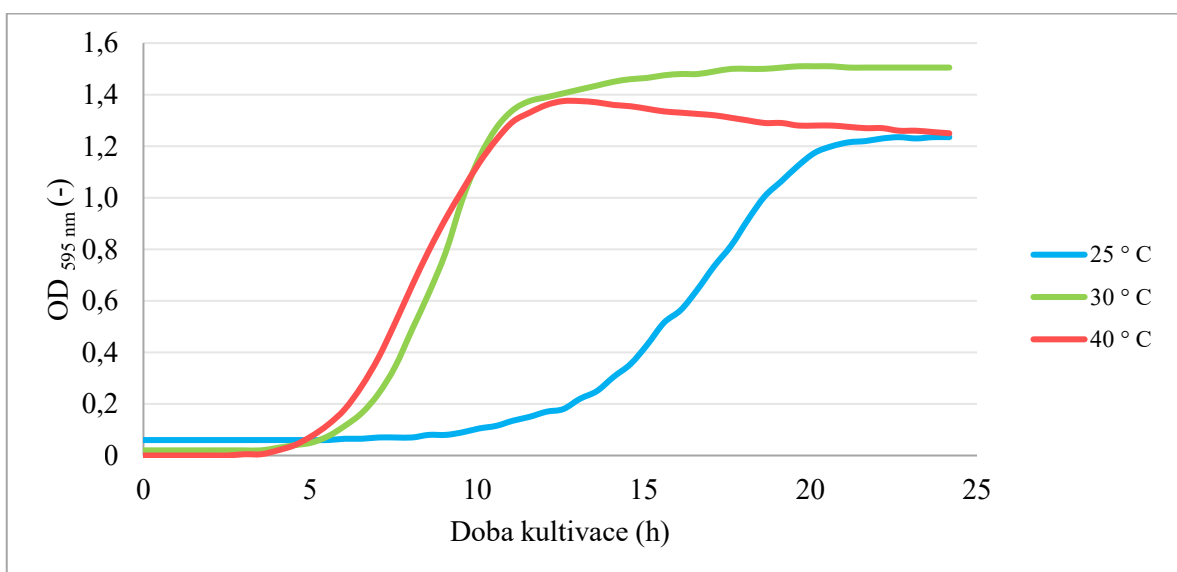
Obrázek 11: Růst *Staphylococcus hominis* J1 izolovaného z masové pomazánky při různých teplotách

Na obrázku 11 lze pozorovat růstovou křivku kmene *Staphylococcus hominis* J1 izolovaného z masové pomazánky. Nejkratší doba lag fáze byla opět zaznamenána při teplotě 40 °C s trváním 4 hodiny, po které nastala strmá log fáze s vrcholem kolem 12. hodiny kultivace a hodnotou OD 1,33. Nejdelší lag fázi vykazoval tento kmen při teplotě 25 °C. Lag fáze při této teplotě trvala 14 hodin, po níž následovala log fáze, která dosáhla maxima při 1,02 OD po 32 hodinách kultivace. Poměrně dlouhá doba lag fáze (11 hodin) byla pozorována i během kultivace při 30 °C. Maximum log fáze bylo zaznamenáno při hodnotě optické hustoty 1,11 po uplynutí 24 hodin kultivace.



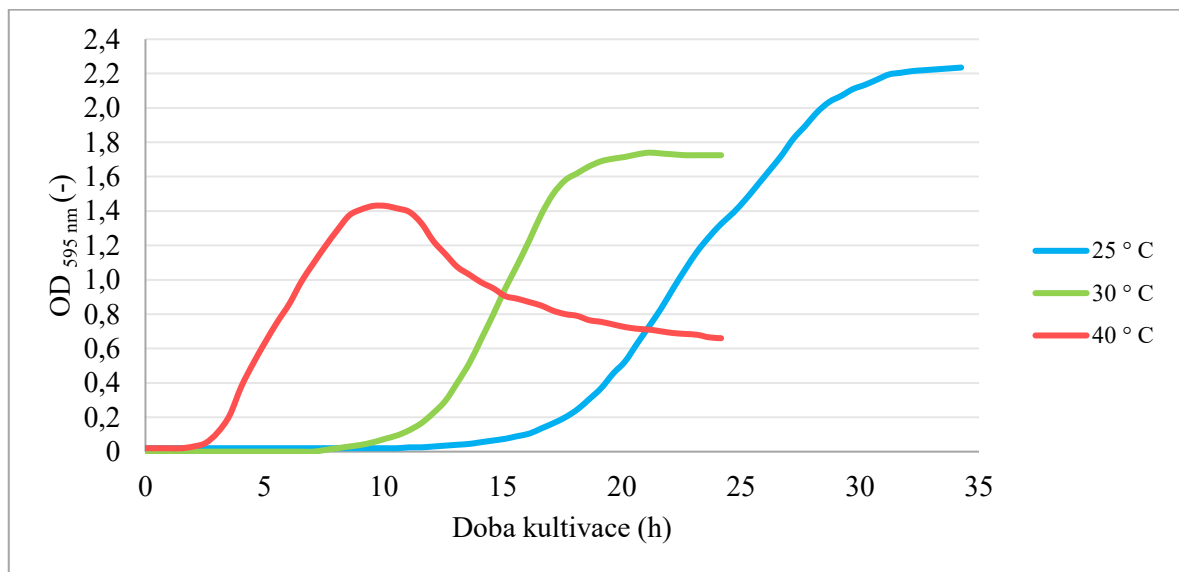
Obrázek 12: Růst *Staphylococcus aureus* 22B izolovaného ze sušeného jablka při různých teplotách

Staphylococcus aureus 22B izolovaný ze sušeného jablka vykazoval nejkratší adaptační fázi lag při teplotě 40 °C s poměrně krátkou dobou 3 hodiny (obrázek 12). Maximum log fáze při této teplotě bylo dosaženo asi po 8 hodinách kultivace při OD 1,35. Nejvyššího maxima OD s hodnotou 1,88 ale bylo dosaženo při teplotě 30 °C kolem 12. hodiny kultivace. Oproti růstu při 40 °C však byla při teplotě 30 °C sledována pomalejší adaptace, lag fáze zde trvala asi 4 hodiny. Schopnost růstu u izolátu *S. aureus* 22B byla oproti dvěma předchozím izolátům poměrně dobrá i při teplotě 25 °C. Doba lag fáze se zde pohybovala kolem 6 hodin a na konci log fáze (17 hodin kultivace) bylo dosaženo maximální optické denzity 1,87.



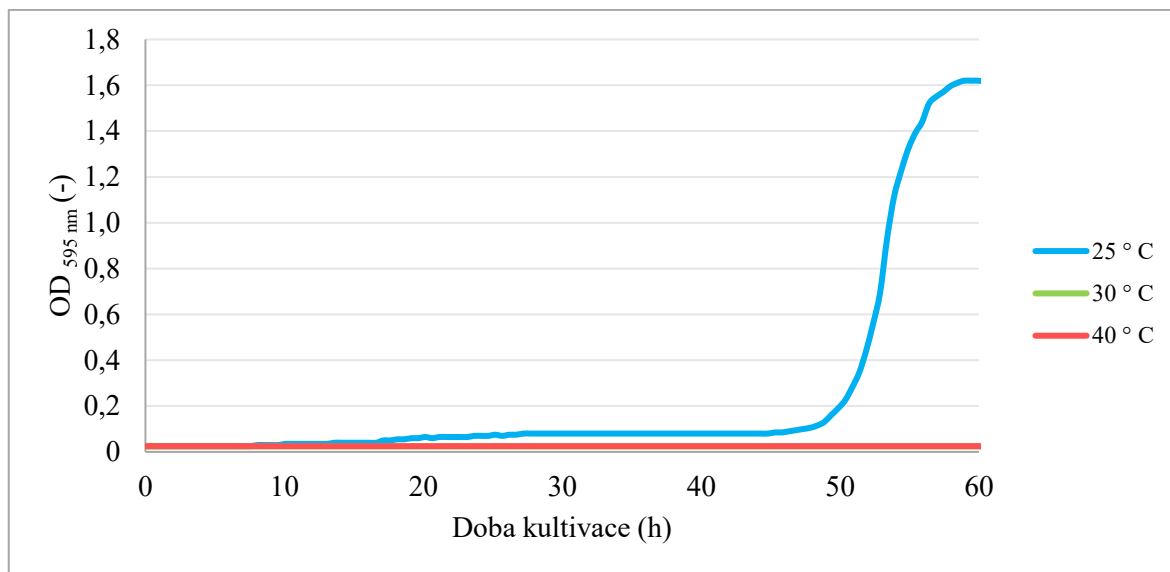
Obrázek 13: Růst *Staphylococcus warneri* 4J izolovaného ze sušené pitavyi při různých teplotách

Z obrázku 13 je patrné, že izolát *Staphylococcus warneri* 4J izolovaný ze sušené pitayi rostl poměrně přijatelně při všech třech zvolených teplotách. Nejkratší doba lag fáze (4 hodiny) byla pozorována při teplotě 40 °C, přičemž na konci exponenciální fáze po 13 hodinách kultivace byla naměřena hodnota 1,38 OD. Vyšší hodnotu OD (1,51) vykazoval kmen po 19 hodinách při testované teplotě 30 °C. Lag fáze u *S. warneri* 4J při teplotě 30 °C trvala 5 hodin. Nejdelší lag fáze byla opět pozorována při teplotě 25 °C. Lag fáze při 25 °C trvala 8 hodin, po níž následovala exponenciální fáze, která dosahovala maxima při 1,26 OD po 22 hodinách kultivace.



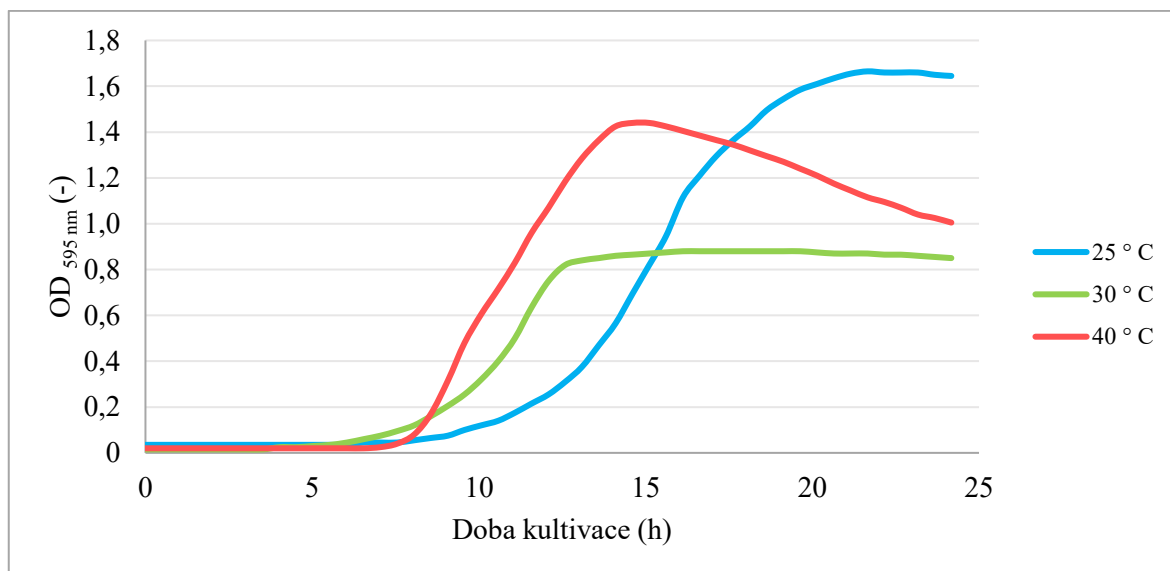
Obrázek 14: Růst *Staphylococcus equorum* 6A izolovaného z lyofilizovaného banánu při různých teplotách

Na obrázku 14 lze pozorovat růstovou křivku kmene *Staphylococcus equorum* 6A izolovaného z lyofilizovaného banánu. Z grafu lze usoudit, že s klesající teplotou se prodlužovala doba lag fáze, a naopak hodnota OD na vrcholu logaritmické fáze s klesající teplotou rostla. Lag fáze trvala při teplotě 40 °C pouze 2 hodiny, při 30 °C trvala 7 hodin a při 25 °C trvala 14 hodin. Nejvyšší hodnota optické denzity při vrcholu exponenciální fáze byla dosažena při teplotě 25 °C po 33 hodinách kultivace a nabývala hodnoty 2,23. Při teplotě 30 °C konec logaritmické fáze nastal po 21 hodinách kultivace s konečnou hodnotou optické denzity 1,74. Při teplotě 40 °C nastal konec log fáze po 10 hodinách kultivace s dosaženou hodnotou OD 1,43.



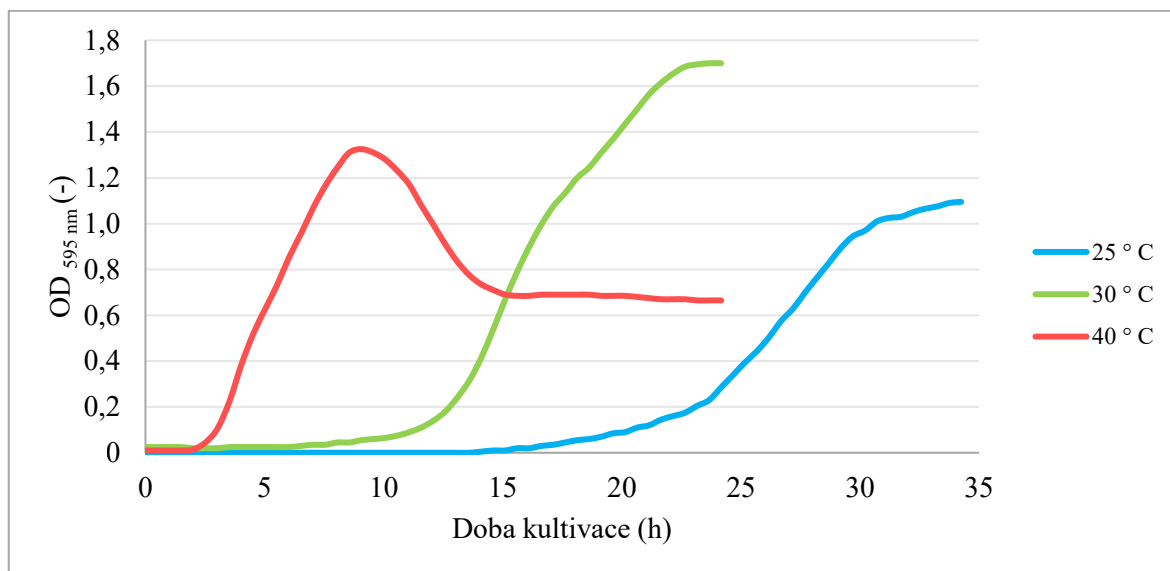
Obrázek 15: Růst *Aerococcus viridans* 6B izolovaného z lyofilizovaného banánu při různých teplotách

Izolát *Aerococcus viridans* 6B původem z lyofilizovaného banánu vykazoval růst pouze při teplotě 25 °C (obrázek 15). Doba lag fáze se pohybovala kolem 48 hodin, poté následoval exponenciální nárůst optické hustoty až na maximální hodnotu 1,62. Této hodnoty OD bylo dosaženo až po 60 hodinách kultivace. Při teplotě 30 °C a 40 °C izolát *Aerococcus viridans* 6B nerostl vůbec.

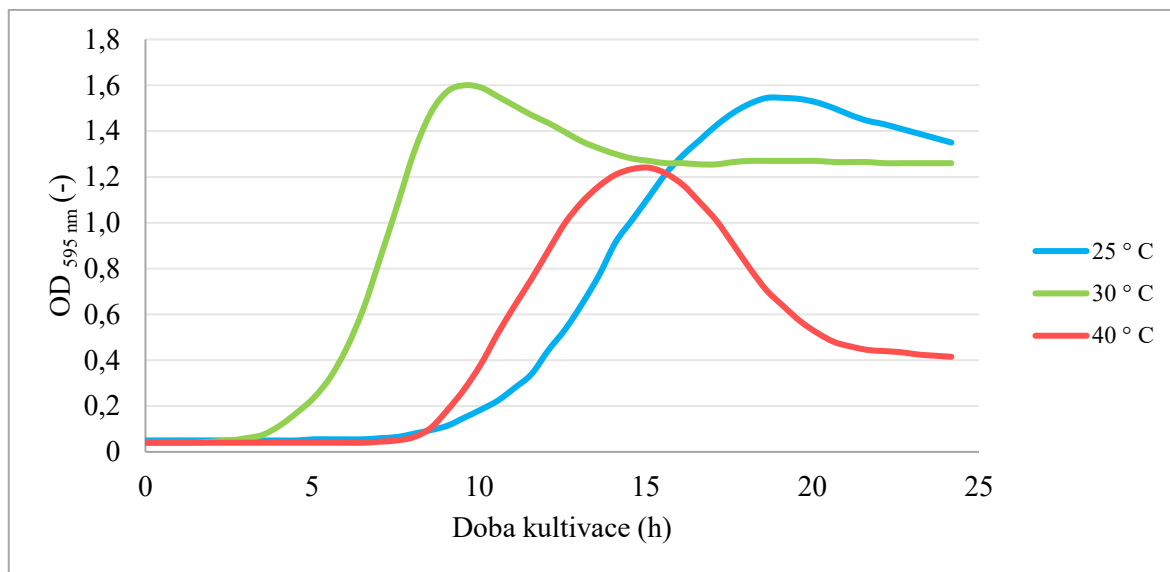


Obrázek 16: Růst *Micrococcus luteus* F2 izolovaného z masové pomazánky při různých teplotách
Z obrázku 16 je patrné, že *Micrococcus luteus* F2 izolovaný z masové pomazánky vykazoval u všech 3 testovaných teplot podobnou délku lag fáze. Během inkubace při teplotách 25 °C a 40 °C trvala adaptační fáze kolem 7 hodin. Při kultivační teplotě 30 °C fáze adaptace trvala 5 hodin. Nejvyšší hodnota optické denzity ze tří testovaných teplot byla dosažena

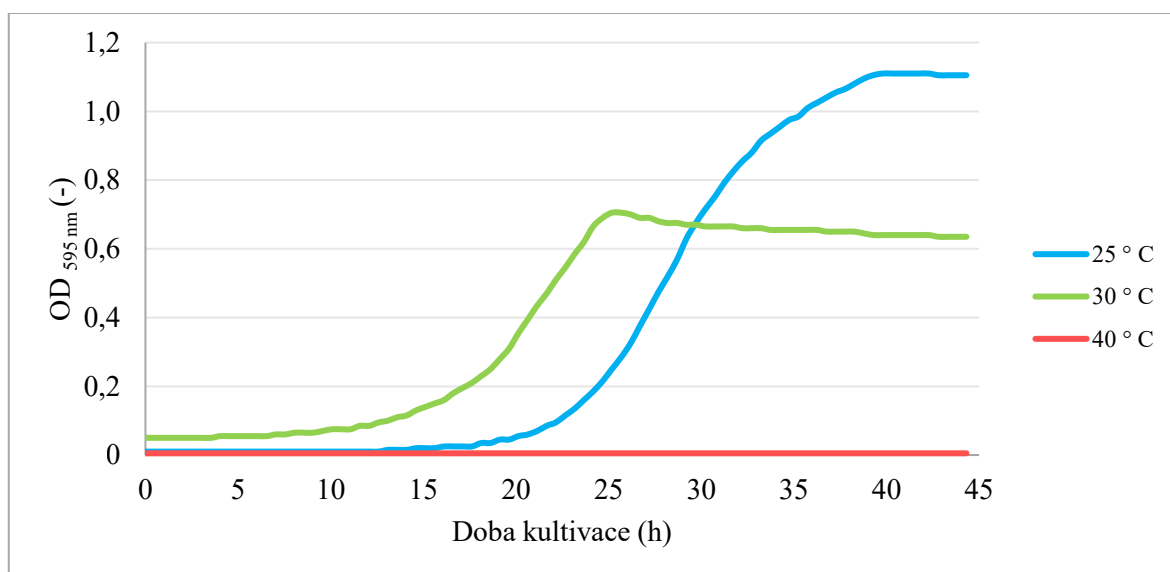
při teplotě 25 °C, kdy se hodnota pohybovala po 21 hodinách kultivace kolem 1,67. Při teplotě 30 °C konec logaritmické fáze nastal po 16 hodinách kultivace s hodnotou OD 0,88. Při teplotě 40 °C nastal vrchol log fáze po 15 hodinách kultivace s hodnotou optické hustoty 1,44.



Obrázek 17: Růst *Kocuria kristinae* 9B izolovaného z lyofilizovaného manga při různých teplotách. Kmen *Kocuria kristinae* 9B izolovaný z lyofilizovaného manga poskytoval podobné růstové křivky jako *Staphylococcus equorum* 6A, kdy s klesající teplotou kultivace se doba lag fáze prodlužovala (obrázek 17). Při 40 °C kmen *K. kristinae* 9B setrval v lag fázi pouze 2 hodiny, poté nastala exponenciální fáze, na jejímž vrcholu (po 9 hodinách kultivace) dosahovala optická hustota hodnoty 1,33. Lag fáze při teplotě 30 °C byla u tohoto kmene prodloužena na 8 hodin a maximální hodnota OD se pohybovala kolem 23. hodiny kultivace na hodnotě 1,70. Nejdelší doba lag fáze byla pozorována při kultivační teplotě 25 °C a trvala 15 hodin. Následovala pozvolná exponenciální fáze. Při této teplotě byla pozorována nejnižší hodnota 1,09 OD ze všech tří teplot. Tato hodnota byla zaznamenána v 33. hodině kultivace.

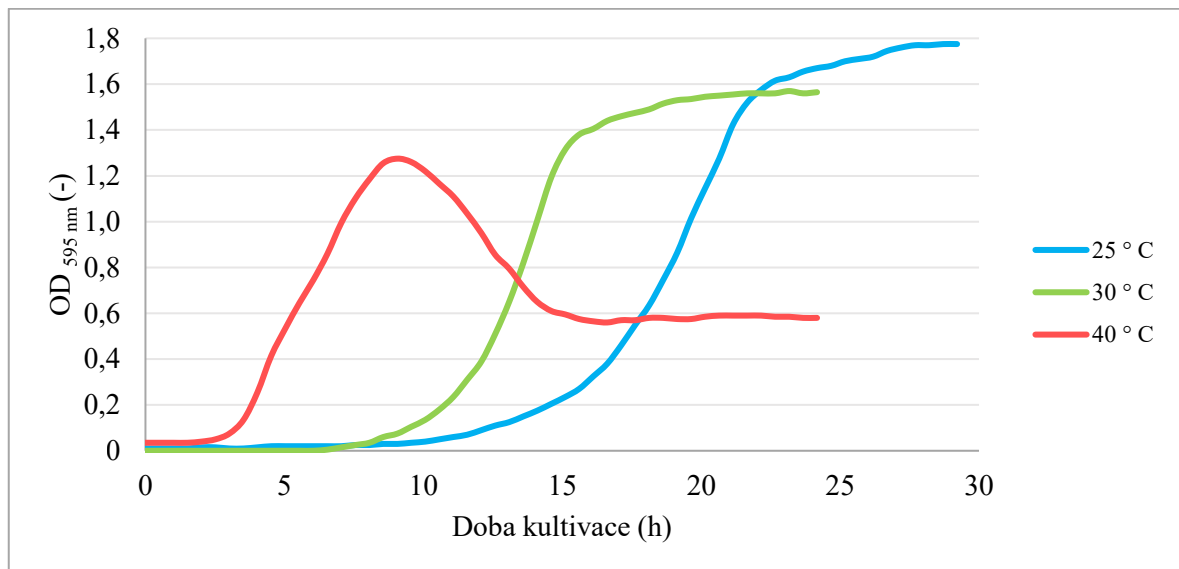


Obrázek 18: Růst *Kocuria rhizophila* F1 izolovaného z masové pomazánky při různých teplotách. Na obrázku 18 lze pozorovat růstovou křivku kmene *Kocuria rhizophila* F1 izolovaného z masové pomazánky. Oproti izolátu *K. kristinae* 9B, vykazoval kmen nejkratší lag fázi při teplotě 30 °C s trváním 3 hodiny. Po této době nastala logaritmická fáze, na jejímž konci kolem 10. hodiny kultivace dosahovala optická hustota hodnoty 1,60. Lag fáze při testování zbylých dvou teplot měly u tohoto kmene podobnou dobu trvání kolem 7 hodin. Při kultivační teplotě 40 °C konec logaritmické fáze nastal po 15 hodinách kultivace s hodnotou OD 1,24. Konec logaritmické fáze při kultivační teplotě 25 °C nastal o něco později, kolem 19. hodiny a hodnota optické denzity dosahovala hodnoty OD 1,55.



Obrázek 19: Růst *Kocuria palustris* 4Q izolovaného ze sušené pitavy při různých teplotách. Z obrázku 19 je patrné, že izolát *Kocuria palustris* 4Q původem ze sušené pitavy vykazoval růst při kultivační teplotě 25 °C a 30 °C. Přípravná lag fáze u tohoto kmene trvala poměrně

dlouhou dobu. Při teplotě 25 °C izolát setrval v lag fázi 18 hodin a při 30 °C byla lag fáze zkrácena na 11 hodin. Kmen dosahoval při 25 °C kultivaci na konci log fáze vyšší hodnoty optické hustoty (1,11 OD v 40. hodině kultivace) než při 30 °C kultivaci (0,71 OD v 25. hodině kultivace). Při teplotě 40 °C kmen *Kocuria palustris* 4Q nerostl.



Obrázek 20: Růst *Rothia amarae* izolovaného z lyofilizovaného manga při různých teplotách. Na obrázku 20 lze pozorovat růstovou křivku kmene *Rothia amarae* izolovaného z lyofilizovaného manga. Z grafu lze usoudit, že s klesající teplotou kultivace rostla doba lag fáze, a naopak hodnota OD na vrcholu logaritmické fáze s klesající teplotou rostla. Nejkratší lag fáze trvala pouze 2 hodiny a byla pozorována při kultivační teplotě 40 °C. V rámci logaritmické fáze vystoupala optická hustota až k hodnotě 1,28 po 9. hodině kultivace. Lag fáze trvala při 30 °C 7 hodin. Kmen dosahoval při 30 °C kultivaci maximální hodnoty 1,56 OD ve 22. hodině kultivace. Nejdelší lag fáze (10 hodin) byla pozorována při kultivační teplotě 25 °C a na konci log fáze bylo dosaženo hodnoty OD 1,78 po 28 hodinách.

8.2.1 Souhrn sledování růstu gram pozitivních koků

Nejkratší doba lag fáze, která trvala 2 hodiny, byla pozorována u kmenů *S. equorum* 6A, *K. kristinae* 9B a *R. amarae* 9G izolovaných z lyofilizovaného ovoce. Naopak nejdelší adaptační fázi vykazoval kmen *A. viridans* 6B izolovaný z lyofilizovaného banánu, u kterého fáze lag trvala 48 hodin.

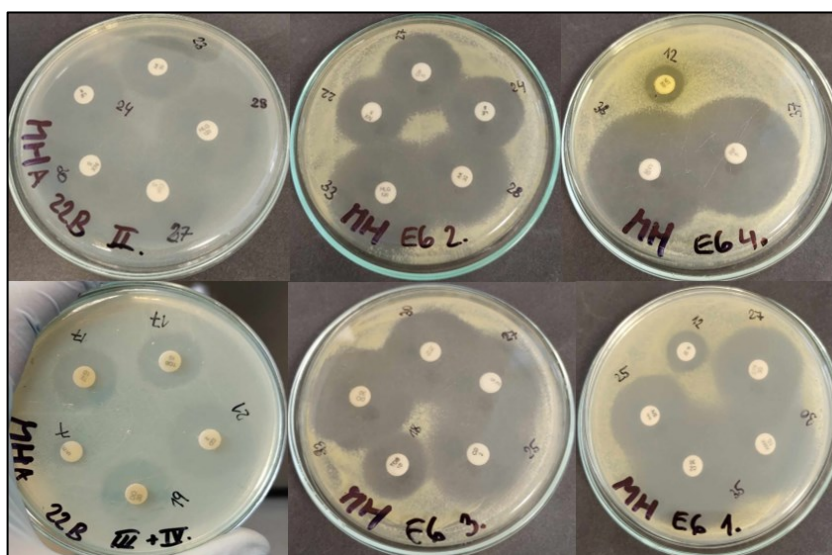
U všech testovaných izolátů rodu *Staphylococcus* klesala doba lag fáze v závislosti na rostoucí teplotě kultivace, přičemž nejkratší lag fáze nastala při kultivační teplotě 40 °C.

Při kultivační teplotě 25 °C byla u *S. warneri* 4J a *S. aureus* 22B izolovaných ze sušeného ovoce zaznamenána poměrně kratší doba lag fáze v porovnání s izoláty *S. epidermidis* D1 a *S. hominis* J1 izolovanými z masové pomazánky.

Nejvyšší hodnoty optické hustoty buněk dosahoval kmen *S. equorum* 6A izolovaný z lyofilizovaného banánu při kultivační teplotě 25 °C, kdy hodnota OD činila 2,23. Testované stafylokoky *S. epidermidis* D1 a *S. hominis* J1 izolované z masové pomazánky dosahovaly nejvyšší hodnoty OD při teplotě 40 °C, přičemž stafylokoky izolované ze sušeného ovoce: *S. aureus* 22B a *S. warneri* 4J vykazovaly nejvyšší hodnoty OD při teplotě 30 °C. Při 30 °C byly pozorovány nejvyšší hodnoty OD také u *K. kristinae* 9B izolované z lyofilizovaného manga a *K. rhizophila* F1 původem z masové pomazánky. Kmeny *A. viridans* 6B, *M. luteus* F2, *K. palustris* 4Q a *R. amarae* 9G dosahovaly nejvyšších hodnot OD při teplotě 25 °C.

8.3 Skrínink antibiotické rezistence u grampozitivních koků

Pro testování rezistence izolovaných grampozitivních koků k celkem 20 antibiotikům byla použita standardizovaná difuzní disková metoda dle EUCAST (2023). Postup této metody je popsán v kapitole 7.3.2. Rezistence byla testována u všech 29 bakteriálních izolátů. Hodnocení probíhalo na základě průměru inhibičních zón (obrázek 21). Hodnoty byly porovnány s referenčními limitními hodnotami stanovenými metodikou EUCAST (2023) pro rod *Staphylococcus*. Pro zástupce rodů *Micrococcus*, *Kocuria*, *Aerococcus* a *Rothia* byly použity na základě fylogenetické příbuznosti referenční hodnoty pro rod *Staphylococcus*.



Obrázek 21: Testování antibiotické rezistence diskovou difuzní metodou

8.3.1 Antibiotická rezistence u *Staphylococcus* spp.

Antibiotická rezistence byla testována u celkem 15 izolátů *Staphylococcus*. Testované kmeny a antimikrobiální látky jsou shrnuty v tabulce 16. Vysoká míra rezistence byla zjištěna ke skupině penicilinů. Konkrétně na penicilin G byly rezistentní všechny testované izoláty (100 %, n = 15). Na kombinaci antimikrobiální látky ampicilin-sulbaktam bylo rezistentních 47 % (n = 7) testovaných stafylokoků, konkrétně se jednalo o:

- *S. epidermidis* 11G izolovaný z lyofilizovaných malin,
- *S. epidermidis* 6E izolovaný z lyofilizovaného banánu,
- 2 kmeny *S. hominis* E2, J1 izolované z masové pomazánky,
- *S. aureus* 9E a *S. warneri* 9I izolované z lyofilizovaného manga,
- *S. warneri* 1D izolovaný z lyofilizovaného kiwi.

K amoxicilinu bylo rezistentních 47 % (n = 7) izolátů. Jako amoxicilin rezistentní byly vyhodnoceny kmeny:

- *S. epidermidis* 11G izolovaný z lyofilizovaných malin,
- *S. epidermidis* 6E izolovaný z lyofilizovaného banánu,
- *S. hominis* J1 z masové pomazánky,
- 2 kmeny *S. aureus* 9E, 14E a *S. warneri* 9I izolované z lyofilizovaného manga,
- *S. warneri* 1D z lyofilizovaného kiwi.

Rezistence byla pozorována také u makrolidových antibiotik, konkrétně u erytromycinu (53 %, n = 8) a fluorochinolonů, zejména u levofloxacinu (33 %, n = 5).

K erytromycinu vykazovaly fenotypovou rezistenci izoláty:

- *S. epidermidis* D1 z masové pomazánky,
- 2 kmeny *S. epidermidis* 11G z lyofilizovaných malin a 6E z lyofilizovaného banánu,
- 2 kmeny *S. aureus* 14D, 14E z lyofilizovaného manga,
- *S. aureus* 25A z lyofilizovaného jablka,
- *S. aureus* 22B ze sušeného jablka,
- *S. warneri* 1D z lyofilizovaného kiwi.

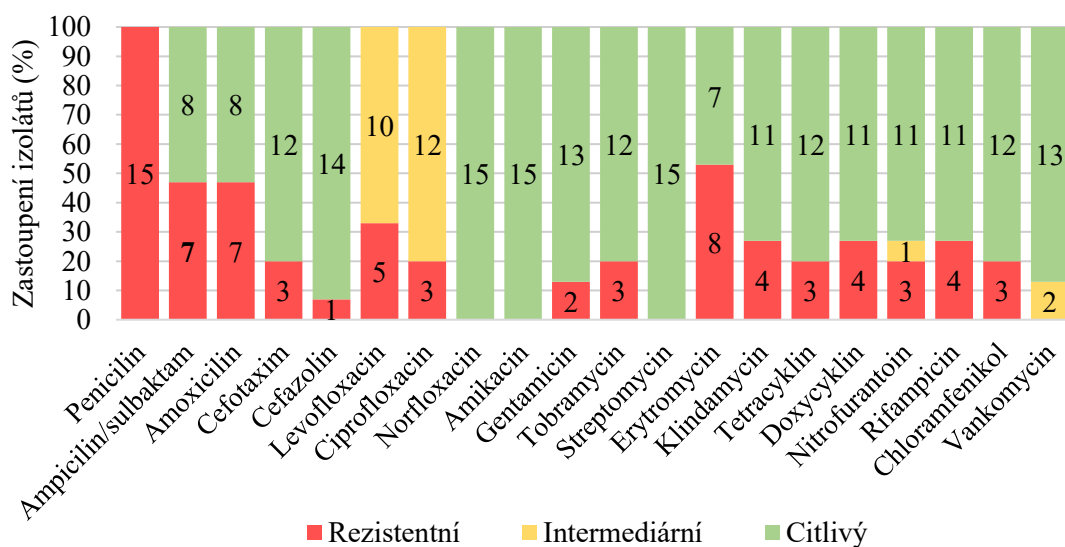
K levofloxacinu projevovaly fenotypovou rezistenci kmeny:

- *S. epidermidis* D1 a *S. hominis* E2 izolované z masové pomazánky,
- *S. hominis* 22C izolovaný ze sušeného jablka,
- 2 kmeny *S. aureus* 9E, 14E z lyofilizovaného manga.

Rezistentní účinek vůči ciprofloxacinu vykazovaly 3 izoláty (20 %, n = 3), jednalo se o:

- *S. epidermidis* D1 a *S. hominis* E2 z masové pomazánky a *S. aureus* 9E z lyofilizovaného manga.

Zbýlých 12 izolátů *Staphylococcus* spp. (80 %) bylo u ciprofloxacinu vyhodnoceno jako intermediární. Intermediární oblast EUCAST definuje jako citlivý, zvýšená expozice. (EUCAST, 2023). U 73 % (n = 11) izolátů *Staphylococcus* byla zjištěna multirezistence. Multirezistencí se zde rozumí rezistentní účinek ke třem a více antibiotikům z různých antibiotických skupin. U všech bakteriálních izolátů identifikovaných jako *Staphylococcus* spp. byla zjištěna citlivost na norfloxacin (100 %, n = 15), amikacin (100 %, n = 15) a streptomycin (100 %, n = 15). Citlivá byla většina izolátů *Staphylococcus* na cefazolin (93 %, n = 14), gentamicin (87 %, n = 13), vankomycin (87 %, n = 13), cefotaxim (80 %, n = 12), tobramycin (80 %, n = 12), tetracyklin (80 %, n = 12), chloramfenikol (80 %, n = 12), doxycyklin (73 %, n = 11) a nitrofurantoin (73 %, n = 11). Podrobný výsledek testování ukazuje tabulka 16. Zastoupení rezistentních, intermediárních a citlivých izolátů *Staphylococcus* k antimikrobiálním látkám je znázorněna na obrázku 22.



Obrázek 22: Zastoupení rezistentních, intermediárních a citlivých izolátů *Staphylococcus* k testovaným antimikrobiálním látkám (číslo udává počet izolátů)

Tabulka 16: Antibiotická rezistence u rodu *Staphylococcus*

Vzorek	Izolát	P	A/S	AMX	CTX ³⁰	CZ	LE	CIP	NX	AK	HLG	TOB	HLS	E	CD	TE	DO ³⁰	NIT	RIF	C ³⁰	VA
D1	<i>S. epidermidis</i>	R	C	C	C	C	R	R	C	C	R	R	C	R	R	R	R	C	R	C	C
11G	<i>S. epidermidis</i>	R	R	R	R	C	I	I	C	C	C	C	C	R	C	R	R	I	R	R	C
6E	<i>S. epidermidis</i>	R	R	R	C	C	I	I	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	R	C
E2	<i>S. hominis</i>	R	R	C	C	R	R	R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	R	C	C
J1	<i>S. hominis</i>	R	R	R	C	C	I	I	C	C	C	C	C	C	C	C	R	R	C	C	C
22C	<i>S. hominis</i>	R	C	C	C	C	R	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
22B	<i>S. aureus</i>	R	C	C	C	C	I	I	C	C	C	R	C	R	R	R	R	C	C	C	I
25A	<i>S. aureus</i>	R	C	C	C	C	I	I	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	C	C
9E	<i>S. aureus</i>	R	R	R	C	C	R	R	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	C
14D	<i>S. aureus</i>	R	C	C	C	C	I	I	C	C	R	C	C	R	C	C	C	C	C	C	I
14E	<i>S. aureus</i>	R	C	R	R	C	R	I	C	C	C	R	C	R	C	C	C	C	C	C	C
4J	<i>S. warneri</i>	R	C	C	C	C	I	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
9I	<i>S. warneri</i>	R	R	R	C	C	I	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1D	<i>S. warneri</i>	R	R	R	R	C	I	I	C	C	C	C	C	R	R	C	C	C	R	C	C
6A	<i>S. equorum</i>	R	C	C	C	C	I	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	R	C

Legenda: R – rezistentní, C – citlivý, I – intermediární (citlivý, zvýšená expozice); P – penicilin, A/S – ampicilin/sulbaktam, AMX – amoxicilin, CTX³⁰ – cefotaxim, CZ – cefazolin, LE – levofloxacin, CIP – ciprofloxacin, NX – norfloxacin, AK – amikacin, HLG – gentamicin, TOB – tobramycin, HLS – streptomycin, E – erytromycin, CD – klindamycin, TE – tetracyklin, DO³⁰ – doxycyklin, NIT – nitrofurantoin, RIF – rifampicin, C³⁰ – chloramfenikol, VA – vankomycin

8.3.2 Antibiotická rezistence u izolátů rodů *Aerococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria* a *Rothia*

Aerococcus spp.

Kmen identifikovaný jako *Aerococcus viridans* (100 %, n = 1) izolovaný z lyofilizovaného banánu vykazoval fenotypovou rezistenci k penicilinovým antibiotikům, konkrétně k penicilinu a amoxicilinu, dále k fluorochinolonům: levofloxacinu a ciprofloxacinu a také k cefazolinu, tobramycinu a rifampicinu. Izolát byl vyhodnocen jako multirezistentní. Na tetracykliny, makrolidová antibiotika, většinu aminoglykosidů a dále také chloramfenikol, vankomycin, cefotaxim, klindamycin a kombinaci ampicilin/sulbaktam fenotypová rezistence u *A. viridans* zjištěna nebyla (tabulka 17).

Micrococcus spp.

Antibiotická rezistence byla testována u 4 izolátů *Micrococcus luteus* (tabulka 17). K penicilinu vykazovaly rezistenci všechny izoláty *M. luteus* (100 %, n = 4). Jistá míra rezistence byla pozorována u nitrofurantoinu (75 %, n = 3). K nitrofurantoinu vykazovaly rezistenci kmeny:

- *M. luteus* E6 izolovaný z masové pomazánky,
- *M. luteus* 1P izolovaný z lyofilizovaného kiwi,
- *M. luteus* 14H z lyofilizovaného manga.

K antimikrobiální látce erytromycinu i cefotaximu bylo rezistentních 50 % (n = 2) izolátů, konkrétně:

- *M. luteus* F2 z masové pomazánky,
- *M. luteus* 14H z lyofilizovaného manga.

U kombinace ampicilin/sulbaktam byl pozorován rezistentní účinek u 50 % (n = 2) izolátů. Ke kombinaci ampicilin/sulbaktam byly rezistentní kmeny:

- *M. luteus* F2 izolovaný z masové pomazánky,
- *M. luteus* 1P izolovaný z lyofilizovaného kiwi.

Obě testovaná fluorochinolová antibiotika, levofloxacin i ciprofloxacin, poskytovala intermediární fenotypovou odpověď u všech testovaných jedinců (100 %, n = 4). Multirezistenci vykazovalo 50 % (n = 2) testovaných mikrokoků. U všech izolátů *M. luteus*

(100 %, n = 4) byla zjištěna citlivost ke všem testovaným aminoglykosidovým antibiotikům a tetracyklinům, dále k chloramfenikolu, vankomycinu, rifampicinu, klindamycinu, norfloxacinu a cefazolinu.

***Kocuria* spp.**

Rezistence k antimikrobiálním látkám byla zjišťována u celkem 8 izolátů *Kocuria* spp., (tabulka 17). Rezistentní byly všechny izoláty k nitrofurantoinu (100 %, n = 8). Rezistence byla pozorována také u penicilinu (63 %, n = 5), norfloxacinu (63 %, n = 5,) a erytromycinu (38 %, n = 3). Rezistence na penicilin byla pozorována u zástupců:

- *K. kristinae* 9F izolovaný z lyofilizovaného manga,
- *K. kristinae* 4K a *K. palustris* 4Q izolované ze sušené pitayi,
- *K. rhizophila* F1 z masové pomazánky,
- *K. rhizophila* 12B z lyofilizovaných jahod.

K norfloxacinu byly rezistentní izoláty:

- *K. kristinae* 9B izolovaný z lyofilizovaného manga,
- *K. kristinae* 4K a *K. palustris* 4Q izolované ze sušené pitayi,
- *K. rhizophila* F1 z masové pomazánky,
- *K. rhizophila* 12B z lyofilizovaných jahod.

K erytromycinu vykazovaly rezistenci kmeny:

- *K. palustris* 4Q izolovaný ze sušené pitayi,
- *K. rhizophila* F1 z masové pomazánky,
- *K. rhizophila* 9H izolovaný z lyofilizovaného manga

K levofloxacinu vykazovalo rezistentní účinek 50 % testovaných izolátů *Kocuria* (n = 4) a jednalo se o zástupce:

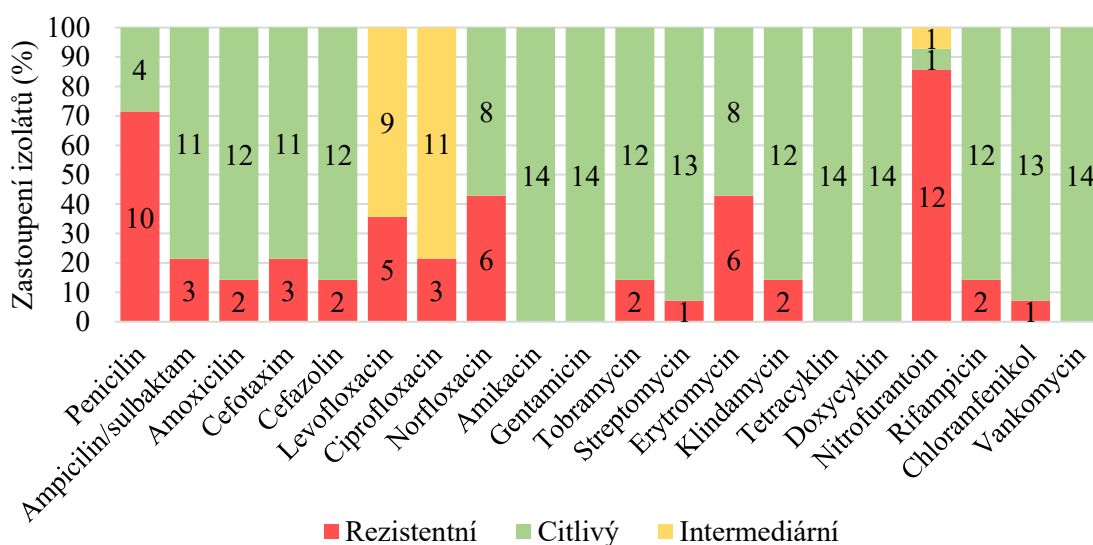
- *K. kristinae* 9B a *K. rhizophila* 9H izolované z lyofilizovaného manga,
- *K. palustris* 4Q izolované ze sušené pitayi,
- *K. rhizophila* 12B z lyofilizovaných jahod.

Zbýlý počet izolátů testovaných na levofloxacin byl vyhodnocen jako intermediární (50 %, n = 4). Většina izolátů byla definována jako intermediární i u ciprofloxacinu (88 %, n = 7). Multirezistence byla zjištěna u 75 % (n = 6) izolátů *Kocuria*. Všechny testované izoláty *Kocuria* (100 %, n = 8) vykazovaly citlivost k amoxicilinu, tetracyklinu, doxycyklinu a vankomycinu. Také byla zjištěna citlivost ke všem testovaným aminoglykosidovým antibiotikům, konkrétně tedy k amikacinu (100 %, n = 8), gentamicinu (100 %, n = 8), tobramycinu (100 %, n = 8) a streptomycinu (88 %, n = 7). Izoláty byly citlivé také na obě testovaná antibiotika spadající do skupiny cefalosporinů (88 %, n = 7). K rifampicinu, chloramfenikolu, klindamycinu a kombinaci ampicilin/sulbaktam byla většina izolátů také citlivá (88 %, n = 7)

Rothia spp.

Izolát identifikovaný jako *Rothia amarae* (100 %, n=1) izolovaný z lyofilizovaného manga vykazoval rezistenci k ciprofloxacinu, norfloxacinu, tobramycinu, erytromycinu, klindamycinu a nitrofurantoinu. Tento izolát byl vyhodnocen jako multirezistentní. K testovaným penicilinům, cefalosporinům, tetracyklinům a většině aminoglykosidům, vykazoval izolát citlivost (tabulka 17).

Zastoupení rezistence, intermediarity a citlivosti izolátů *Aerococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria* a *Rothia* je na obrázku 23.



Obrázek 23: Zastoupení rezistentních, intermediárních a citlivých izolátů *Aerococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria* a *Rothia* (číslo udává počet izolátů)

Tabulka 17: Antibiotická rezistence u rodů *Aerococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria* a *Rothia*

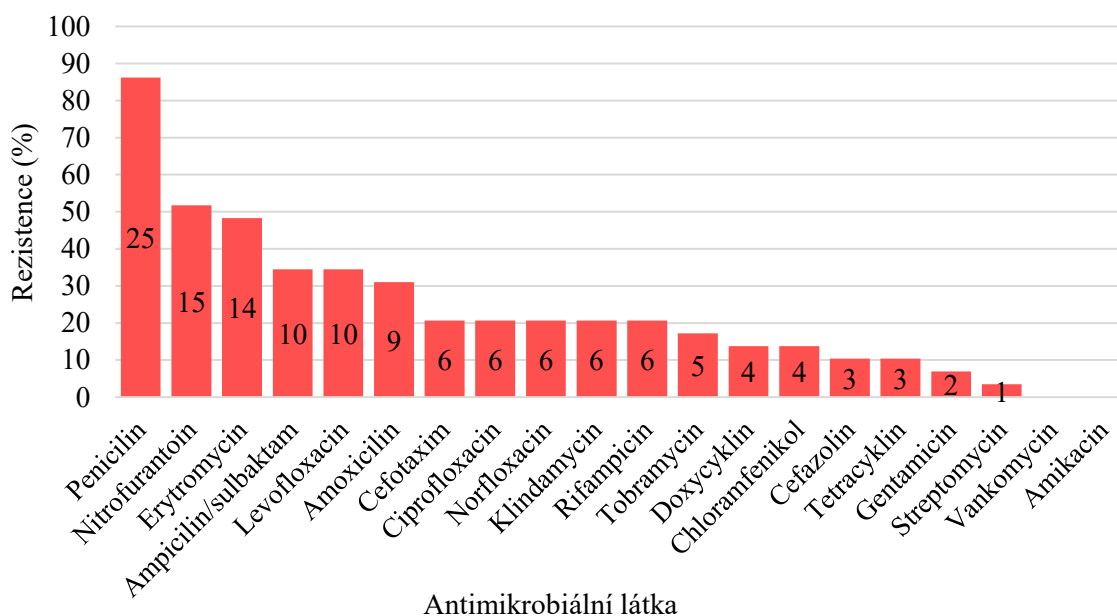
Vzorek	Izolát	P	A/S	AMX	CTX ³⁰	CZ	LE	CIP	NX	AK	HLG	TOB	HLS	E	CD	TE	DO ³⁰	NIT	RIF	C ³⁰	VA
6B	<i>A. viridans</i>	R	C	R	C	R	R	R	C	C	C	R	C	C	C	C	C	I	R	C	C
E6	<i>M. luteus</i>	R	C	C	C	C	I	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C
F2	<i>M. luteus</i>	R	R	R	R	C	I	I	C	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	C	C
1P	<i>M. luteus</i>	R	R	C	C	C	I	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C
14H	<i>M. luteus</i>	R	C	C	R	C	I	I	C	C	C	C	C	R	C	C	C	R	C	C	C
9B	<i>K. kristinae</i>	C	C	C	C	C	R	I	R	C	C	C	C	C	C	C	C	R	R	C	C
9F	<i>K. kristinae</i>	R	C	C	C	C	I	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C
1C	<i>K. kristinae</i>	C	C	C	C	C	I	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C
4K	<i>K. kristinae</i>	R	C	C	C	C	I	I	R	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C	C	C
4Q	<i>K. palustris</i>	R	C	C	C	C	R	I	R	C	C	C	C	R	C	C	C	R	C	C	C
F1	<i>K. rhizophila</i>	R	C	C	R	R	I	I	R	C	C	C	C	R	R	C	C	R	C	C	C
12B	<i>K. rhizophila</i>	R	R	C	C	C	R	I	R	C	C	C	R	C	C	C	C	R	C	R	C
9H	<i>K. rhizophila</i>	C	C	C	C	C	R	R	C	C	C	C	C	R	C	C	C	R	C	C	C
9G	<i>R. amarae</i>	C	C	C	C	C	I	R	R	C	C	R	C	R	R	C	C	R	C	C	C

Legenda: R – rezistentní, C – citlivý, I – intermediární (citlivý, zvýšená expozice); P – penicilin, A/S – ampicilin/sulbaktam, AMX – amoxicilin, CTX³⁰ – cefotaxim, CZ – cefazolin, LE – levofloxacin, CIP – ciprofloxacín, NX – norfloxacín, AK – amikacin, HLG – gentamicin, TOB – tobramycin, HLS – streptomycin, E – erytromycin, CD – klindamycin, TE – tetracyklin, DO³⁰ – doxycyklin, NIT – nitrofurantoin, RIF – rifampicin, C³⁰ – chloramfenikol, VA – vankomycin

8.3.3 Souhrn fenotypové antibiotické rezistence u grampozitivních koků

Nejvyšší četnost rezistence grampozitivních koků byla zaznamenána u antimikrobiální látky penicilin. K penicilinu bylo rezistentních 86 % ($n = 25/29$) všech testovaných kmenů. Poměrně rezistentní byly izoláty i k dalším látkám patřícím do skupiny penicilinů, konkrétně ke kombinaci ampicilin-sulbaktam (34 %, $n = 10/29$) a amoxicilinu (31 %, $n = 9/29$). Vysoká míra rezistence byla pozorována také u nitrofurantoinu, ke kterému bylo rezistentních 52 % ($n = 15/29$) kmenů. K erytromycinu byla zjištěna rezistence u 48 % ($n = 14/29$) všech testovaných kmenů. U obou fluorochinolových antibiotik byla zjištěna rezistence. K levofloxacinu bylo zaznamenáno 34 % ($n = 10/29$) rezistentních izolátů a k ciprofloxacinu 21 % ($n = 6/29$), zbylý počet izolátů poskytoval u obou antibiotik intermediární odpověď.

K antimikrobiálním látkám, ke kterým většina izolovaných grampozitivních koků vykazovala citlivost, patřily cefalosporiny, aminoglykosidy a tetracykliny. Většina izolátů byla citlivá také na norfloxacin, klindamycin, rifampicin, vankomycin a chloramfenikol. Zastoupení rezistentních, intermediárních a citlivých grampozitivních koků je shrnuto na obrázku 24.



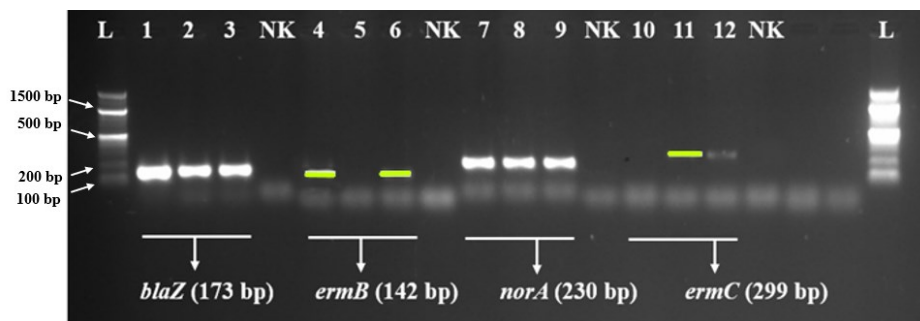
Obrázek 24: Zastoupení rezistence u testovaných grampozitivních koků (číslo udává počet izolátů)

8.4 Identifikace přítomnosti genů antibiotické rezistence

Vybrané geny kódující rezistenci k antibiotikům byly kvalitativně detekovány pomocí metody PCR. Pro analýzu byly vybrány ty bakteriální izoláty, u kterých byla difuzní diskovou metodou (kapitola 8.3) prokázána rezistence k jednomu či více antimikrobiálním látkám. Na základě toho byly následně vybrány geny kódující rezistenci, konkrétně k β -laktamovým antibiotikům (peniciliny, cefalosporiny), fluorochinolonům, erytromycinu, klindamycinu, tetracyklinu a chloramfenikolu. K těmto genům byly následně zvoleny vhodné primery. Souhrn izolátů a genů, které byly testovány, je uveden v tabulkách 18 a 19.

8.4.1 Optimalizace metody pomocí gradientové PCR

Pro zjištění annealingové teploty a zajištění správné amplifikace byla provedena optimalizace metody za pomoci PCR provedené v teplotním gradientu. Pro optimalizaci byly vybrány vzorky DNA izolované z kmenů, u kterých byl výskyt testovaného genu vysoce pravděpodobný a předpokládáný. Optimální amplifikace byla zajištěna u všech vybraných genů: *blaZ*, *norA*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *tetK*, *tetM* a *cat*. Ukázka výsledku gradientové PCR je na obrázku 25.



Obrázek 25: Výsledek gelové elektroforézy – gradientová PCR pro geny *blaZ*, *ermB*, *norA* a *ermC* (L – 100 bp DNA Ladder; dráha 1, 4, 7, 10 – 54 °C; dráha 2, 5, 8, 11 – 53 °C; dráha 3, 6, 9, 12 – 52 °C; NK – negativní kontrola, nedostatečně viditelné, avšak přítomné, bandy jsou zvýrazněny krátkou zelenou přímkou)

8.4.2 Detekce genů rezistence u *Staphylococcus* spp.

Gen *blaZ* kódující rezistenci k β -laktamovým antibiotikům se vyskytoval u všech ($n = 14/14$) testovaných fenotypově rezistentních izolátů *Staphylococcus* spp. Přítomnost genu *norA* byla zjišťována u 12 izolátů *Staphylococcus* spp. fenotypově rezistentních ke skupině fluorochinolonů, přičemž u všech testovaných kmenů byl gen *norA* detekován. Geny *ermA*, *ermB* a *ermC* kódující rezistenci k erytromycinu byly testovány u 3 fenotypově rezistentních

izolátů *Staphylococcus* spp. U všech byla zjištěna přítomnost alespoň jednoho z těchto genů, přičemž geny *ermA* a *ermC* byly detekovány u všech 3 testovaných kmenů. Pro zjištění genotypové rezistence na tetracyklin byly u 5 fenotypově rezistentních izolátů testovány geny *tetK* a *tetM*. U 60 % (n = 3/5) testovaných izolátů byl alespoň jeden z genů rezistence na tetracyklin detekován. Kmeny, u kterých byly jednotlivé geny testovány shrnuje tabulka 18.

Tabulka 18: Výskyt genů antibiotické rezistence u izolátů *Staphylococcus* spp.

Vzorek	Izolát	Výskyt genu							
		<i>blaZ</i>	<i>norA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>tetK</i>	<i>tetM</i>	<i>cat</i>
D1	<i>S. epidermidis</i>	+	+	x	x	x	–	+	+
11G	<i>S. epidermidis</i>	+	+	x	x	x	–	–	+
6E	<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	–	+	x	x	+
E2	<i>S. hominis</i>	+	+	x	x	x	x	x	x
J1	<i>S. hominis</i>	+	+	x	x	x	+	+	x
22C	<i>S. hominis</i>	+	+	x	x	x	x	x	x
22B	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	–	
25A	<i>S. aureus</i>	+	+	x	x	x	x	x	+
9E	<i>S. aureus</i>	+	x	x	x	x	x	x	x
14D	<i>S. aureus</i>	+	+	x	x	x	x	x	x
14E	<i>S. aureus</i>	+	x	x	x	x	–	–	+
4J	<i>S. warneri</i>	+	+	x	x	x	x	x	x
9I	<i>S. warneri</i>	+	+	x	x	x	x	x	x
1D	<i>S. warneri</i>	+	x	+	–	+	x	x	x
6A	<i>S. equorum</i>	x	+	x	x	x	x	x	+

Legenda: + značí pozitivní výsledek, gen je přítomný; – značí negativní výsledek, gen není přítomný, x – kmen nebyl na přítomnost genu testován

8.4.3 Detekce genů rezistence u *Aerococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Kocuria* spp. a *Rothia* spp.

U izolátu *Aerococcus viridans* byla zjištěna fenotypová rezistence k penicilinům. Podařilo se detekovat gen *blaZ*, který rezistenci k penicilinům podmiňuje. Pro zjištění genotypové rezistence k flurochinolonům byl testován gen *norA*, který se podařilo u izolátu také detekovat.

Na základě rezistence izolátů *M. luteus* k penicilinům a cefalosporinům byl testován gen *blaZ*. Všechny testované fenotypově rezistentní izoláty (n = 4/4) *M. luteus* gen *blaZ* nesly. Dále byl testován výskyt genu *norA*, podmiňující rezistenci k flurochinolonům. Gen *norA* se podařilo detekovat u jednoho (n = 1/2) ze 2 testovaných izolátů *M. luteus*.

U fenotypově rezistentního izolátu (n = 1) k erytromycinu byly testovány geny *ermA*, *ermB* a *ermC*, přičemž se podařilo detekovat geny *ermA* a *ermC*.

Celkem 5 izolátů rodu *Kocuria* spp. fenotypově rezistentních k penicilinům bylo testováno na přítomnost genu *blaZ*. Gen *blaZ* nesly všechny (n = 5/5) testované kmeny. Výskyt genu *norA* byl zjištěn u 83 % (n = 5/6) testovaných fenotypově rezistentních izolátů na fluorochinolony. U izolátu rezistentního (n = 1) na erytromycin byly detekovány geny *ermA* a *ermC*. U kmene *K. rhizophila* fenotypově rezistentního na chloramfenikol byl testován výskyt genu *cat*. Tento gen nebyl u tohoto kmene detekován (tabulka 19).

U izolátu *R. amarae* poskytujícího rezistentní fenotypovou odpověď k fluorochinolonom byl detekován gen *norA* kódující tuto rezistenci. Na základě fenotypové rezistence izolátu k erytromycinu byly detekovány geny *ermA* a *ermC*. Gen *ermB* nebyl u *R. amarae* detekován.

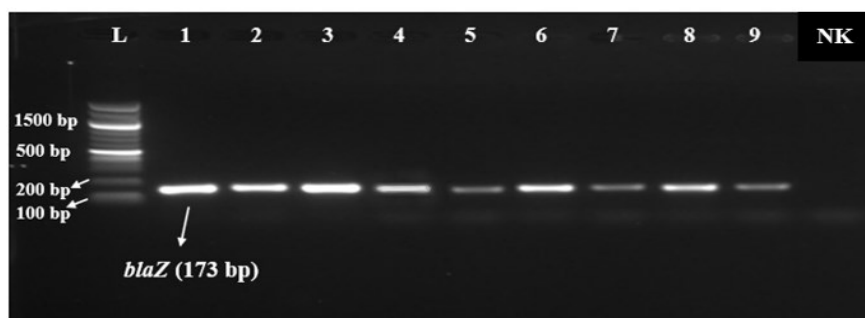
Tabulka 19: Výskyt genů antibiotické rezistence u izolátu *Aerococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Kocuria* spp. a *Rothia* spp.

Vzorek	Izolát	Výskyt genu					
		<i>blaZ</i>	<i>norA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>cat</i>
6B	<i>A. viridans</i>	+	+	x	x	x	x
E6	<i>M. luteus</i>	+	+	x	x	x	x
F2	<i>M. luteus</i>	+	-	+	-	+	x
1P	<i>M. luteus</i>	+	x	x	x	x	x
14H	<i>M. luteus</i>	+	x	x	x	x	x
9B	<i>K. kristinae</i>	x	+	x	x	x	x
9F	<i>K. kristinae</i>	+	x	x	x	x	x
1C	<i>K. kristinae</i>	x	x	x	x	x	x
4K	<i>K. kristinae</i>	+	+	x	x	x	x
4Q	<i>K. palustris</i>	+	+	x	x	x	x
F1	<i>K. rhizophila</i>	+	+	+	-	+	x
12B	<i>K. rhizophila</i>	+	-	x	x	x	-
9H	<i>K. rhizophila</i>	x	+	x	x	x	x
9G	<i>R. amarae</i>	x	+	+	-	-	x

Legenda: + značí pozitivní výsledek, gen je přítomný; - značí negativní výsledek, gen není přítomný, x - kmen nebyl na přítomnost genu testován

8.4.4 Souhrn výsledků detekce genů antibiotické rezistence u gram pozitivních koků

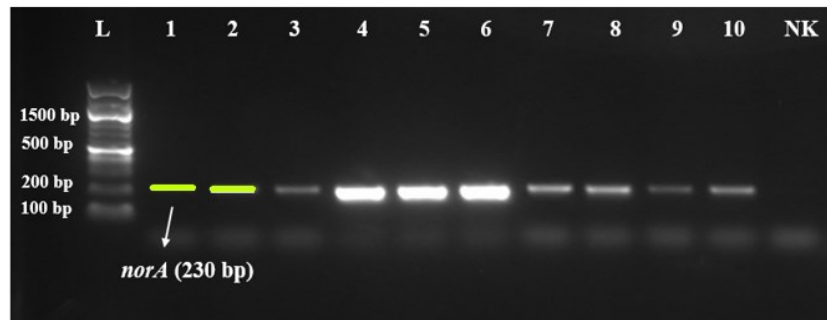
Na přítomnost genu *blaZ* kódujícího rezistenci k β -laktamovým antibiotikům bylo testováno celkem 24 izolátů, které na agarových plotnách vykazovaly k dané antibiotické skupině fenotypovou rezistenci. U všech testovaných izolátů (100 %, $n = 24$) byl tento gen detekován. Gen *blaZ* nesly všechny ($n = 14/14$) testované fenotypově rezistentní izoláty rodu *Staphylococcus* spp. Pozitivní výsledek byl zaznamenán také u izolátů *Aerococcus* spp. ($n = 1/1$), *Micrococcus* spp. ($n = 4/4$) a *Kocuria* spp. ($n = 5/5$). Obrázek 26 představuje výsledek gelové elektroforézy pro gen *blaZ* u vybraných vzorků.



Obrázek 26: Výsledek detekce genu *blaZ* u testovaných izolátů

(L – 100 bp DNA Ladder; pozitivní výsledek: 1 – *S. hominis* J1, 2 – *S. aureus* 14E, 3 – *S. warneri* 1D, 4 – *A. viridans* 6B, 5 – *M. luteus* F2, 6 – *K. kristinae* 4K, 7 – *K. palustris* 4Q, 8 – *K. rhizophila* F1, 9 – *S. aureus* 9E; negativní výsledek: NK – negativní kontrola)

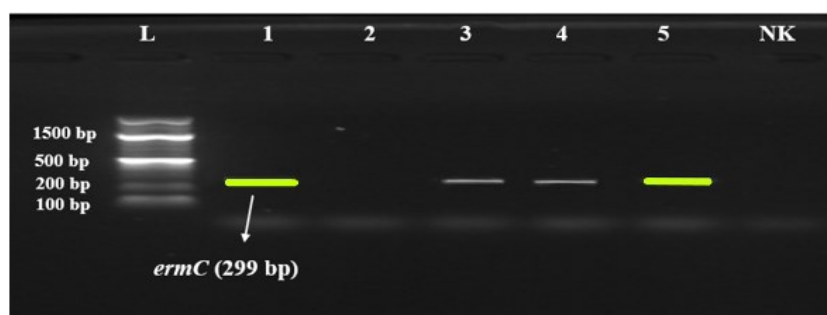
Gen *norA* podmiňující rezistenci k fluorochinolovým antibiotikům byl testován u celkem 22 izolátů fenotypově rezistentních k levofloxacinu, ciprofloxacinu nebo norfloxacinu. Pozitivní výsledek byl zaznamenán u 91 % ($n = 20$) všech testovaných izolátů. Gen *norA* byl detekován u všech testovaných izolátů *Staphylococcus* spp. ($n = 12/12$) a dále také u *A. viridans* ($n = 1/1$) a *R. amarae* ($n = 1/1$). Ze 2 testovaných fenotypově rezistentních izolátů *M. luteus* byl *norA*-pozitivní jeden izolát ($n = 1/2$). Gen *norA* se vyskytoval u 83 % ($n = 5/6$) testovaných fenotypově rezistentních izolátů *Kocuria* spp. Na obrázku 27 je znázorněn výsledek detekce genu *norA* u vybraných testovaných izolátů.



Obrázek 27: Výsledek detekce genu *norA* u testovaných izolátů

(L – 100 bp DNA Ladder; pozitivní detekce: 1 – *S. epidermidis* 11G, 2 – *S. hominis* J1, 3 – *S. hominis* 22C, 4 – *S. aureus* 22B, 5 – *S. aureus* 25A, 6 – *S. aureus* 14D, 7 – *S. warneri* 4J, 8 – *M. luteus* E6, 9 – *K. kristinae* 4K, 10 – *K. rhizophila* F1; negativní výsledek: NK – negativní kontrola; nedostatečně viditelné, avšak přítomné, bandy jsou zvýrazněny krátkou zelenou přímkou)

Rezistenci k erytromycinu determinují geny *ermA*, *ermB* nebo *ermC*. Přítomnost těchto genů byla zjišťována u celkem 6 izolátů poskytujících rezistentní fenotypovou odpověď na erytromycin. Všechny izoláty obsahovaly alespoň 1 z testovaných genů rezistence na erytromycin. Gen *ermA* byl přítomný u 100 % ($n = 6/6$) testovaných izolátů. Gen *ermB* byl detekován pouze u 17 % ($n = 1/6$) testovaných izolátů, konkrétně u izolátu *S. aureus* 22B ($n = 1/1$). U ostatních kmenů se gen *ermB* nepodařilo detekovat, což mohlo být mimo jiné způsobeno odlišnou sekvencí genu kódujícího rezistenci k erytromycinu. Gen *ermC* neslo 83 % ($n = 5/6$) testovaných izolátů. Jak ukazuje obrázek 28, u izolátu *R. amarae* se nepodařilo gen *ermC* detekovat. Možnou příčinou mohla být opět odlišná sekvence hledaného genu u tohoto rodu.



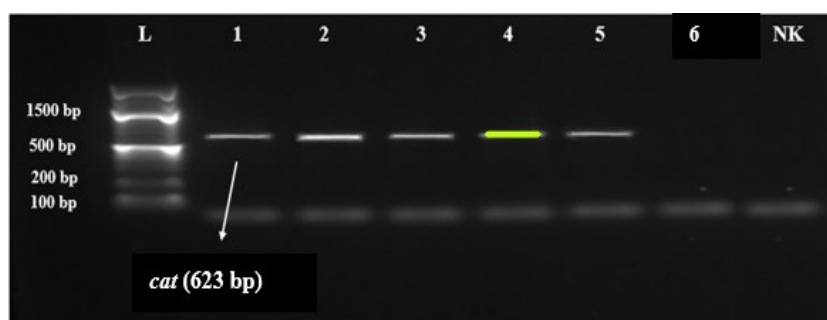
Obrázek 28: Výsledek detekce genu *ermC* u testovaných izolátů

(L – 100 bp DNA Ladder; pozitivní detekce: 1 – *M. luteus* F2, 3 – *S. epidermidis* 6E, 4 – *S. aureus* 22B, 5 – *S. warneri* 1D; negativní výsledek: 2 – *R. amarae* 9G, NK – negativní kontrola; nedostatečně viditelné, avšak přítomné bandy jsou zvýrazněny krátkou zelenou přímkou)

Pro zjištění genotypové rezistence na tetracyklin byly testovány geny *tetK* a *tetM*. Na tyto geny bylo testováno celkem 5 izolátů rodu *Staphylococcus*. Gen *tetK* byl nalezen

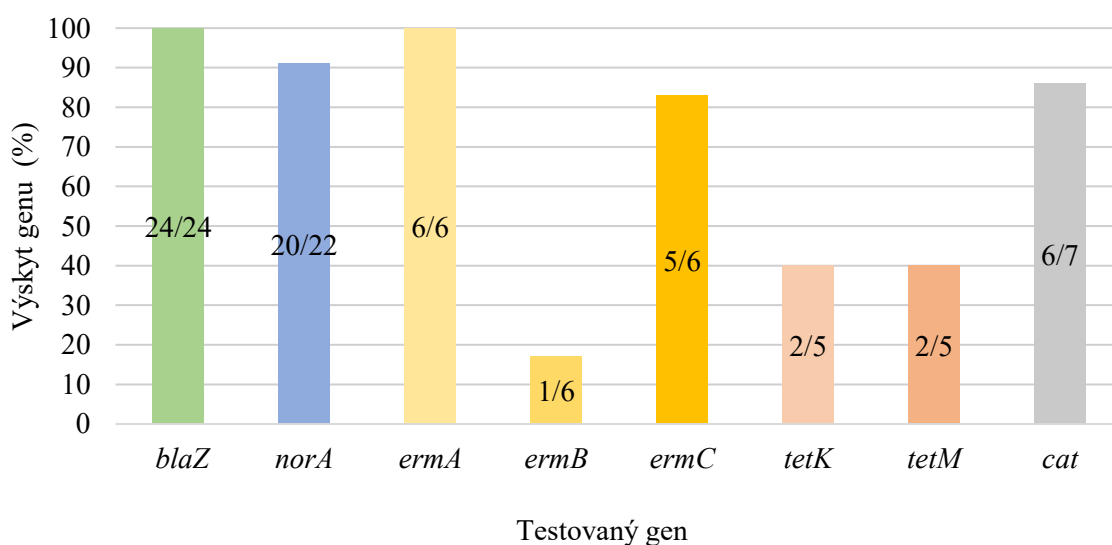
u 2 (40 %, $n = 2/5$) testovaných izolátů, konkrétně u *S. hominis* J1 a *S. aureus* 22B. Přítomnost genu *tetM* byla prokázána taktéž u dalších dvou izolátů (40 %, $n = 2/5$): *S. epidermidis* D1 a *S. hominis* J1.

Gen *cat* kódující rezistenci k chloramfenikolu byl testován u 7 izolátů. Výskyt genu byl zjišťován u 6 izolátů *Staphylococcus* spp. a 1 izolátu *Kocuria* spp. Gen *cat* se vyskytoval u 86 % testovaných izolátů. Všechny izoláty rodu *Staphylococcus* ($n = 6/6$) neslo gen *cat*. U izolátu *Kocuria rhizophila* 12B nebyl gen *cat* detekován (obrázek 29).



Obrázek 29: Výsledek detekce genu *cat* u testovaných izolátů

(L – 100 bp DNA Ladder; pozitivní detekce: 1 – *S. epidermidis* D1, 2 – *S. epidermidis* 11G, 3 – *S. aureus* 14E, 4 – *S. aureus* 25A, 5 – *S. equorum* 6A; negativní výsledek: 6 – *K. rhizophila* 12B, NK – negativní kontrola, nedostatečně viditelné, avšak přítomné, bandy jsou zvýrazněny krátkou zelenou přímkou)



Obrázek 30: Četnost výskytu testovaných genů rezistence u testovaných gram pozitivních koku (číslo x/y udává počet pozitivních kměňů/počet testovaných kmenů)

8.5 Stanovení schopnosti tvorby biofilmu Christensenovou metodou

Tvorba biofilmu byla u všech bakteriálních izolátů zkoumána v BHI bujonu pomocí modifikované Christensenovy metody v 96jamkové mikrotitrační destičce. Pro zjištění hraniční hodnoty CV určující, zda je daný kmen biofilm-positivní či nikoli, byla zjištěna průměrná hodnota negativních kontrol $A_{NK} = 0,132$ se směrodatnou odchylkou $\sigma_{NK} = 0,004$. Limitní hodnota CV byla vypočítána jako součet průměrné hodnoty absorbance negativních kontrol (A_{NK}) a trojnásobku její směrodatné odchylky (σ_{NK}). Na základě následného porovnání hodnoty CV s absorbcí vzorků (A_{595}) byly izoláty rozděleny do tří kategorií: kmen netvořící biofilm ($A_{595} \leq CV$), slabě tvořící biofilm ($CV < A_{595} < 2CV$) a intenzivně tvořící biofilm ($A_{595} > 2CV$). Limitní hodnoty jsou uvedeny v tabulce 20.

Tabulka 20: Limitní hodnoty pro hodnocení tvorby biofilmu testovanými izoláty bakterií

A (-)	Kategorie
0 – 0,145	Netvořící biofilm
0,145 – 0,290	Slabě tvořící biofilm
>0,290	Intenzivně tvořící biofilm

Tvorba biofilmu byla testována celkem u 29 izolovaných gram-positivních koků. Z celkového počtu testovaných izolátů byla biofilm-positivita zjištěna u 59 % ($n = 17/29$) kmenů. Vysoká tvorba biofilmu byla pozorována u 29 % ($n = 5/17$) biofilm-positivních izolátů, konkrétně u:

- *S. hominis* E2 izolovaného z masové pomazánky
- *S. aureus* 9E izolovaného z lyofilizovaného manga
- *K. kristinae* 9F izolovaného z lyofilizovaného manga
- *K. rhizophila* 9H izolovaného z lyofilizovaného manga
- *K. rhizophila* 12B izolovaného z lyofilizovaných jahod

Celkem 71 % ($n = 12/17$) biofilm-positivních kmenů bylo zařazeno do kategorie se slabou tvorbou biofilmu. Mezi slabě tvořící izoláty byly zařazeny:

- *S. epidermidis* D1, *S. hominis* J1 izolované z masové pomazánky
- *S. epidermidis* 11G z lyofilizovaných malin
- *S. hominis* 22C a *S. aureus* 22B izolované ze sušeného jablka

- 2 kmeny *S. aureus* 14D, 14E a 1 kmen *S. warneri* 9I z lyofilizovaného manga
- *S. warneri* 4J a *K. kristinae* 4K izolované ze sušené pitayi
- *S. warneri* 1D a *K. kristinae* 1C izolované z lyofilizovaného kiwi

Zbýlých 41 % (n = 12) testovaných mikroorganismů bylo vyhodnoceno jako biofilm-negativní (tabulka 21).

Tabulka 21: Vyhodnocení tvorby biofilmu u testovaných grampozitivních koku

Vzorek	Izolát	A (-)	Vzorek	Izolát	A (-)
D1	<i>S. epidermidis</i>	0,223	6B	<i>A. viridans</i>	0,110
11G	<i>S. epidermidis</i>	0,244	E6	<i>M. luteus</i>	0,019
6E	<i>S. epidermidis</i>	0,090	F2	<i>M. luteus</i>	0,021
E2	<i>S. hominis</i>	1,007	1P	<i>M. luteus</i>	0,043
J1	<i>S. hominis</i>	0,151	14H	<i>M. luteus</i>	0,108
22C	<i>S. hominis</i>	0,275	9B	<i>K. kristinae</i>	0,092
22B	<i>S. aureus</i>	0,220	9F	<i>K. kristinae</i>	0,595
25A	<i>S. aureus</i>	0,094	1C	<i>K. kristinae</i>	0,174
9E	<i>S. aureus</i>	0,349	4K	<i>K. kristinae</i>	0,207
14D	<i>S. aureus</i>	0,169	4Q	<i>K. palustris</i>	0,075
14E	<i>S. aureus</i>	0,189	F1	<i>K. rhizophila</i>	0,027
4J	<i>S. warneri</i>	0,145	12B	<i>K. rhizophila</i>	1,097
9I	<i>S. warneri</i>	0,160	9H	<i>K. rhizophila</i>	1,093
1D	<i>S. warneri</i>	0,208	9G	<i>R. amarae</i>	0,128
6A	<i>S. equorum</i>	0,032			

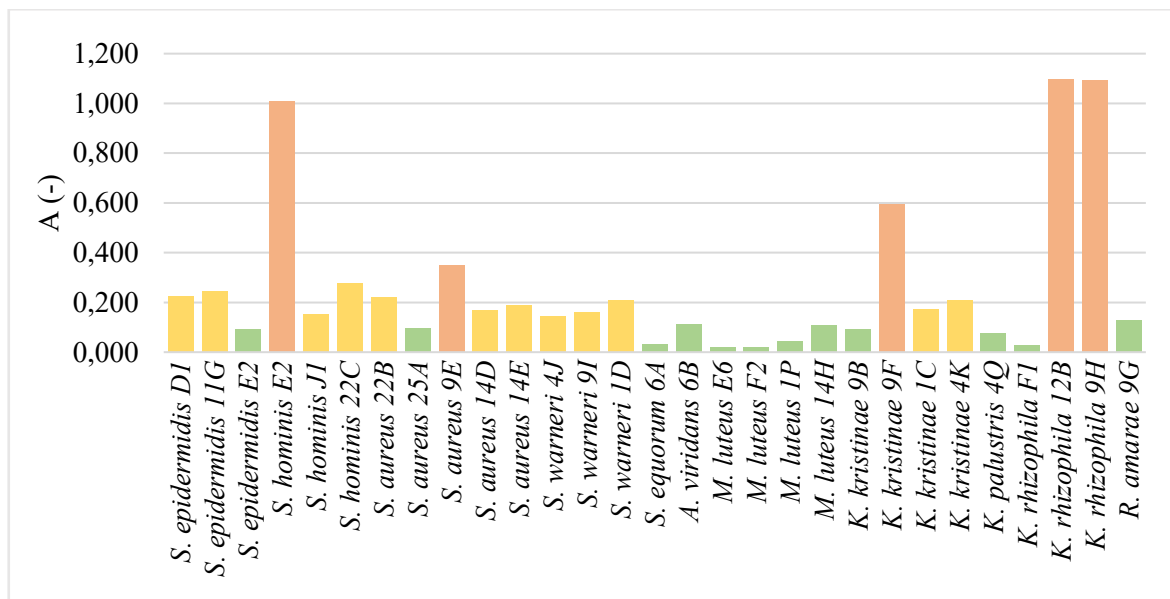
Legenda: ● = izolát netvoří biofilm, ● = slabá tvorba biofilmu, ● = vysoká tvorba biofilmu

Nejvyšší počet kmenů s tvorbou biofilmu byl zaznamenán u bakterií rodu *Staphylococcus*. Biofilm-pozitivita byla pozorována u 80 % (n = 12/15) testovaných izolátů rodu *Staphylococcus*, z toho slabá tvorba biofilmu byla prokázána u 87 % (n = 10/12) testovaných biofilm-pozitivních izolátů. U kmenů *S. epidermidis* 6E a *S. equorum* 6A izolovaných z lyofilizovaného banánu a *S. aureus* 25A z lyofilizovaného jablka nebyla schopnost tvorby biofilmu v tomto experimentu prokázána.

U zástupců rodu *Kocuria* byla tvorba biofilmu zjištěna u 63 % (n = 5/8) testovaných kmenů, z toho silně tvořilo biofilm 60 % kmenů (n = 3/5). U tří kmenů *Kocuria* spp. nebyla tvorba biofilmu prokázána. K izolátům netvořících biofilm patřily kmeny *K. kristinae* 9B izolovaný z lyofilizovaného manga, *K. palustris* 4Q ze sušené pitayi a *K. rhizophila* F1 z masové pomazánky.

Nejvyšší tvorba biofilmu ze všech testovaných kmenů byla pozorována u kmene *K. rhizophila* 12B izolovaného z lyofilizovaných jahod s hodnotou absorbance 1,097. U bakterie *K. rhizophila* 9H izolované z lyofilizovaného manga byla pozorována taktéž vysoká schopnost tvorby biofilmu, kdy bylo dosaženo hodnoty absorbance 1,093.

Z obrázku 31 je patrné, že u izolátů *M. luteus* (n = 4), *A. viridans* (n = 1) a *R. amarae* (n = 1) tvorba biofilmu prokázána nebyla.



Obrázek 31: Tvorba biofilmu u testovaných grampozitivních koků

(● = netvoří biofilm, ● = slabá tvorba biofilmu, ● = vysoká tvorba biofilmu)

9 DISKUZE

V rámci této práce byla provedena charakterizace grampozitivních koků izolovaných z prostředí potravinových matric, které by neměly podporovat jejich růst. Mikrobiologická stabilita potravin je ovlivňována různými faktory, např. pH potravin, dostupností živin, dostupností vody, teplotou skladování apod. (Erkmen, Bozoglu, 2016). K potravinám nepodporujícím růst a množení mikroorganismů patří mimo jiné sušené a lyofilizované potraviny vyznačující se nízkou vlhkostí a také potraviny ošetřené tepelným záhřevem, na které byla tato práce primárně zaměřena.

Potraviny s nízkým obsahem vlhkosti řadíme k potravinám nepodporujícím růst a množení mikroorganismů, jelikož nízká hodnota aktivity vody u těchto potravin růst mikrobů inhibuje. Obecně se udává, že inhibice růstu většiny mikroflóry nastává při hodnotě a_w 0,60 a nižší. Pro inhibici růstu většiny bakteriálních buněk je udávána minimální hodnota a_w kolem 0,87 (Alp, Bulantekin, 2021).

I přes to je v současné době upozorňováno na roli těchto výrobků při onemocnění způsobených z potravin (food-borne diseases). Patogenní mikroorganismy se mohou vyskytovat v potravinách, které nepodporují jejich růst, i přesto však mohou tyto mikroorganismy přežívat nepříznivé podmínky a představovat tak riziko pro konzumenta. Bourdichon et al. (2021), ve své studii dokonce tvrdí, že potraviny s nízkou vodní aktivitou poskytují vhodné prostředí pro dlouhodobé přežívání některých patogenních mikroorganismů, které představují závažné riziko pro konzumenta, např. *Staphylococcus aureus*. Patogenní mikroorganismy mohou odolávat různým antimikrobním zásahům, včetně tepelného ošetření, či procesu sušení a lyofilizace, a jsou schopné v prostředí s nízkou vodní aktivitou přežívat dlouhou dobu (Chitrakar et al., 2018). Studie uvádějí vysokou četnost hlášených případů onemocnění způsobených konzumací sušených potravin, které byly kontaminovány patogeny, jako jsou např. *Staphylococcus* spp., *Cronobacter* spp. či *Salmonella* spp. a další (Chitrakar et al., 2018). Potraviny, které byly považovány za bezpečné vzhledem k neschopnosti podporovat růst mikroorganismů, se tak staly předmětem obav (Bourdichon et al., 2021).

Sterilované masné výrobky jsou díky ošetření vysokými teplotami považovány za mikrobiologicky nerizikové. I přes to se v těchto výrobcích může vyskytovat mikrobiota, která mohla přežít proces termosterilace. Je známo, že termorezistentní bakterie rodů

Clostridium a *Bacillus* (případně dalších rodů od nich odvozených) jsou velmi odolné vůči vysokým teplotám a mohly by nedostatečný tepelný záhřev přežívat.

Výrobek by mohl být kontaminován i po procesu tepelného ošetření během balení, skladování či distribuce, např. rody, jako jsou *Salmonella* spp. *Staphylococcus* spp. či *Listeria monocytogenes* (Dikeman, Devine, 2014). Při porušení skladovacích podmínek pak mohou nastat optimální podmínky pro růst a množení mikroorganismů, které přežily tepelný zákrok či kontaminovaly potravinu až po tepelném zákroku a mohou způsobovat mimo jiné kažení potraviny, případně by mohly způsobit i zdravotní problémy u konzumentů (Alp, Bulantekin, 2021).

9.1 Izolace a identifikace kmenů

V rámci experimentu byly ze vzorků sušeného ovoce a sterilovaných masových pomazánek izolovány kmeny rodů *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Aerococcus*, *Micrococcus* a *Rothia*.

Ze vzorků ovoce sušeného vzduchem či sublimací byly izolovány grampozitivní koky patřící do rodů *Staphylococcus* a *Kocuria*. Ve vzorcích byla prokázána přítomnost patogenního druhu *Staphylococcus aureus*. Výskyt tohoto druhu je často spojován s kontaminací syrového ovoce již během sklizně a posklizňových úpravách. Častým zdrojem kontaminace koaguláza-pozitivního *S. aureus* může být voda, prach, prostředí či samotní pracovníci. Vyšší riziko kontaminace představuje prostředí s nedostatečnými hygienickými podmínkami (Alp, Bulantekin, 2021). Mimo to je patogenní *S. aureus* velmi dobře adaptován na prostředí se sníženou hodnotou a_w a v sušeném ovoci může přežívat dlouhou dobu (Beuchat et al., 2013). Ve studii Křivská et al. (2019) byla prokázána přítomnost *S. aureus* ve vzorcích sušeného ovoce, přičemž nejvyšší výskyt byl zaznamenán ve vzorcích sušeného bio banánu. Ve vzorcích sterilované masové pomazánky výskyt *S. aureus* prokázán nebyl. Dále byly ve vzorcích sušeného ovoce přítomné koaguláza-negativní stafylokoky *S. warneri* a *S. equorum*. Ve vzorcích sušeného ovoce byly přítomné také izoláty rodu *Kocuria*, konkrétně druhy *K. rhizophila*, *K. palustris* a *K. kristinae*, ve vzorcích masové pomazánky *K. rhizophila*. V posledních letech jsou kmeny rodu *Kocuria* stále častěji izolovány z potravin, kde se vyskytují jako komenzální bakterie. Část z nich je zařazena mezi oportunní patogeny schopné vyvolat onemocnění u člověka (Ramos et al., 2021). Ve studii Matoulková et al. (2018) byly ze vzorků pasterovaného piva izolovány biofilmopozitivní druhy *K. varians* a *K. kristinae*, které se pravděpodobně podílely na jeho kažení. Z našich vzorků lyofilizovaného ovoce i vzorků masové pomazánky

byl navíc izolovány koaguláza-negativní *S. epidermidis* a *S. hominis*. Oba oportunně patogenní kmeny *S. epidermidis* i *S. hominis* jsou běžnou součástí mikrobioty lidské kůže a patří tak mezi indikátorové mikroorganismy sekundární kontaminace výrobků, zejména při porušení správné hygienické praxe (Bennett, Monday, 2003). Ve studii Křivská et al. (2019) byl *S. epidermidis* izolován ze vzorků sušeného ananasu a borůvek z bioprodukce. V našich vzorcích lyofilizovaného ovoce se navíc vyskytovaly i druhy *Aerococcus viridans*, *Rothia amarae* a *Micrococcus luteus*. Kmen *M. luteus* byl nalezen i ve vzorcích sterilované masové pomazánky. Tyto druhy by pravděpodobně mohly kontaminovat vzorky sušeného ovoce i z vnějšího prostředí během zpracování či jeho skladování. Ve studii Chekol a Ashenafi (2009) izolovali zástupce rodu *Micrococcus* a koaguláza-negativní *Staphylococcus* ze vzorků rybích a masových konzerv.

9.2 Vliv teploty na růst izolátů

Při sledování vlivu kultivační teploty na růst mikroorganismů bylo zjištěno, že téměř všechny izoláty rodu *Staphylococcus* rostly velmi dobře v rozmezí teplot 25 až 40 °C. Kromě kmene *S. epidermidis* D1, jehož schopnost růstu při 25 °C byla poměrně nízká. Většina izolovaných zástupců rodu *Staphylococcus*, včetně *S. aureus* 22B, rostla nejlépe při teplotě 40 °C. Studie Medved'ová et al. (2019) se zabývala zjišťováním teplot růstu *S. aureus* izolovaného z ovčího sýra, přičemž byla zjištěna optimální růstová teplota 40,6 °C. Kmeny *S. warneri* 4J a *S. equorum* 6A vykazovaly nejlepší růst při teplotě 30 °C. Dle Bennett, Monday (2003) je optimální teplotou růstu většiny stafylokoků teplota 37 °C. Naopak *Aerococcus viridans* 6B rostl velmi dobře při kultivační teplotě 25 °C. Při teplotách 30 a 40 °C došlo k inhibici růstu této bakterie i přes to, že se jedná o mezofilní bakterii. Je však známo, že teplota kolem 45 °C tento kmen inhibuje (Williams et al., 1953). U *Micrococcus luteus* F2 byla pozorována velmi dobrá schopnost růstu v rozmezí všech testovaných teplot, což odpovídá literárním zdrojům uvádějícím optimální růst v rozsahu 25 až 37 °C. Ve své studii Hamad (2012) uvádí, že rod *Micrococcus* je schopný růst i při chladírenských teplotách a mohl by přežívat působení teploty 63 °C po dobu 30 minut. Většina zástupců rodu *Kocuria* rostla poměrně dobře v celém rozmezí testovaných teplot, kromě izolátu *K. palustris* 4Q, který rostl velmi dobře při teplotě 25 °C, avšak při teplotě 40 °C růst nebyl zaznamenán. Při všech testovaných teplotách rostl poměrně dobře i mezofilní kmen *Rothia amarae* 9G. Teplota je velmi důležitým vnějším faktorem, který má bezprostřední vliv na růst mikrobioty v potravinách. Při optimální teplotě dosahuje rychlost biochemických reakcí a růst mikrobiálních buněk maxima. Pokud jsou potraviny

skladovány v těchto vhodných podmínkách, může v nich rychle dojít k rozvoji kontaminující mikrobioty (Hamad, 2012). Skladování produktů, jako jsou např. sušené ovoce či sterilované konzervy, při pokojové teplotě, by mohlo představovat optimální podmínky pro rozvoj kontaminující mezofilní mikrobioty, např. gram pozitivních koků izolovaných v rámci této práce.

9.3 Antibiotická rezistence

V rámci testování antibiotické rezistence byla u 73 % testovaných izolátů rodu *Staphylococcus* zjištěna multirezistence. Významná rezistence byla pozorována ke skupině penicilinů, konkrétně k penicilinu G byly rezistentní všechny testované izoláty, včetně patogenního druhu *Staphylococcus aureus*. Gen *blaZ* kódující rezistenci k β -laktamovým antibiotikům se vyskytoval u všech testovaných izolátů *Staphylococcus*. Poměrně vysoké procento stafylokoků bylo rezistentní i vůči erytromycinu, jehož rezistenci nejčastěji kódovaly geny *ermA* a *ermC*. Gen *ermB* u koaguláza-negativních stafylokoků nebyl prokázán, ale vyskytoval se pouze u *S. aureus* 22B. Podobné výsledky poskytovala i studie Duran et al. (2012). Dále byly izoláty rezistentní k ampicilin-sulbaktamu, amoxicilinu a levofloxacinu. K ampicilin-sulbaktamu bylo rezistentních 50 % stafylokoků. U rodu *Staphylococcus* byla zaznamenána rezistence k ciprofloxacinu, tobramycinu, gentamycinu, klindamycinu, tetracyklinům, nitrofurantoinu či rifampicinu. U izolátů byla pozorována také vysoká četnost genu *norA* zodpovědného za fluorochinolonovou rezistenci a gen *cat* kódující rezistenci k chloramfenikolu. Ve studii Duran et al. (2012) hodnotili antibiotickou rezistenci u klinických izolátů koaguláza-negativních stafylokoků a koaguláza-pozitivního *S. aureus*. U těchto byla pozorována rezistence vůči penicilinu, gentamicinu, tetracyklinu, erytromycinu, klindamycinu a ciprofloxacinu. K penicilinu byla zjištěna rezistence u 90 % *S. aureus* a 87 % koaguláza-negativních stafylokoků. Četnost výskytu genu *blaZ* zde byla vysoká. Gen *blaZ* byl přítomný u 100 % fenotypově rezistentních *S. aureus* i koaguláza-negativních stafylokoků. Více než 50 % koaguláza-negativních stafylokoků vykazovalo rezistenci ke klindamycinu a ciprofloxacinu. U 60 % *S. aureus* byla prokázána rezistence k erytromycinu. V této studii zároveň zjistili senzitivitu na vankomycin u všech testovaných kmenů, přičemž podobný výsledek poskytoval i náš experiment, kdy byla zjištěna senzitivita u 87 % testovaných stafylokoků. Ve studii Jia et al. (2020) testovali antibiotickou rezistenci u *S. aureus* izolovaného z potravin, přičemž nejvyšší míru rezistence vykazoval izolát k penicilinu G, ampicilinu, erytromycinu a oxacilinu. Ve studii Urban-Chmiel et al. (2022) izolované kmeny

S. epidermidis a *S. aureus* vykazovaly též vysokou rezistenci vůči klindamycinu, tetracyklinu a *S. aureus* navíc ještě k ciprofloxacinu. Studie Bissong, Ateba (2020) potvrdila vysokou míru rezistence *S. aureus* k ampicilinu a amoxicilinu a nižší rezistenci k tetracyklinu, chloramfenikolu a levofloxacinu. Můžeme tedy konstatovat velmi podobné výsledky ve srovnání s uváděnými studii.

U 75 % izolátů *Kocuria* byla zjištěna multirezistence. Všechny testované kmeny vykazovaly rezistenci k nitrofurantoinu. Více než 60 % izolátů bylo rezistentních vůči penicilinu a norfloxacinu, 50 % izolátů vykazovalo rezistenci k levofloxacinu a přes 30 % bylo rezistentních k erytromycinu. K nitrofurantoinu byl rezistentní také kmen *Rothia amarae* 9G. U rodu *Micrococcus* byla pozorována nejvyšší míra rezistence vůči penicilinu a nitrofurantoinu. *Aerococcus viridans* 6B také poskytoval rezistentní odpověď na penicilin a amoxicilin, na což upozorňuje i studie Mohan et al. (2017), ve které je diskutována kromě penicilinové a amoxicilinové rezistence také narůstající rezistence *A. viridans* na vankomycin. Rezistence *Kocuria* k nitrofurantoinu je považována za jedno z hlavních kritérií předběžné fenotypové identifikace druhů *Kocuria*. I přes to, že se zástupci rodu *Kocuria* vyskytují převážně jako komenzálové, někteří jsou klasifikováni jako důležité patogeny. U některých kmenů je popisována multirezistence, což by mohlo u patogenních kmenů představovat velký problém (Savini et al., 2010; Ramos et al., 2021). Většina rezistentních kmenů *Kocuria* je nejčastěji izolována z klinického materiálu, i přesto jsou hlášeny ojedinělé případy výskytu rezistentních kmenů v potravinách (Ramos et al., 2021). Ve studii Machado et al. (2020) potravinové izoláty *Kocuria* vykazovaly různou míru rezistence např. k penicilinu, oxacilinu, norfloxacinu, klindamycinu a erytromycinu. Gen *blaZ* determinující rezistenci k β -laktamům byl přítomný u všech námi testovaných izolátů *Kocuria*, *Aerococcus* a *Micrococcus* a většina z nich také nesla gen *norA*, včetně bakterie *Rothia amarae* 9G.

Patogenní druhy *S. aureus* a *S. epidermidis* jsou schopné způsobovat u lidí a zvířat různé druhy infekcí. Mezi závažné patogeny se řadí i někteří zástupci rodu *Kocuria*. V posledním desetiletí byl popsán význam potravního řetězce v přenosu antibiotické rezistence zejména na patogenní druhy. Nová zjištění poukazují na prevalenci širokého spektra komenzálních mikroorganismů, jako jsou např. koaguláza-negativní stafylokoky či izoláty čeledi *Micrococcaceae* (*Kocuria* spp., *Micrococcus* spp.) nesoucích geny rezistence v potravinách určených k přímé spotřebě, a proto by mohly potraviny v přenosu antibiotické rezistence hrát velkou roli (Ramos et al., 2021).

9.4 Tvorba biofilmu

V praktické části bylo provedeno testování schopnosti tvorby biofilmu u bakteriálních izolátů. Nejvyšší počet biofilm-pozitivních izolátů byl zjištěn u rodu *Staphylococcus*. Tvorba biofilmu byla prokázána u 80 % testovaných stafylokoků. Biofilm tvořilo 89 % koaguláza-negativních stafylokoků a 75 % koaguláza-pozitivních stafylokoků. To potvrzuje i studie Bissong, Ateba (2020), kteří se ve své studii zabývali tvorbou biofilmu u koaguláza-pozitivních *Staphylococcus aureus* izolovaných z pasterovaného mléka. Tvorba biofilmu byla zjištěna u 91 % izolátů *S. aureus*. Schopnost tvorby biofilmu je charakteristickým rysem také mnoha druhů koaguláza-negativních stafylokoků, zejména *S. epidermidis* a *S. hominis* (Rossi et al., 2020). Ve studii Zou, Liu (2020) zkoumali tvorbu biofilmu u *S. epidermidis* v závislosti na kultivační teplotě a dostupnosti živin, přičemž nejvyšší tvorba byla zjištěna při teplotě 37 °C. Tvorba biofilmu rostla se zvyšujícím se obsahem živin v médiu.

Bakterie rodu *Kocuria* jsou schopné adherovat na různé povrchy a vytvářet biofilm. Jsou hlášeny případy, kdy byly tyto bakterie izolovány z různých zařízení v potravinářské výrobě, kde tvořily společenství v biofilmu s jinými mikroorganismy (Raghupathi et al., 2016). Biofilmy umožňují mikroorganismům odolávat a přežít nepříznivé podmínky, včetně čistících a sanitačních procesů, což by mohlo zvýšit riziko křížové kontaminace v potravinářské výrobě. (Ramos et al., 2021) U celkem 63 % námi izolovaných kmenů *Kocuria* byla zjištěna tvorba biofilmu, z toho 60 % bylo klasifikováno se silnou tvorbou. Vysoká tvorba biofilmu je často hlášena u kmene *K. kristinae* izolovaného z klinických izolátů (Ananieva et al., 2018).

Z výsledků je patrné, že biofilm tvořily zejména izoláty rodů *Staphylococcus* a *Kocuria*. Biofilm by mohl poskytovat vhodné prostředí pro horizontální přenos genů mezi mikroorganismy nacházející se v biofilmu. V problematice šíření rezistence by mohly pravděpodobně hrát roli také mikroorganismy, jež jsou součástí lidské a zvířecí mikrobioty, jako např. čeleď *Micrococcaceae*. Zejména koaguláza-negativní stafylokokové druhy jako *S. epidermidis* a *S. hominis* a jiné, by mohly působit jako rezervoáry genů virulence a genů kódujících antibiotickou rezistenci. Tyto geny by mohly být následně přeneseny na více patogenní druhy, jako je např. *S. aureus*, čímž by mohlo dojít ke zvýšení jejich virulence a odolnosti vůči antimikrobiálním látkám (Rossi et al., 2020). Ve studii Savage et al. (2013) bylo prokázáno, že biofilmy *S. aureus* mohou zvyšovat rychlost konjugace a transformace plazmidů mezi buňkami biofilmu.

Vysoká buněčná hustota a mezibuněčný kontakt v matrici biofilmu by tak mohly usnadňovat horizontální přenos genů (Rossi et al., 2020). Zájmem mnoha studií je mimo jiné zjišťování tvorby biofilmu v mléce a mléčných výrobcích, ve kterých je biofilm často produkován koaguláza-negativními druhy, např. *S. epidermidis*, u kterého je často zjišťována multirezistence (Machado et al., 2020). Díky vysoké odolnosti biofilmu vůči tepelnému záhřevu či sanitačním a dezinfekčním procesům je však známo, že bakteriální buňky mohou snáze přežít na površích výrobních zařízeních, v prostředí potravinářských závodů či v samotných potravinách, stejně tak by mohly přežít i v sušeném ovoci či masových pomazánkách. K hlubšímu diskutování významu tvorby biofilmu v sušeném ovoci či masových konzervách je zapotřebí více studií, které by se touto problematikou zabývaly. Avšak dle námi získaných výsledků by se dalo usuzovat, že sušené ovoce či masová konzerva by mohly být potenciálními rezervoáry genů antibiotické rezistence a mohly by tak podporovat přenos těchto genů na alimentární patogeny.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala charakterizací vybraných grampozitivních koků izolovaných z mikrobiologicky nerizikových potravin: sušeného a lyofilizovaného ovoce a masových konzerv. V rámci charakterizace byl sledován růst koků v závislosti na použité kultivační teplotě, byla zkoumána tvorba biofilmu, dále byl také proveden skrínink citlivosti na antibiotika a kvalitativní detekce vybraných genů antibiotické rezistence.

Za pomoci metody MALDI-TOF a sekvenační analýzy byly identifikovány izolované bakteriální kmeny. Jednalo se o druhy *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. equorum*, *Kocuria kristinae*, *K. rhizophila*, *K. palustris*, *Micrococcus luteus*, *Rothia amarae* a *Aerococcus viridans*.

Na základě získaných výsledků charakterizace lze usuzovat, že:

- při sledování růstu měla většina grampozitivních izolátů schopnost růstu v rozmezí všech testovaných hodnot, tedy v rozmezí 20–40 °C,
- v rámci testování antibiotické rezistence vykazovaly grampozitivní koky nejvyšší míru rezistence k penicilinu, nitrofurantoinu a erytromycinu,
- nižší míra rezistence byla zjištěna vůči ampicilin/sulbaktamu, amoxicilinu, levofloxacinu a ciprofloxacinu,
- naopak citlivá byla většina kmenů na testovaná aminoglykosidová antibiotika, tetracykliny, linkosamidy, cefalosporiny, chloramfenikol a dále také na vankomycin,
- antibiotická multirezistence byla pozorována u většiny izolovaných kmenů rodů *Staphylococcus* a *Kocuria*,
- nejčastěji detekovaným genem u fenotypově rezistentních izolátů byly gen *blaZ* determinující rezistenci k β -laktamovým antibiotikům a gen *ermA* podmiňující rezistenci k erytromycinu, přičemž oba geny se vyskytovaly u všech testovaných fenotypově rezistentních kmenů, dále také gen *norA* determinující fluorochinolonovou rezistenci,
- biofilm-pozitivita byla pozorována nejčastěji u rodu *Staphylococcus*, schopnost tvorby biofilmu byla prokázána také u rodu *Kocuria*.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADAMS, Martin R. a MOSS, Maurice O., 2008. *Food microbiology: 3rd edition*. UK: The Royal Society of Chemistry. ISBN 978-0-85404-284-5.

ADAMS, Martin R.; MOSS, Maurice O. a MCCLURE, Peter J., 2016. *Food Microbiology: 4th edition*. Online. Royal Society of Chemistry (RSC). ISBN 978-1-84973-960-3. [cit. 2024-04-09].

ALP, Duygu a BULANTEKIN, Özcan, 2021. The microbiological quality of various foods dried by applying different drying methods: a review. Online. *European Food Research and Technology*. Roč. 247, s. 1333–1343. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00217-021-03731-z>. [cit. 2024-03-21].

ANANIEVA, M. M.; NAZARCHUK, O. A.; FAUSTOVA, M. O.; BASARAB, Ya. O. a LOBAN, G. A., 2018. Pathogenicity Factors of *Kocuria kristinae* Contributing to the Development of Peri-Implant Mucositis. Online. *Malaysiann Journal of Medicine and Health Sciences*. Roč. 14, č. 3, s. 34–38. ISSN 2636-9346. Dostupné z: <http://repository.pdmu.edu.ua/handle/123456789/8728>. [cit. 2024-04-18].

BARBOSA-CANOVAS, Gustavo V.; FONTANA JR., Anthony J.; SCHMID, Shelly J. a LABUZA, Theodore P., 2020. *Water activity in foods: fundamentals and applications*. 2nd edition. Chicago: John Wiley and sons, Institute of Food Technologists. ISBN 9781118768310.

Bariérová teorie: Minimálně opracované potraviny, 2016. Online. In: VŠCHT v Praze. Dostupné z: https://ukp.vscht.cz/files/uzel/0007649/MzSJ983My8w9vDAn78hshfyCosTk_LLEvMMrFQryS4oSyzLzKuONDAzNAA.pdf?redirected. [cit. 2024-04-16].

BECKER, Karsten; RUTSCH, Frank; UEKÖTTER, Andreas; KIPP, Frank; KÖNIG, Jens et al., 2008. *Kocuria rhizophila* Adds to the Emerging Spectrum of Micrococcal Species Involved in Human Infections. Online. *Journal of Clinical Microbiology*. S. 3537–3539. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JCM.00823-08>. [cit. 2024-04-15].

BENNETT, Reginald W. a MONDAY, Steven R., 2003. *Staphylococcus aureus* 1st Edition. Online. In: *International Handbook of Foodborne Pathogens*. ISBN 9780429222955. [cit. 2023-04-13].

- BERK, Zeki, 2013. Freeze Drying (Lyophilization) and Freeze Concentration. Online. *Food Process Engineering and Technology*. S. 567-581. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415923-5.00023-X>. [cit. 2024-04-07].
- BEUCHAT, LARRY R.; KOMITOPOULOU, EVANGELIA; BECKERS, HARRY; BETTS, ROY P.; BOURDICHON, FRANÇOIS et al., 2013. Low--Water Activity Foods: Increased Concern as Vehicles of Foodborne Pathogens. Online. *Journal of Food Protection*. Roč. 76, č. 1, s. 150-172. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-211>. [cit. 2024-03-25].
- BHATTA, Sagar; STEVANOVIC JANEZIC, Tatjana a RATTI, Cristina, 2020. Freeze-Drying of Plant-Based Foods. Online. *Foods*. Roč. 13, č. 9. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods9010087>. [cit. 2024-04-07].
- BISSONG, Marie Ebob Agbortabot a ATEBA, Collins Njie, 2020. Genotypic and Phenotypic Evaluation of Biofilm Production and Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk, North West Province, South Africa. Online. *Antibiotics*. Roč. 9, č. 4. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antibiotics9040156>. [cit. 2024-04-16].
- BLACKBURN, Clive de, W., 2006. *Food Spoilage Microorganisms*. Online. Woodhead Publishing. ISBN 978-1-85573-966-6. [cit. 2024-04-11].
- BOURDICHON, François; BETTS, Roy; DUFOUR, Christophe; FANNING, Séamus; FARBER, Jeffrey et al., 2021. Processing environment monitoring in low moisture food production facilities: Are we looking for the right microorganisms? Online. *International Journal of Food Microbiology*. Roč. 356, č. 109351. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109351>. [cit. 2024-03-21].
- BOURDOUX, Siméon; LI, Dan; RAJKOVIC, Andreja; DEVLIEGHERE, Frank a UYTENDAELE, Mieke, 2016. Performance of Drying Technologies to Ensure Microbial Safety of Dried Fruits and Vegetables. Online. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. Roč. 15, č. 6. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12224>. [cit. 2024-03-25].
- CAMPO-PÉREZ, Víctor; ALCÁCER-ALMANSA, Júlia; JULIÁN, Esther a TORRENTS, Eduard, 2023. A High-Throughput Microtiter Plate Screening Assay to Quantify and Differentiate Species in Dual-Species Biofilms. Online. *Microorganisms*. Č. 11. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms11092244>. [cit. 2024-02-26].

DEAK, Tibor a FARKAS, József, 2013. *Microbiology of Thermally Preserved Foods – Canning and Novel Physical Methods*. DEStech Publications. ISBN 978-1-60595-033-4. [cit. 2024-04-15].

DIKEMAN, Michael a DEVINE, Carrick, 2014. *Encyclopedia of Meat Sciences (2nd Edition)*. Online. ISBN 978-0-12-384731-7. [cit. 2024-04-14].

DNeasy Blood & Tissue Kit, 2023. Online. Qiagen. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit>. [cit. 2024-02-25].

DOBIÁŠ, Jaroslav, 2004. Technologie zpracování ovoce a zeleniny I. Online. *Provizorní učební text*. Dostupné z: <https://ukp.vscht.cz/files/uzel/0007223/q0rNsc3LzEuMNwQA.pdf?redirected>. [cit. 2024-04-08].

DOYLE, Michael P. a BUCHANAN, Robert L., 2013. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Online. 4th Edition. ASM Press. ISBN 9781555816261. [cit. 2024-04-08].

DURAN, Nizami; OZER, Burcin; DURAN, Gulay Gulbol; ONLEN, Yusuf a DEMIR, Cemil, 2012. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. Online. *The Indian Journal of Medical Research*. Article 135, s. 389-396. PMID: 22561627; PMID: PMC3361877, Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3361877/>. [cit. 2024-02-25].

ERKMEN, Osman a BOZOGLU, T.Faruk, 2016. *Food Microbiology Principles into Practice*. Online. Oxford: John Wiley. ISBN 9781119237761. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119237860.fmatter>. [cit. 2024-03-26].

EUCAST, 2023. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 13.1, valid from 2023-06-29. Online. Dostupné z: <https://www.eucast.org>. [cit. 2024-02-25].

FATAHI-BAFGHI, Mehdi, 2021. Characterization of the *Rothia* spp. and their role in human clinical infections. Online. *Infection, Genetics and Evolution*. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104877>. [cit. 2023-04-15].

FOSTER, Timothy J.; GEOGHEGAN, Joan A.; GANESH, Vannakambadi K. a HÖÖK, Magnus, 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Online. *Nat Rev Microbiol*. Roč. 12, č. 1, s. 49-62. Dostupné z:

PMID: 24336184, PMCID: PMC5708296, <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>. [cit. 2024-04-17].

GRISPOLDI, Luca; KARAMA, Musafiri; ARMANI, Andrea; HADJICHARALAMBOUS, Chrystalleni a CENCI-GOGA, Beniamino T., 2020. Staphylococcus aureus enterotoxin in food of animal origin and staphylococcal food poisoning risk assessment from farm to table. Online. *Italian Journal of Animal Science*. Roč. 20, č. 1, s. 677-690. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1871428>. [cit. 2024-04-16].

GRUMEZESCU, Alexandru Mihai, 2017. Nanotechnology in the Agri-Food Industry. Online. In: *Food Preservation*. Volume 6. Elsevier. ISBN 978-0-12-804303-5. [cit. 2024-04-09].

GRUMEZESCU, Alexandru Mihai a HOLBAN, Alina Maria, 2018. Leading Factors of Microbial Growth in Food. Online. In: *Food Safety and Preservation - Modern Biological Approaches to Improving Consumer Health*. Elsevier. ISBN 978-0-12-814956-0. [cit. 2024-04-09].

HAMAD, Siddig Hussein, 2012. *Progress in Food Preservation Modelling: Factors Affecting the Growth of Microorganisms in Food*. Online. John Wiley. ISBN 9780470655856. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119962045.ch20>. [cit. 2024-04-15].

CHEKOL, Yonas a ASHENAFI, Mogessie, 2009. Microbiological analysis and safety evaluation of various canned foods in Addis Ababa. Online. *Ethiop. J. Biol. Sci.* Č. 8(1), s. 53-69. ISSN 1819-8678. [cit. 2024-04-10].

Chemie potravin – cvičení: VŠCHT v Praze, 2024. Online. Dostupné z: <https://docplayer.cz/14990382-Chemie-potravin-cviceni-uvod-voda.html>. [cit. 2024-04-15].

CHUA, K.J. a CHOU, S.K., 2014. Recent Advances in Hybrid Drying Technologies. Online. In: *Emerging Technologies for Food Processing*. S. 447–459. Dostupné z: 10.1016/B978-0-12-411479-1.00024-3. [cit. 2024-04-09].

ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2024. Online. Dostupné z: <https://www.icmsf.org/>. [cit. 2024-04-30].

ICMSF: Microorganisms in food, 2011. Online. 2nd Edition. Kluwer Academic/Plenum Publishers. ISBN 0306472627. [cit. 2024-04-11].

IFIS: International Food Information Service, 2009. Online. International Food Information Service (IFIS Publishing). ISBN 978-1-4051-8740-4. [cit. 2024-04-11].

JAYARAMAN, K. S. a GUPTA, D. K. Das, 2020. Drying of Fruits and Vegetables. Online. *Handbook of Industrial Drying*. S. 643–690. [cit. 2024-04-09].

JIA, Kai; FANG, Taisong; WANG, Xiang; LIU, Yangtai; SUN, Wanxia et al., 2020. Antibiotic Resistance Patterns of Staphylococcus aureus Isolates from Retail Foods in Mainland China: A Meta-Analysis. Online. *Foodborne Pathogens and Disease*. Roč. 17, č. 5. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2686>. [cit. 2024-04-16].

KADLEC, Pavel, 2003. *Procesy potravinářských a biochemických výrob*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 8070805277.

Konzervárenství: prodloužení poživatelnosti potravin, 2024. Online. Dostupné z: <https://docplayer.cz/15515171-Konzervarenstvi-prodlouzeni-pozivatelnosti-potravin-ovoce-zelenina-maso.html>. [cit. 2024-05-02].

KŘIVSKÁ, Anna; LEFNEROVÁ, Danuše a ZVĚŘINA, Ondřej, 2019. Sušené ovoce a jeho bezpečnost. Online. *Výživa a potraviny*. Article 4, s. 90-94. Dostupné z: <https://www.vyzivaspol.cz/wp-content/uploads/2019/09/susene-ovoce.pdf>. [cit. 2024-04-11].

LIM, Eun Seob; LEE, Jang Eun; KIM, Joo-Sung a KOO, Ok Kyung, 2017. Isolation of indigenous bacteria from a cafeteria kitchen and their biofilm formation and disinfectant susceptibility. Online. *LWT-Food Science and Technology*. Roč. 77, s. 376-382. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.060>. [cit. 2024-04-12].

MACHADO, M. A. A.; RIBEIRO, W. A.; TOLEDO, V. S.; RAMOS, G. L. P. A.; VIGODER, H. C. et al., 2020. Antibiotic resistance and biofilm production in Gram-positive catalase-positive cocci isolated from Brazilian pasteurized milk. Online. *J. Food Qual. Hazards Control*. Roč. 7, s. 67-74. Dostupné z: <https://doi.org/10.18502/jfqhc.7.2.2886>. [cit. 2024-04-17].

MALEKJANI, Narjes a JAFARI, Seid Mahdi, 2023. *Drying Technology in Food Processing – Unit Operations and Processing Equipment in the Food Industry*. Online. Elsevier. ISBN 978-0-12-819895-7. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819895-7.00020-1>. [cit. 2024-04-08].

MANI, Purusothaman a VALARMATHI, Thirumalai Natesan, 2021. Experimental investigation of drying characteristics of lima beans with passive and active mode greenhouse solar dryers. Online. *Journal of Food Process Engineering*. Roč. 44, č. 5. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpe.13667>. [cit. 2024-04-09].

MATOUJKOVÁ, Dagmar; KUBIZNIAKOVÁ, Petra a BROŽOVÁ, Martina, 2018. Mikrobiologie pivovarské výroby – bakterie *Kocuria* (*Micrococcus*) a kultivační metody pro jejich detekci – 1. část. Online. *Kvasný průmysl*. Roč. 64(4), s. 156-160. Dostupné z: <https://doi.org/10.18832/kp201804>. [cit. 2023-04-15].

MEDVEĐOVÁ, Alžbeta; STUDENIČOVÁ, Adriana; LEHOTOVÁ, Adriana a VALÍK, Ľubomír Valík, 2019. *Staphylococcus aureus* 2064 growth as affected by temperature and reduced water activity. Online. *Italian Journal of Food Safety*. Roč. 8, č. 4. Dostupné z: PMID: PMC6912147 PMID: 31897398, <https://doi.org/10.4081/ijfs.2019.8287>. [cit. 2024-04-16].

MOHAN, Balvinder; ZAMAN, Kamran; ANAND, Naveen a TANEJA, Neelam, 2017. *Aerococcus Viridans*: A Rare Pathogen Causing Urinary Tract Infection. Online. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. Article 11(1), s. DR01–DR03. Dostupné z: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/23997.9229>. PMID: PMC5324413, PMID: 28273968, [cit. 2024-04-11].

MONTVILLE, Thomas J.; MATTHEWS, Karl R. a KNIEL, Kalmia E., 2012. *Food microbiology: an introduction*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press. ISBN 978-1-55581-720-6.

MOTARJEMI, Yasmine; MOY, Gerald a TODD, Ewen, 2014. *Encyclopedia of Food Safety*. Online. ISBN 978-0-12-378612-8. [cit. 2024-04-15].

NTULI, Victor; CHATANGA, Peter; KWIRI, Raphael; GADAGA, Henry Tendekayi; GERE, Jephris et al., 2017. Microbiological quality of selected dried fruits and vegetables in Maseru, Lesotho. Online. *African Journal of Microbiology Research*. Roč. 11, č. 5, s. 185-193. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8130>. [cit. 2024-04-14].

ONYEAKA, Helen N. a NWABOR, Ozioma F., 2022. *Food Preservation and Safety of Natural Products*. Online. Elsevier. ISBN 978-0-323-85700-0. [cit. 2024-04-12].

PROSAPIO, Valentina a LOPEZ-QUIROGA, Estefania, 2020. Freeze-Drying Technology in Foods. Online. *Foods*. Roč. 9, č. 7. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods9070920>. [cit. 2024-03-25].

PURTY, Shashikala; SARANATHAN, Rajagopalan; PRASHANTH, K.; NARAYANAN, K.; ASIR, Johny et al., 2013. The expanding spectrum of human infections caused by *Kocuria* species: a case report and literature review. Online. *Emerging Microbes and Infections*. Roč. 2, č. 10., PMID: PMC3826069, PMID: 26038440, Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/emi.2013.71>. [cit. 2024-04-10].

RAGHUPATHI, Prem K.; HERSCHEID, Jakob; RØDER, Henriette L.; SØRENSEN, Søren J. a BURMØLLE, Mette, 2016. Genome Sequence of *Kocuria varians* G6 Isolated from a Slaughterhouse in Denmark. Online. *Genome Announcements*. Roč. 4, č. 2. Dostupné z: PMID: PMC4816608, PMID: 27034480, <https://doi.org/10.1128/genomeA.00076-16>. [cit. 2024-04-15].

RAMOS, Gustavo Luis de Paiva Anciens; VIGODER, Hilana Ceotto a NASCIMENTO, Janaina dos Santos, 2021. *Kocuria* spp.in Foods: Biotechnological Uses and Risks for Food Safety. Online. *Applied Food Biotechnology*. Roč. 8, č. 2, s. 79-88. ISSN 2423-4214. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.22037/afb.v8i2.30748>. [cit. 2023-04-14].

ROSSI, Ciro César; PEREIRA, Monalessa Fábila a GIAMBIAGI-DEMARVAL, Marcia, 2020. Underrated *Staphylococcus* species and their role in antimicrobial resistance spreading. Online. *Genetics and Molecular Biology*. Roč. 43, č. 1. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0065>. [cit. 2024-04-16].

RTS 1-C PERSONAL BIOREACTOR, 2018. Biosan. Online. Dostupné z: <https://biosan.lv/products/rts-1c-real-time-cell-growth-logger-2/>. [cit. 2024-02-26].

SAVAGE, Victoria J.; CHOPRA, Ian a O'NEILL, Alex J., 2013. *Staphylococcus aureus* Biofilms Promote Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance. Online. *Antimicrob Agents Chemother*. Roč. 57, č. 4, s. 1968–1970. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AAC.02008-12>. [cit. 2024-04-17].

SHAH, Asima Sajad; BHAT, S. V.; MUZAFFAR, Khalid; IBRAHIM, Salam A. a DAR, B.N., 2022. Processing Technology, Chemical Composition, Microbial Quality and Health Benefits of Dried Fruits. Online. *Current Research in Nutrition and Food Science*. Roč. 10, č. 1, s. 71-84. ISSN 2347-467X. [cit. 2024-04-15].

SAVINI, Vincenzo; CATAVITELLO, Chiara; MASCIARELLI, Gioviana; ASTOLFI, Daniela; BALBINOT, Andrea et al., 2010. Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*. Online. *Journal of Medical Microbiology*. Č. 59, s. 1395-402. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.021709-0>. [cit. 2024-02-25].

SHAMS, Rafeeya; SINGH, Jagmohan; K. DASH, Kshirod a DAR, Aamir Hussain, 2022. Comparative study of freeze drying and cabinet drying of button mushroom. Online. *Applied Food Research*. Roč. 2, č. 1. ISSN 2772-5022. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100084>. [cit. 2024-03-25].

SILVA-ESPINOZA, Marilú A.; AYED, Charfedinne; FOSTER, Timothy; DEL MAR CAMACHO, María a MARTÍNEZ-NAVARRETE, Nuria, 2020. The Impact of Freeze-Drying Conditions on the Physico-Chemical Properties and Bioactive Compounds of a Freeze-Dried Orange Puree. Online. *Foods*. Roč. 9, č. 1. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods9010032>. [cit. 2024-03-26].

SKIBSTED, Leif H.; RISBO, Jens a ANDERSEN, Mogens L., 2010. *Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages*. Woodhead Publishing. ISBN 978-1-84569-495-1. [cit. 2024-04-14].

SPRIselect User Guide, 2012. Online. Dostupné z: <http://www.beckmancoulter.com/>. [cit. 2024-02-26].

SUNDARARAJ, Naveen; KALAGATUR, Naveen Kumar; MUDILI, Venkataramana; KRISHNA, Kadirvelu a ANTONYSAMY, Michael, 2019. Isolation and identification of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates from Indian food samples: evaluation of in-house developed aptamer linked sandwich ELISA (ALISA) method. Online. *Journal of Food Science and Technology*. Roč. 56 (2), s. 1016–1026. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13197-019-03568-1>. [cit. 2023-04-13].

SYAMALADEVI, Roopesh M.; TANG, Juming; VILLA-ROJAS, Rossana; SABLANI, Shyam; CARTER, Brady et al., 2016. Influence of Water Activity on Thermal Resistance of Microorganisms in Low-Moisture Foods: A Review. Online. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. Roč. 15, č. 2, s. 353-370. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12190>. [cit. 2024-03-27].

URBAN-CHMIEL, Renata; MAREK, Agnieszka; STĘPIEŃ-PYŚNIAK, Dagmara; WIECZOREK, Kinga; DEC, Marta et al., 2022. Antibiotic Resistance in Bacteria—A

Review. Online. *Antibiotics*. Roč. 11, č. 8. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antibiotics11081079>. [cit. 2024-04-16].

VINNIKOVA, L.; SYNYTSIA, O. a KYSHENIA, A., 2019. The problems of meat products thermal treatment. Online. *Food Science & Technology*. Roč. 13, č. 2. Dostupné z: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15673/fst.v13i2.1386>. [cit. 2024-04-13].

Vyhláška č. 69/2016 Sb., o požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich, 2016. In: *Zákony pro lidi*. 26/2016. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2016-69?text=69%2F2016>.

Vyhláška č. 397/2021 Sb., o požadavcích na konzervované ovoce a konzervovanou zeleninu, skořápkové plody, houby, brambory a výrobky z nich a banány, 2021. In: *Zákony pro lidi*. 178/2021. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2021-397>.

WAREING, Peter; FELICITY, Stuart a RHEA, Fernandes, 2010. *Micro-Facts – The Working Companion for Food Microbiologists, 7th Edition*. Online. Royal Society of Chemistry (RSC). ISBN 978-1-905224-84-5. [cit. 2024-04-11].

WILLIAMS, R. E. O.; HIRCH, A. a COWAN, S.T., 1953. *Aerococcus*, a New Bacterial Genus. Online. *J. gen. Microbiol.* Roč. 8, č. 3, s. 475-480. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00221287-8-3-475>. [cit. 2024-04-11].

ZHU, Tingwei; YANG, Chenxian; BAO, Xuerui; CHEN, Fusheng a GUO, Xingfeng, 2022. Strategies for controlling biofilm formation in food industry. Online. *Grain & Oil Science and Technology*. Roč. 5, č. 4, s. 179-186. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gaost.2022.06.003>. [cit. 2024-04-12].

ZOU, Mingming a LIU, Donghong, 2020. Effects of carbon sources and temperature on the formation and structural characteristics of food-related *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Online. *Food Science and Human Wellness*. Roč. 9, č. 4, s. 370-376. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fshw.2020.05.007>. [cit. 2024-04-16].

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

a_w	aktivita vody
BHI	mozko-srdcová infuze
bp	párů bází
CFU	kolonie tvořící jednotky
CV	cut-off value (mezní hodnota)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E_h	oxidačně-redukční potenciál
HACCP	systém analýzy rizik a kritických kontrolních bodů
KoN	koaguláza-negativní
KoP	koaguláza-pozitivní
$\log x$	logaritmus
mA	miliampér
MALDI-TOF	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace
NIR	blízké infračervenému spektru
OD	optická hustota
p	tlak vodní páry nad potravinou
p_0	tlak vodní páry nad čistým rozpouštědlem
Pa	pascal
PCR	polymerázová řetězová reakce
pH	potenciál vodíku
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
SHP	správná hygienická praxe
V	volt
W	watt
QS	quorum sensing

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Fázový diagram vody a podmínky sublimace (upraveno dle Berk, 2013)	18
Obrázek 2: Termoinaktivační křivky mikroorganismů pro kyselé potraviny (upraveno dle Konzervářství, 2024).....	22
Obrázek 3: Růstová křivka (upraveno dle Adams, Moss, 2008).....	25
Obrázek 4: Bariérová teorie (upraveno dle Bariérová teorie, 2016).....	31
Obrázek 5: Postup izolace DNA pomocí kitu (upraveno dle DNeasy Blood & Tissue Kit, 2023).....	48
Obrázek 6: Krok purifikace DNA za použití SPRISelect.....	51
Obrázek 7: Postup purifikace DNA pomocí SPRISelect (upraveno dle SPRIselect User Guide, 2012)	51
Obrázek 8: Aplikace antibiotických disků na zaočkované plotně s MH agarem (vlevo), komerční antibiotické disky (vpravo)	54
Obrázek 9: Postup Christensenovy metody v mikrotitrační destičce pro stanovení tvorby biofilmu (upraveno dle Campo-Pérez et al., 2023).....	57
Obrázek 10: Růst <i>Staphylococcus epidermidis</i> D1 izolovaného z masové pomazánky při různých teplotách.....	61
Obrázek 11: Růst <i>Staphylococcus hominis</i> J1 izolovaného z masové pomazánky při různých teplotách.....	62
Obrázek 12: Růst <i>Staphylococcus aureus</i> 22B izolovaného ze sušeného jablka při různých teplotách.....	63
Obrázek 13: Růst <i>Staphylococcus warneri</i> 4J izolovaného ze sušené pitayi při různých teplotách.....	63
Obrázek 14: Růst <i>Staphylococcus equorum</i> 6A izolovaného z lyofilizovaného banánu při různých teplotách.....	64
Obrázek 15: Růst <i>Aerococcus viridans</i> 6B izolovaného z lyofilizovaného banánu při různých teplotách.....	65
Obrázek 16: Růst <i>Micrococcus luteus</i> F2 izolovaného z masové pomazánky při různých teplotách.....	65
Obrázek 17: Růst <i>Kocuria kristinae</i> 9B izolovaného z lyofilizovaného manga při různých teplotách.....	66
Obrázek 18: Růst <i>Kocuria rhizophila</i> F1 izolovaného z masové pomazánky při různých teplotách.....	67
Obrázek 19: Růst <i>Kocuria palustris</i> 4Q izolovaného ze sušené pitayi při různých teplotách	67

Obrázek 20: Růst <i>Rothia amarae</i> izolovaného z lyofilizovaného manga při různých teplotách	68
Obrázek 21: Testování antibiotické rezistence diskovou difuzní metodou	69
Obrázek 22: Zastoupení rezistentních, intermediárních a citlivých izolátů <i>Staphylococcus</i> k testovaným antimikrobiálním látkám (číslo udává počet izolátů)	71
Obrázek 23: Zastoupení rezistentních, intermediárních a citlivých izolátů <i>Aerococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Kocuria</i> a <i>Rothia</i> (číslo udává počet izolátů)	75
Obrázek 24: Zastoupení rezistence u testovaných grampozitivních koků (číslo udává počet izolátů)	77
Obrázek 25: Výsledek gelové elektroforézy – gradientová PCR pro geny <i>blaZ</i> , <i>ermB</i> , <i>norA</i> a <i>ermC</i>	78
Obrázek 26: Výsledek detekce genu <i>blaZ</i> u testovaných izolátů	81
Obrázek 27: Výsledek detekce genu <i>norA</i> u testovaných izolátů	82
Obrázek 28: Výsledek detekce genu <i>ermC</i> u testovaných izolátů	82
Obrázek 29: Výsledek detekce genu <i>cat</i> u testovaných izolátů	83
Obrázek 30: Četnost výskytu testovaných genů rezistence u testovaných grampozitivních koků (číslo x/y udává počet pozitivních kměňů/počet testovaných kmenů)	83
Obrázek 31: Tvorba biofilmu u testovaných grampozitivních koků	86

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Požadavky na sušené ovoce dle Vyhlášky č. 397/2021 Sb.	17
Tabulka 2: Minimální hodnoty a_w pro růst mikroorganismů (upraveno dle Montville et al., 2012)	27
Tabulka 3: Rozmezí pH u vybraných potravin (upraveno dle Montville et al., 2012).....	28
Tabulka 4: Kategorie mikroorganismů dle jejich teplotního rozmezí růstu (upraveno dle Adams et al., 2016)	29
Tabulka 5: Testované vzorky sušeného a lyofilizovaného ovoce.....	40
Tabulka 6: Seznam použitých kultivačních médií	41
Tabulka 7: Seznam použitých antimikrobiálních látek.....	42
Tabulka 8: Společné reakční komponenty pro amplifikaci jednoho vzorku DNA určené k sekvenaci.....	49
Tabulka 9: Zvolený program pro amplifikaci DNA určené k sekvenaci.....	49
Tabulka 10: Parametry kultivace testovaných kmenů v RTS-bioreaktoru	53
Tabulka 11: Sekvence primerů vybraných genů antibiotické rezistence, očekávané velikosti amplifikovaných produktů a použitá teplota annealingu (Duran et al., 2012)	55
Tabulka 12: Zvolený program PCR pro amplifikaci úseků genů antibiotické rezistence ...	56
Tabulka 13: Interpretace výsledků MALDI-TOF	58
Tabulka 14: Výsledky identifikace izolovaných kmenů metodou MALDI-TOF.....	59
Tabulka 15: Výsledky identifikace izolovaných kmenů metodou sekvenace	60
Tabulka 16: Antibiotická rezistence u rodu <i>Staphylococcus</i>	72
Tabulka 17: Antibiotická rezistence u rodů <i>Aerococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Kocuria</i> a <i>Rothia</i> .	76
Tabulka 18: Výskyt genů antibiotické rezistence u izolátů <i>Staphylococcus</i> spp.....	79
Tabulka 19: Výskyt genů antibiotické rezistence u izolátu <i>Aerococcus</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp., <i>Kocuria</i> spp. a <i>Rothia</i> spp.	80
Tabulka 20: Limitní hodnoty pro hodnocení tvorby biofilmu testovanými izoláty bakterií	84
Tabulka 21: Vyhodnocení tvorby biofilmu u testovaných grampozitivních koků	85