

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Výskyt bakterií rodu *Bacillus* v potravinách

Diplomová práce

Bc. Rozkovcová Štěpánka

Kvalita a zpracování zemědělských produktů

Ing. Hana Salmonová, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Výskyt bakterií rodu *Bacillus* v potravinách" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4.2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Haně Salmonové, Ph.D. za odborné vedení a poskytnutí cenných rad a připomínek při psaní této práce. Zároveň bych také ráda poděkovala své rodině a partnerovi, za jejich podporu a trpělivost během studií.

Výskyt bakterií rodu *Bacillus* v potravinách

Souhrn

Aerobní sporulující organismy představují velkou výzvu v potravinářském průmyslu. Díky schopnosti tvorby spór přežívají pasterační teploty, některé termorezistentní druhy i ošetření UHT. Jsou také schopné přežít vysoký osmotický tlak a nízkou vodní aktivitu. Ve vhodných podmínkách pak spóry klíčí a vegetativní formy mohou znehodnocovat potraviny činností enzymů či způsobovat alimentární onemocnění produkcí toxinů. Jedním z hlavních a nejčastěji se vyskytujícím rodem v potravinách je rod *Bacillus*. Cílem diplomové práce byl monitoring výskytu těchto bakterií v různých typech potravin jako je mléko a mléčné výrobky, med, maso a různé dehydratované výrobky a jejich následná druhová identifikace.

Počty aerobních sporulujících bakterií byly stanoveny kultivační metodou na trypton sójovém agaru. Dále byly izolovány čisté kultury, které byly následně identifikovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

V práci bylo celkem testováno 36 vzorků, ze kterých bylo 17 pozitivních na přítomnost *Bacillus* spp. Celkem bylo izolováno a identifikováno 103 bakteriálních kmenů. *Bacillus* byl zastoupen v 52,4 %, kdy nejčastěji se vyskytoval *B. subtilis*. Dalšími izolovanými druhy byly *B. mojavensis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. vallismortis*, *B. atropheus*, *B. altitudinis* a *B. mycoides*. Z izolovaných kolonií byly zjištěny i nesporulující bakterie, nejvíce zastoupené druhy *Lelliottia amnigena* a *Hafnia alvei*. Žádný z druhů nebyl nalezen ve všech typech vzorků, přičemž nejrozšířenější byl *B. subtilis*. Tento druh byl nalezen u 4 skupin potravin, zatímco další druhy se vyskytovaly u 1 až 3 skupin.

Z výsledků vyplývá, že výrobky ošetřené vysokou teplotou, s vysokým osmotickým tlakem nebo nízkou vodní aktivitou obsahují spóry rodu *Bacillus*. Dále záleží na tom, o jaký typ potraviny se jedná. Proto by bylo vhodné, zavést právně vymahatelné kontroly jeho výskytu u všech potravin, jelikož v současnosti je výskyt sledován pouze u sušené počáteční kojenecké výživy a sušených dietních potravin pro kojenče.

Klíčová slova: *Bacillus*, kažení potravin, alimentární onemocnění, enterotoxiny, emetický toxin

Prevalence of *Bacillus* spp. in foodstuff

Summary

Aerobic spore forming bacteria represent a big challenge in the food industry. Due to their ability of spore formation, they can survive pasteurization temperatures. Some thermoresistant species are also able to survive UHT treatments. These organisms can also survive high osmotic pressure and low water activity. In appropriate conditions, spores germinate and vegetative forms can degrade food by enzymatic action. They are also the cause of foodborne diseases because of their ability to produce toxins. One of the important and most common genus in food is the genus *Bacillus*. Thus, the aim of this thesis was monitor the occurrence of these bacteria in various types of food such as milk and dairy products, honey, meat and various dehydrated products and their subsequent species identification.

The counts of aerobic spore forming bacteria were determined by the cultivation method on tryptone soybean agar. Furthermore, pure cultures were isolated and subsequently identified by MADI-TOF mass spektrometry.

From 36 tested samples, 17 were positive for *Bacillus* spp. A total of 103 bacterial strains were isolated and identified. *Bacillus* was represented in 52.4 % with *B. subtilis* being the most common species. Other isolated species were *B. mojavensis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. vallismortis*, *B. atrophaeus*, *B. altitudinis* and *B. mycoides*. Out of non-spore forming bacteria, species of *Lelliottia amnigena* and *Hafnia alvei*, were isolated in highest counts. None of the *Bacillus* species were found in all types of samples, with *B. subtilis* being the most prevalent. This species was found in 4 groups of food, while the other species were found in 1 to 3 groups.

Results show that high temperature, high osmotic pressure or low water activity don't affect the occurrence of *Bacillus* spores in food. It was found that the occurrence and species diversity depend on type of food. Therefore, it would be appropriate to introduce legally enforceable controls on its occurrence for all foodstuffs, as currently the incidence is only monitored for dried infant formulas and dried dietary foods for infants.

Keywords: *Bacillus*, food spoilage, foodborne illness, enterotoxins, emetic toxins

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce a hypotéza	2
3 Literární rešerše.....	3
3.1 Charakteristika rodu <i>Bacillus</i>.....	3
3.1.1 Druhy významné v potravinářství.....	5
3.1.1.1 Skupina <i>Bacillus subtilis</i>	5
3.1.1.2 Skupina <i>Bacillus cereus</i>	7
3.2 Výskyt <i>Bacillus spp.</i>	12
3.2.1 Výskyt v potravinách.....	13
3.2.1.1 Výskyt v mléce a mléčných výrobcích.....	13
3.2.1.2 Výskyt v dehydratovaných výrobcích.....	14
3.2.1.3 Výskyt v ostatních potravinách.....	17
3.3 Využití <i>Bacillus</i>	17
3.3.1 Probiotika.....	17
3.3.2 Antimikrobiální látky.....	20
3.3.2.1 Bakteriociny.....	20
3.3.2.2 Antibiotika.....	22
3.3.3 Ostatní využití.....	23
3.4 Legislativa	23
3.5 Metody stanovení a identifikace	24
3.5.1 Kultivační metody.....	25
3.5.2 Sérologické metody	25
3.5.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	26
3.5.4 Pulzní gelová elektroforéza	29
3.5.5 MALDI-TOF	29
4 Materiál a metody	31
4.1 Testované vzorky.....	31
4.2 Mikrobiologický rozbor.....	32
4.3 Izolace čistých kultur	33
4.4 Identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie	33
5 Výsledky	34
5.1 Bylinné čajové směsi	36
5.2 Dehydratované omáčky	36
5.3 Dětské výživy	36
5.4 Koření.....	36
5.5 Marmeláda, džem, med	37
5.6 Mléko.....	37
5.7 Potraviny s vysokým obsahem proteinů	37
5.8 Přílohy	37
5.9 Sypké směsi pro přípravu nápojů.....	37
6 Diskuze.....	38
7 Závěr	45
8 Seznam literatury.....	46
9 Samostatné přílohy	60

1 Úvod

Rod *Bacillus* zahrnuje prakticky všudypřítomné bakterie s obrovským významem pro člověka. Je to rozsáhlá skupina grampozitivních bakterií, které se běžně vyskytují v půdě, vzduchu, vodě, rostlinných a živočišných materiálech, odkud se pomocí endospór šíří přes kontaminované suroviny dále do potravin. Zde některé druhy způsobují kažení, a to i přesto, že existují kroky, které by měly rozvoj mikroorganismů potlačit. Ve formě spór mohou přežívat i několik let a jejich aktivace na vegetativní formy je možná během pár minut. Z tohoto důvodu je pro zachování kvality a bezpečnosti velmi důležitý monitoring bakterií rodu *Bacillus* v potravinách.

Nejvýznamnějším patogenním druhem tohoto rodu, a zároveň 3. nejčastějším bakteriálním původcem nemocí v Evropě, je *Bacillus cereus*, který způsobuje dvě odlišné formy onemocnění: průjemové a emetické. Příznaky těchto onemocnění jsou mírné a krátkodobé a pro jejich vznik je zapotřebí alespoň 10^5 KTJ/g potravin. Mezi nejčastěji napadané potraviny lze například řadit běžně používané mléko a mléčné výrobky, dehydratované výrobky a maso. V současnosti existuje Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007, které stanovuje předpokládaný výskyt *B. cereus* pouze u sušené počáteční kojenecké výživy a u sušených dietních potravin pro kojence, jelikož děti jsou náchylnější k tomuto onemocnění. Dále také existuje ČSN 56 9609, která doporučuje monitoring *B. cereus* v lahůdkářských výrobcích s majonézou i bez ní, v pekařských a cukrářských výrobcích (chlazených i zmrazených), mléčných pudincích, krémech a dezertech.

Na druhou stranu, některé bacily jsou považovány za žádoucí a prospěšné. V potravinářství se využívají pro výrobu tradičních fermentovaných potravin. V těchto procesech jsou uplatňovány mikrobiální enzymy, které napomáhají vzniku typických sensoricky aktivních látek. Některé druhy či kmeny bacilů také produkují antimikrobiální látky, které působí konzervačně. Z těchto mají v potravinářství uplatnění zejména organické kyseliny a bakteriociny.

2 Cíl práce a hypotéza

Hypotéza:

Vybrané druhy potravin budou obsahovat bakterie rodu *Bacillus* a jejich výskyt a druhové zastoupení bude závislé na typu potravin a způsobu konzervace.

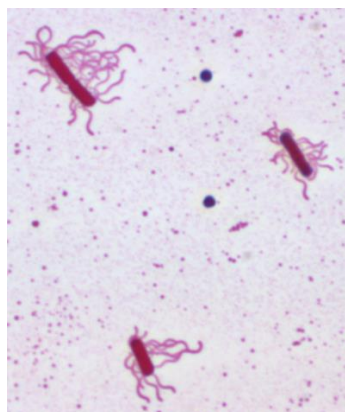
Cílem diplomové práce je monitoring výskytu bakterií rodu *Bacillus* v různých potravinách a jejich druhová identifikace. Výsledky práce budou porovnány s dostupnou literaturou.

3 Literární rešerše

3.1 Charakteristika rodu *Bacillus*

Bacillus je rozsáhlý rod bakterií kmene Fimicutes, třídy Bacilli, řádu Bacillales a čeledi *Bacillaceae*. Byl ustanoven německým biologem Ferdinandem J. Cohnem v roce 1872 a v roce 2017 sdružoval 318 platných druhů (Fan et al. 2017). Tento počet se průběžně mění, v závislosti na requalifikaci stávajících či začlenění nově popsanych druhů. Mezi druhy objevené v loňském roce (2018) patří *B. alkalilacus* (Singh et al. 2018), *B. alkalitolerans* (Liu et al. 2018b), *B. camelliae* (Niu et al. 2018), *B. catenulatus* (Sultanpuram et al. 2017; Oren & Garrity 2018), *B. fermenti* (Hirota et al. 2018), *B. kexueae*, *B. manusensis* (Sun et al. 2018), *B. marinisedimentorium* (Guo et al. 2018), *B. populi* (Liu et al. 2018a) a *B. tamaricis* (Zhang et al. 2018).

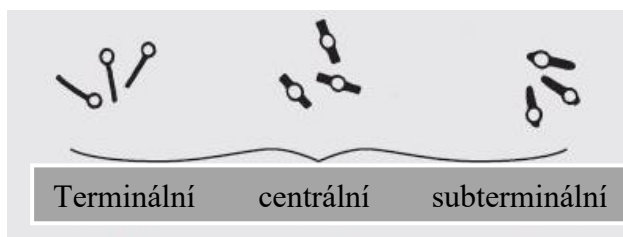
Buňky mají tvar pravidelných až mírně zahnutých tyčinek se zakulacenými konci o velikosti $0,5 - 1,2 \times 2,5 - 10 \mu\text{m}$. Vyskytují se samostatně, v párech, řetězcích nebo dlouhých vláknech (Obrázek 1). Mohou být pohyblivé i nepohyblivé. Pohyblivé druhy jsou vybavené peritrichními bičíky (Obrázek 2) (Bron et al. 1990; Iurlina et al. 2006; Griffiths 2010; Caamano-Antelo et al. 2015; Contesini et al. 2018; Grutsch et al. 2018). Bakterie tohoto rodu jsou buď aerobní nebo fakultativně anaerobní, byly ale popsány i striktně anaerobní druhy (*B. infernus*, *B. arseniciselenatis*). Většina druhů roste v rozmezí teplot $10 - 50 \text{ }^\circ\text{C}$ s optimem mezi 28 a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (např. *B. subtilis*, *B. pumilus* nebo *B. cereus*). Dále tento rod zahrnuje druhy hypertermofilní – optimum růstu nad $60 \text{ }^\circ\text{C}$ (*B. stearothermophilus*, *B. sporothermodurans*), termofilní – optimum růstu $40 \text{ }^\circ\text{C}$ a více (*B. coagulans*, *B. flavothermus*) a psychofilní – růst do $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (*B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*). Podle hodnoty pH, v níž mohou růst, jsou bacily rozlišovány nejčastěji na neutrofilní (pH $4,4 - 9,0$), alkalofilní (pH > 9) a acidofilní (pH $< 4,6$) druhy. Zástupce neutrofilních druhů je *B. cereus*, alkalofilních druhů například *B. horti* (Yumoto et al. 1998) a acidofilních druhů *B. acidocaldarius* či *B. pumilus* (Darland & Brock 1971). Existují ale také druhy *Bacillus*, které mají velkou adaptační schopnost, která jim umožňuje růst v nejrůznějších podmínkách. Minimální vodní aktivita (A_w) pro růst se pohybuje mezi $0,91$ a $0,93$. Několik druhů je aktivních i při koncentraci chloridu sodného 10% (Bron et al. 1990; Albert et al. 2005; Akel et al. 2009; Griffiths & Schraft 2017; Grutsch et al. 2018; Osimani et al. 2018).



Obrázek 1 - *Bacillus* (vlastní fotodokumentace)

Obrázek 2 – Peritrichní uspořádání bičíků (URL1)

Bacillus patří mezi sporulující organismy, které tvoří velmi odolné refraktilní endospóry oválného nebo kulatého tvaru. Jedná se o dormantní stádium, které bakterie chrání před nepříznivými teplotními podmínkami, konzervačními metodami (např. pasterace, UHT), nízké vodní aktivitě, ionizujícímu záření a velkému množství dezinfekčních prostředků. Mnoho členů *Bacillus* vytváří spóry ve chvíli, kdy jsou nepříznivé podmínky pro růst v daném prostředí. Tyto spóry se vytvářejí uvnitř mateřských buněk a uvolňují se do okolního prostředí za současného rozpadu mateřské buňky. V buňce se tvoří vždy jen jedna spóra. Při klíčení ztrácejí svou odolnost vůči teplu, radiaci a škodlivým chemikáliím. Poprvé byly popsány Cohnem v *B. subtilis*. Endospóry mohou být umístěny centrálně, subterminálně nebo terminálně, viz Obrázek 3. Podle tvaru endospóry a zda zduřují mateřskou buňku, či ne, lze *Bacillus* dělit do 3 morfologických skupin. I. morfologická skupina má endospóry oválného tvaru, které neztlušťují mateřskou buňku (*B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*), II. morfologická skupina také tvoří endospory oválného tvaru, ale vždy dochází ke ztluštění mateřské buňky (*B. circulans*, *B. coagulans*, *B. alcalophilus*, *B. azotoformans*) a III. morfologická skupina má endospóry kulovitého tvaru a vždy dochází ke ztluštění mateřské buňky (*B. pasteurii*, *B. sphaericus*, *B. schlegelii*, *B. fusiformis*). Mimo to, hydrofobní charakter spór umožňuje jejich přilnutí k různým povrchům a následnému šíření do různých prostředí včetně potravin (Bron et al. 1990; Slepecky & Hemphill 2006; Iurlina et al. 2006; Sedláček 2007; Logan 2011; Šviráková et al. 2014; Caamano-Antelo et al. 2015; Savini 2016; Griffiths & Schraft 2017; Brožová et al. 2018; Grutsch et al. 2018; Osimani et al. 2018).



Obrázek 3 - Umístění endospór (URL2)

Zástupci rodu vykazují mimořádnou metabolickou rozmanitost. Kmeny rodu *Bacillus* produkují enzym katalázu, který je pomáhá odlišit od rodu *Clostridium*. Všechny druhy *Bacillus* metabolizují organické substráty, mezi něž můžeme řadit aminokyseliny, organické kyseliny a cukry (Bron et al. 1990; Albert et al. 2005; Akel et al. 2009; Griffiths & Schraft 2017; Grutsch et al. 2018; Osimani et al. 2018).

Mezi různými druhy bacilů probíhá oboustranná komunikace nazvaná quorum sensing (QS). Bakterie mezi sebou komunikují vylučováním a přijímáním chemických signálních molekul. U grampozitivních bakterií se jedná především o bioaktivní oligopeptidy. Bakterie tímto způsobem regulují expresi faktorů virulence, sporulaci, tvorbu biofilmu a produkci ATB, toxinů či enzymů. QS je závislé na hustotě buněčné populace v daném prostředí. Studie prokázaly, že bakterie nejsou omezeny pouze na komunikaci mezi stejnými druhy, ale mohou reagovat i na signální molekuly jiného druhu. Tato komunikace je důležitá pro jejich přežití a interakci v přírodních stanovištích. Díky QS lze bakterie využívat i jako alternativní možnost léčby infekčních chorob, jelikož virulence je ovlivněna bez dopadu na životaschopnost bakteriálních buněk a nedochází tedy ke vzniku rezistence (Miller & Bassler 2001; Cutting 2016; Paldrychová et al. 2017).

3.1.1 Druhy významné v potravinářství

Bakterií rodu *Bacillus* je rozpoznáno mnoho druhů. Obecně se dělí na dvě základní skupiny *B. subtilis* a *B. cereus*.

3.1.1.1 Skupina *Bacillus subtilis*

Skupina *B. subtilis* zahrnuje mezofilní bakterie s buňkami užšími než 1 μm , které jsou si fylogeneticky blíže příbuzné. Sporangia nebývají buclatá a spóry mívají tvar elipsy. Mezi původní členy skupiny byly řazeny pouze *B. subtilis*, *B. licheniformis* a *B. pumilus*. Ostatní druhy byly popsány v posledních desetiletích. Například lze uvést *B. amyloliquefaciens* (1987), *B. atrophaeus* (1989), *B. mojavensis* (1994), *B. vallismortis* (1996), *B. sonorensis* (2001),

B. axarquiensis (2005), *B. tequilensis*, *B. safensis* (2006), *B. siamensis* (2010), *B. xiamenensis* (2014), *B. paralicheniformis* (2015) a *B. nakamurai* (2016) (Griffiths 2010; Fan et al. 2017).

3.1.1.1.1 *Bacillus subtilis*

B. subtilis je prvním objeveným a popsaným bakteriálním druhem vůbec (Ehrenberg 1835; Whitman et al. 2012). Je to grampozitivní, aerobní bakterie tyčinkovitého tvaru o velikosti $0,7-0,8 \times 2-3 \mu\text{m}$. Vyskytují se samostatně, ve dvojicích i v řetzcích. Vytváří spóry oválného tvaru, které se vyskytují běžně v půdě a jejich tvorba je aktivována teplotou $65-70 \text{ }^\circ\text{C}$. Klíčení spór je iniciováno směsí živin asparaginu, glukózy, fruktózy a iontů draslíku. Tento druh je také schopen růstu v anaerobním prostředí, přičemž akceptorem elektronů je v tomto případě dusík. Zdrojem dusíku může být amonný kationt, dusičnany, AMK, močovina, kyselina močová a peptidy. Optimální růstová teplota je $28-30 \text{ }^\circ\text{C}$ a pH $5,5-8,5$. Roste v přítomnosti až 7% NaCl, ale existují i druhy tolerující 10% NaCl. Je kataláza a Voges-Proskauer pozitivní (Ghosh et al. 2018; Grutsch et al. 2018).

Obecně je tento druh považován za nepatogenní a některé kmeny jsou dokonce využívány jako probiotika nebo aditivum do krmných směsí. Některé kmeny jsou ale naopak dávány do souvislosti s alimentárními otravami. Onemocnění způsobené *B. subtilis* vykazuje krátkou inkubační dobu, v rozmezí 10 minut až 14 hodin. Akutní fáze jsou krátkodobé a trvají 1,5-8 hodin. Nejčastějším příznakem je zvracení, ale často se vyskytuje také průjem či břišní křeče. Mezi neobvyklé příznaky pak patří nevolnost, zarudnutí, pocení a bolest hlavy. Jedním z faktorů virulence je produkce enzymu zvaného subtilisin. U něj bylo prokázáno, že pokud je přítomný ve velkém množství, vyvolává alergické reakce (Dodd 2017; Grutsch et al. 2018).

B. subtilis se vyskytuje se v potravinách s masem nebo rybami podávaných s přílohami na bázi obilovin (chléb, pečivo, rýže, nádivka) či v mléku pro kojence. Nejčastěji bývá otrava *B. subtilis* spojena s pekařskými výrobky, které způsobují vysoké množství chorob s typickými příznaky (Whitman et al. 2012; Dodd 2017).

3.1.1.1.2 *Bacillus pumilus*

B. pumilus je to grampozitivní, aerobní bakterie, která tvoří spóry. Dobře roste při nízkých teplotách ($10-15 \text{ }^\circ\text{C}$). Stejně, jako u *B. subtilis* se jedná o běžnou environmentální bakterii, která bývá s alimentárním onemocněním spojována jen zřídka. Některé kmeny jsou široce používány v průmyslové mikrobiologii (např. při výrobě fermentovaných potravin) (Kusmiatun et al. 2015; Abbas & Amran 2018).

Onemocnění způsobené patogenními kmeny *B. pumilus* obvykle nastává krátkou dobu po konzumaci (15 minut až 11 hodin), v některých případech také ale až po několika dnech. Typickými příznaky jsou zvracení a závratě, následované bolestí břicha, křečemi a průjmem. Projevovat se může také bolestí zad, hlavy či zimnicí. Běžně je nalézán v pečivu plněném masem nebo vařené a znovu ohřáté rýži (Dodd 2017).

3.1.1.1.3 *Bacillus licheniformis*

B. licheniformis je fakultativně anaerobní pohyblivý druh. Buňky obvykle dosahují velikosti $0,6-0,8 \times 1,5-3 \mu\text{m}$ a vyskytují se buď samostatně, v párech nebo řetězcích. Roste v rozmezí teplot $15-55 \text{ }^\circ\text{C}$ a hodnotách pH 5,7-6,8. Byl zaznamenán i izolát z geotermálního prostředí s maximální růstovou teplotou $68 \text{ }^\circ\text{C}$. Jedná se o potravinářsky významný druh, který se nejčastěji nachází v mléku. Díky odolnosti spor bývá detekován nejen v syrovém mléce, ale také ve všech fázích jeho zpracování. Dále se nachází v půdě, farmovém prostředí (krmivo, hnůj) a v různých nezpracovaných potravinách. Vegetativní růst se může vyskytnout v potravinách udržovaných při teplotě $30-50 \text{ }^\circ\text{C}$. Obvykle je arginindihydrolasa pozitivní a patří mezi bacily s malou proteolytickou aktivitou (Banykó & Vyletřelová 2009; Kalhotka et al. 2011; Whitman et al. 2012).

Tento druh může být taktéž zodpovědný za alimentární onemocnění. Onemocnění způsobené *B. licheniformis* se projevuje nevolností, zvracením, průjmem a žaludečními křečemi, ke kterým dochází 5-12 hodin po konzumaci. Příznaky mají krátkodobé trvání (6-24 hodin). Zodpovědný za toxickou aktivitu je cyklický lipoheptapeptid zvaný lichenysin. Lichenysin je termostabilní a odolává i teplotě varu. Z důvodu odolnosti vůči kyselinám a alkáliím není odbouráván ani při průchodu zažívacím traktem. Může být přítomen například ve zmrzlíně, dezertech, masových koláčcích a sendvičích nebo syrovém mléku. Infekční dávky pro patogenní *B. licheniformis* se uvádějí v rozmezí 3×10^5 až 1×10^8 KTJ (Dodd 2017; Grutsch et al. 2018).

3.1.1.2 Skupina *Bacillus cereus*

Druhy patřící do skupiny *B. cereus* se vyznačují buňkami širokými nejméně $1 \mu\text{m}$ s elipsoidními spórami. Většina z nich je snadno rozeznatelná od ostatních sporulujících bakterií, díky své neschopnosti využít mannitol. Tuto schopnost mají v rámci skupiny pouze druhy *B. anthracis*, *B. thuringiensis* a *B. mycoides*. Dalšími zástupci této skupiny jsou *B. cereus*, *B. pseudomycoides*, *B. gaemokensis* (2010), *B. manliponensis* (2011), *B. cytotoxicus* (2013), *B. bingmayongensis* (2014), *B. toyonensis* (2014) (Bassi et al. 2016; Rasigade et al. 2018) a

dalších 9 nově popsanych druhů v rámci studie Liu et al. (2017). V literatuře je také možné se setkat s druhem *B. weihenstephanensis*, který byl však v roce 2018 reklasifikován a v současné době je považován za psychrofilní kmen *B. mycooides*. Většina patogenních druhů bacilů patří právě do této skupiny, přičemž nejvýznamnějšími jsou *B. cereus* a *B. anthracis*

B. anthracis, *B. thuringiensis* a *B. mycooides* produkují lecithinázu, která patří do skupiny fosfolipáz a je považována za toxin poškozující střevní sliznici. *B. cereus* a *B. thuringiensis* jsou obvykle pohyblivé, a zároveň *B. cereus*, *B. thuringiensis* a *B. mycooides* jsou hemolytické a odolné vůči penicilínu (Whitman et al. 2012; Grutsch et al. 2018; Porcellato et al. 2018a).

3.1.1.2.1 *Bacillus anthracis*

B. anthracis je fakultativně anaerobní druh s velikostí buněk $1-1,5 \times 3-10 \mu\text{m}$. Jeho spóry jsou vysoce odolné vůči nepříznivým podmínkám, díky čemuž mohou zůstat v půdě životaschopné po mnoho let (od 60 do 200 let) (Spencer 2003; Whitman et al. 2012; Grutsch et al. 2018).

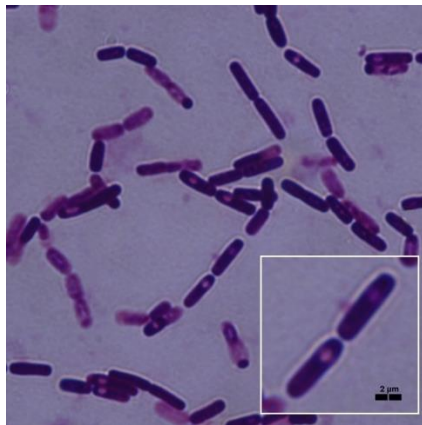
Tento druh je původce vážného onemocnění zvaného antrax. Primárně postihuje býložravce, může ale způsobit těžké onemocnění i u lidí. Obecně jsou rozeznávány 3 formy – gastrointestinální, kožní (skrze oděrky) a plicní (inhalací spór). U lidí dochází ke gastrointestinální formě obvykle po konzumaci masa a masných výrobků z infikovaného zvířete. Plicní a gastrointestinální formy antraxu se vyznačují vysokou úmrtností. *B. anthracis* po průniku do těla proniká do lymfatického systému a dále prostřednictvím krevního řečiště a vnitřních orgánů, kde se pomnoží a začne produkovat toxiny. Exotoxin *B. anthracis* je komplexní látka složená ze 3 proteinových komponentů: protektivní antigen (PA), edémový faktor (EF) a letální faktor (LF). Dalším faktorem virulence zodpovědným za patogenitu této bakterie je kapsula složená z polymeru poly- γ -D-glutamové kyseliny. Geny kódující toxin a enzymy zodpovědné za syntézu kapsule jsou nesené plazmidy pXO1 a pXO2. Exprese toxinů je zvýšena při vyšší koncentraci CO₂ a v rozmezí teplot 35-37 °C (Dodd 2017; Grutsch et al. 2018).

Projevy tohoto onemocnění jsou nevolnost, zvracení (hlavně krvavé), průjem (také až krvavý), bolesti žaludku s otokem břicha a vyskytnou se zhruba 1-7 dní po nakažení. Tyto příznaky mohou být doprovázeny také horečkou, zimnicí, bolestmi v krku, zčervenáním obličeje a očí. Míra úmrtnosti je velmi vysoká, ale při rychlé léčbě antibiotiky se může snížit na méně než 40 %. Nejčastěji tyto případy pocházejí z venkovských komunit, kde jsou konzumována i uhynulá zvířata. Počet hlášených případů tohoto onemocnění způsobených

potravinami, ve srovnání s jinými otravami, je velmi malý. Případy antraxu byly hlášeny například z Thajska, Indie, Íránu, Gambie a Ugandy (Dodd 2017; Grutsch et al. 2018).

3.1.1.2.2 *Bacillus cereus*

Tento druh byl poprvé popsán v roce 1887 Franklandem et al. Buňky dosahují délky 3-5 μm a šířky 1-1,2 μm . Často se vyskytují v řetízkách viz Obrázek 4. Optimální teplota pro růst je 30-40 $^{\circ}\text{C}$ a optimální pH 6,0 až 7,0. Druhy *B. cereus* lze odlišit od jiných druhů *Bacillus* pozitivní lecitinázovou reakcí, neschopností produkovat kyselinu z mannitolu, schopností růstu v anaerobním prostředí, pozitivní Voges-Proskauerovy reakcí a odolností vůči 0,001 % lysozymu (Griffiths & Schraft 2017). V potravinářství se jedná o nejvýznamnějšího zástupce rodu *Bacillus* a je jediným druhem, který má být dle zákona a státních norem v potravinách monitorován (blíže v kapitole 3.4. Legislativa).



Obrázek 4 - *Bacillus cereus* (URL3)

3.1.1.2.2.1 Onemocnění způsobené *Bacillus cereus*

Bacillus cereus je 3. nejčastější bakteriální původce onemocnění z potravin v Evropě (Glasset et al. 2018). Celosvětově tvoří onemocnění způsobené *B. cereus* 1,4 až 12 % všech případů alimentárních otrav. Autoři také uvádějí, že se jedná o značně podhodnocenou statistiku, protože řada případů není nahlášena (Grutsch et al. 2018). V letech 2007 až 2014 bylo nahlášeno členskými státy Evropské Unie 413 potravin obsahujících *B. cereus*, které způsobily zdravotní obtíže 657 lidem a zapříčinily 352 hospitalizací (Griffiths & Schraft 2017). Tirloni et al. (2017) uvádějí v tomto období celkem 453 infikovaných potravin s mírou hospitalizace 5,3 %. Nákazy *B. cereus* jsou nejčastěji hlášeny v Evropě a Číně (Hui Juan et al. 2016).

3.1.1.2.2.1.1 Průjmové onemocnění

První průkaz průjmového onemocnění způsobeného *B. cereus* byl popsán v Norsku v roce 1955 během experimentu, kdy jedinec zkonsumoval omáčku s vysokým počtem *B. cereus* (10^8 KTJ/ml). Výsledkem byly bolesti břicha a silný průjem (Logan 2011; Griffiths & Schraft 2017). Infekční dávky se přitom pohybují již od 10^4 buněk. Onemocnění má rychlý krátkodobý průběh, obvykle tedy nevyžaduje žádnou léčbu. Nastupuje 8-16 hodin po požití kontaminovaného jídla a obvykle mizí do 24 hodin. Je pro něj charakteristická bolest břicha spolu s vodnatým průjmem. Typické potraviny, které jsou zdrojem nákazy, jsou maso a masné produkty, zelenina, koření či vejčička (Logan 2011; Griffiths & Schraft 2017; Osimani et al. 2018).

Bacillus cereus produkuje řadu proteinových toxinů, z nichž 3 se podílejí právě na průjmovém onemocnění (hemolyzin BL, nehemolytický enterotoxin a cytotoxin K). Byly ale izolovány i další 3 enterotoxiny (T, FM a S), u kterých zatím patogenita nebyla prokázána. Po požití potravin, s určitým množstvím spór, je v tenkém střevě produkován jeden nebo více enterotoxinů, které poškozují integritu membrán epitelových buněk. Produkce enterotoxinu může probíhat v teplotním rozsahu 10-43 °C s optimem 32 °C (Logan 2011; Griffiths & Schraft 2017; Osimani et al. 2018).

Hemolyzin BL (Hbl) je produkován zhruba 60 % kmenů *B. cereus*, může být ale produkován i některými kmeny jiných druhů skupiny *B. cereus* jako *B. thuringiensis* nebo *B. mycooides*. Hbl se skládá ze tří složek (frakce B a lytických složek L1 a L2), ty se vážou na cílovou buňku a tvoří komplex, který způsobuje rozklad buněk skrze formaci pórů v buněčné membráně. Hbl má hemolytickou, cytotoxickou a dermonekrotickou aktivitu. Zároveň má také schopnost měnit permeabilitu krevních cév. Pro biologickou aktivitu jsou potřeba všechny 3 složky Hbl (Visiello et al. 2016).

Nehemolytický enterotoxin (Nhe) je produkován téměř všemi kmeny *B. cereus* a je tedy považován za jeden z hlavních faktorů virulence. Skládá se ze tří jednotlivých proteinových komponentů (NheA, NheB a NheC), kdy funkce NheC není plně objasněna, ale považuje se za nezbytnou pro konečnou syntézu toxinu. Komplexní Nhe pak způsobuje rozklad membrán buněk střevního epitelu formací pórů ve fosfolipidové dvojvrstvě, což vede k celkové lýze buněk vlivem koloidně-osmotického tlaku. I přes označení nehemolytický vykazuje hemolytickou aktivitu vůči erytrocytům různých savců. Maximální enterotoxická aktivita byla zjištěna při poměru jednotlivých komponentů - NheA, NheB a NheC 10:10:1 (Doll 2012; Visiello et al. 2016).

Cytotoxin K (CytK) často bývá označován také jako hemolysin IV. Je to jednosložkový protein s cytotoxickými a hemolytickými vlastnostmi. Přesné mechanismy účinku zatím nebyly plně objasněny, ale je známo, že vytváří póry v buňkách epitelu, což opět vede k jejich usmrcení. Dosud byly popsány dva geny, které kódují dva různé typy cytotoxinu K, CytK-1 a CytK-2. Rozdíly v sekvencích těchto genů byly využity pro taxonomické účely a daly vzniknout novému druhu *B. cytotoxicus*, který nese CytK-1, zatímco *B. cereus* nese CytK-2 (Doll 2012; Castiaux et al. 2015; Visiello et al. 2016).

3.1.1.2.2.1.2 Emetické onemocnění

Emetické onemocnění neboli intoxikace, je charakterizováno nevolností a zvracením 0-5 hodin po jídle. Délka trvání je pak obvykle 6-24 hodin. Nastává hlavně po konzumaci rýžových pokrmů, pasterované smetany, mléčného pudinku, těstovin nebo kojenecké výživy a je způsobeno jediným toxinem zvaným cereulid. Cereulid je cyklický dodekapeptid, jehož struktura je tvořena třemi opakováními 4 aminokyselin a/nebo oxokyselin (D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val)₃. Díky své cyklické struktuře je vysoce termostabilní. Přežívá i tepelné ošetření při 121 °C po dobu 2 hodin. Nelze ho tedy z potravin odstranit žádným následným zpracováním či ošetřením typu vaření, smažení či pražení. Je také odolný vůči kyselému prostředí žaludku a enzymatickému trávení. K akutnímu projevu intoxikace dochází po požití 8-10 µg toxinu na kg tělesné hmotnosti. Uvádí se, že dostatečnou koncentraci pro intoxikaci dospělého člověka *B. cereus* vyprodukuje, pokud je v potravine přítomen v počtu 10⁵ – 10⁸ buněk/g. Produkce toxinu není spojena s procesem sporulace, ale většinou k ní dochází v časně stacionární fázi růstu. Cereulid je produkován za aerobních a mikroaerobních podmínek, ne však za anaerobních. Optimální teplota pro produkci cereulidu je 12-37 °C (Logan 2011; Doll 2012; Visiello et al. 2016; Griffiths & Schraft 2017; Grutsch et al. 2018).

Shrnutí základních informací o onemocněních způsobených *Bacillus cereus* je uvedeno v Tabulce 1.

Tabulka 1 - Příznaky onemocnění *Bacillus cereus* (upraveno dle Griffiths & Schraft 2017)

	Průjmové onemocnění	Emetické onemocnění
Inkubační doba	8-16 h	0,5-5 h
Délka nemoci	12-24 h (někdy > 24 h)	6-24 h
Infekční dávka	10 ⁵ -10 ⁷ buněk	10 ⁵ -10 ⁸ buněk na g jídla
Symptomy	Bolest břicha, vodnatý průjem, občasná nevolnost	Nevolnost, zvracení, občasný průjem
Nejčastější produkty	Masné výrobky, polévky, mléko a mléčné výrobky, zelenina, pudinky a omáčky	Rýže, těstoviny, nudle, pečivo

3.1.1.2.2.1.3 Další onemocnění způsobené *B. cereus*

Kromě otravy jídlem může vyvolávat také lokální infekce. Jako příklady lze uvést septikémii, pneumonii, meningitidu, encefalitidu nebo oční infekce (Glasset et al. 2018).

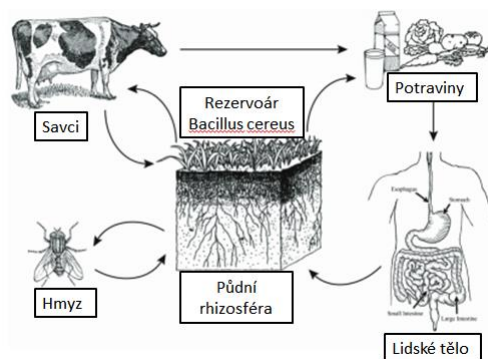
Zánětlivé onemocnění plic (pneumonie) způsobené *B. cereus* je podobné antraxu a může mít velice těžký průběh. Většina hlášených případů pneumonie je fatální, a to i přes antibiotickou léčbu. Předpokládá se, že k infekci dochází skrze ústní dutin buď vdechováním spór nebo vegetativních buněk a poté šířením do sousedních tkání přes krevní oběh. Přesné mechanismy působení u této formy onemocnění jsou však stále nejasné (Savini 2016). Vyskytuje se zejména u drogově závislých, předčasně narozených dětí a pacientů s poruchou imunity (Shimoyama et al. 2017).

Popsány byly také infekce měkkých tkání (Koelbl et al. 2018).

3.2 Výskyt *Bacillus spp.*

Bacily jsou prakticky všudypřítomné organismy. Jejich rozšíření je mimo jiné důsledkem schopnosti vytvářet spóry, které bacily chrání vůči nepříznivým podmínkám a umožňují přenos do různých prostředí (Amodio-Cocchieri et al. 1998; Griffiths 2010). Zástupci rodu jsou široce rozšířeni v suchozemských i vodních stanovištích. Mnoho druhů se běžně vyskytuje v půdě, vzduchu, vodě, rostlinných a živočišných materiálech, odkud se poté pomocí kontaminovaných surovin (zelenina, koření, obilí) dostávají do potravin. Na obrázku 5 jsou uvedeny možné přenosové cesty lidského patogenu *Bacillus cereus* (Bron et al. 1990; Amodio-

Cocchieri et al. 1998; Iurlina et al. 2006; Griffiths 2010; Caamano-Antelo et al. 2015; Grutsch et al. 2018; Osimani et al. 2018).



Obrázek 5 - Přenos *Bacillus cereus* (Doll 2012)

Bacily se také významně podílí na kontaminaci nemocničního prostředí, hlavně katetrů, zařízení pro filtraci a ventilaci vzduchu, roztoků na bázi alkoholu, rukavic, tub na odběr vzorků, gáz s impregnovanou náplastí a mnoho antiseptik. Bylo zjištěno, že je schopen přetrvávat i přes rutinní postupy čištění (Glasset et al. 2018; Grutsch et al. 2018).

3.2.1 Výskyt v potravinách

Jedná se o jednu z hlavních bakterií, která se podílí na alimentárních onemocněních a na kažení potravin. Kontaminace potravin je způsobená rozmanitou škálou prostředí, kde mohou přežívat a nejčastěji napadanými potravinami jsou mléčné produkty, maso, dětské příkrmy, rýže, zelenina, koření a cereálie. Proto je jejich monitoring velmi důležitý pro zachování kvality a bezpečnosti potravin. Mezi jednu z nejkontrolovanějších komodit patří právě dětské příkrmy, jelikož děti jsou náchylnější k infekci způsobené rodem *Bacillus*, a to z důvodu méně vyvinutého imunitního systému a nedostatku konkurenční střevní mikrobioty (Bron et al., 1990; Caamano-Antelo et al., 2015; Contesini et al., 2018; Sadek et al. 2018).

3.2.1.1 Výskyt v mléce a mléčných výrobcích

Zástupci rodu *Bacillus* jsou uváděni jako součást základní mikrobioty syrového mléka. Ke kontaminaci může docházet skrze krmivo nebo podestýlku obsahující spóry, které se dostávají do kontaktu s vemeny. Mléko může být dále kontaminováno během transportu anebo v mlékárně během zpracování. Počet spór v syrovém mléce se mění v průběhu celého roku, obecně jsou ale nejvyšší v zimě, kdy jsou dojnice ustájeny. Porcellato et al. (2018b) zase uvádí, že množství bakterií skupiny *B. cereus* není ani tak ovlivněno druhem mléka nebo ročním obdobím, ale především teplotou a dobou skladování. Každopádně se jedná o proces nežádoucí,

jelikož různé druhy *Bacillus* sp. produkují řadu proteolytických enzymů schopných degradovat složky mléka a tím ho činit nepřijatelným pro konzumaci (Grutsch et al. 2018; Porcellato et al. 2018a). V mléce a mléčných výrobcích se nejčastěji vyskytují *B. cereus*, *B. subtilis* a *B. licheniformis* (Kalhotka et al. 2011).

Byla také testována schopnost klíčení spór v různých typech mléčných výrobků (neochucený jogurt, sýr Taleggio, sýr mascarpone a syrové a pasterizované mléko) a růstu 2 kmenů *B. cereus* (klinický izolát a izolát z mléčného produktu). V jogurtu nebyl pozorován žádný růst a to nejspíše v důsledku kombinace nízkého pH (< 5) a přítomnosti jogurtové kultury. Inhibiční účinek přirozené mikrobioty byl také zjištěn v sýru Taleggio a syrovém mléce, kde dominují především bakterie mléčného kvašení. V pasterizovaném mléce a sýru mascarpone, kde nebyla přítomna žádná přirozená mikrobiota, docházelo k rychlému pomnožení, a to až na 10^7 KTJ/g. *B. cereus* je často nalézán především ve zmrzlině, sušeném mléce, dále pak ve fermentovaném a pasterovaném mléce. Prevalence jeho výskytu v těchto produktech byla ve studiích (Wong et al. 1988; Tirloni et al. 2017; Cadirci et al. 2018; Yusuf et al. 2018) zjištěna v rozmezí 2 – 52 %, kdy největší % výskytu bylo u zmrzlin (52 %), dále potom u sušeného mléka 29 %, fermentovaného mléka 17 % a u pasterovaného mléka pouze 2 %. V mléce se *B. cereus* vyskytoval také v těchto studiích Bartoszewicz et al. 2008; Zhou et al. 2008a; Banykó & Vyleťelová 2009; De Jonghe et al. 2010; Yu et al. 2018; Yusuf et al. 2018. Dalšími nalezenými druhy jsou *B. pumilus* (De Jonghe et al. 2010), *B. licheniformis* (Banykó & Vyleťelová 2009; De Jonghe et al. 2010), *B. thuringiensis* (Zhou et al. 2008a), *B. weihenstephanensis* (bazonym *B. mycoides*) (Bartoszewicz et al. 2008) a *B. mycoides* (Zhou et al. 2008a). Dokonce byl nalezen i *Bacillus sporothermodurans* v UHT mléce (Tabit 2018).

3.2.1.2 Výskyt v dehydratovaných výrobcích

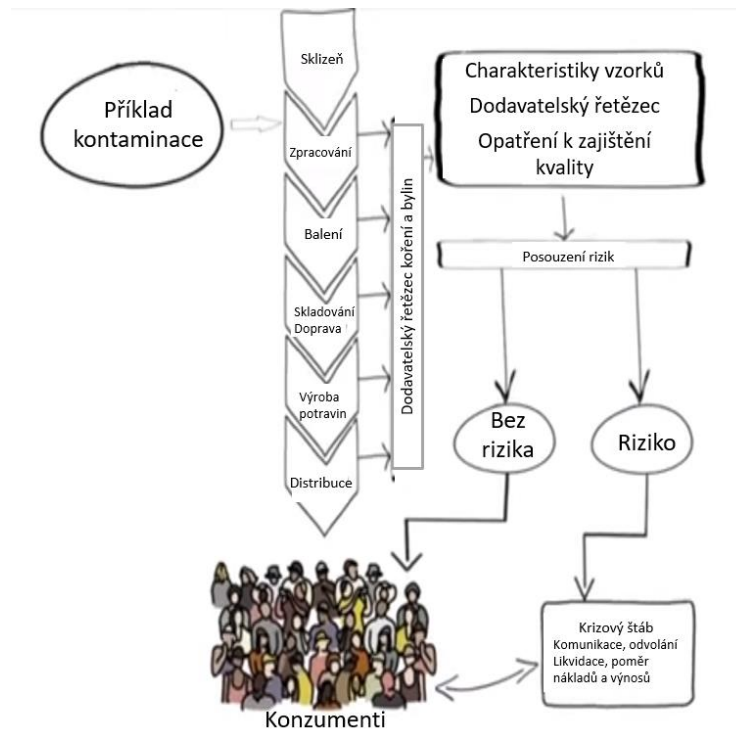
Podle vyhlášky č. 398/2016 o požadavcích na koření, jedlou sůl, dehydratované výrobky, ochucovadla, studené omáčky, dresinky a hořčici jsou dehydratované výrobky charakterizovány jako potravina vzniklá smísením složek se sníženým obsahem vlhkosti, pastovité nebo sypké konzistence, která se před konzumací obnoví zejména tekutinou. Tyto výrobky obsahují nejvýše 15 % vody a řadí se sem produkty, které jsou uvedené v Tabulce 2.

Tabulka 2 – Dehydratované výrobky (Vyhláška č. 398 / 2016)

Dehydratované výrobky	Polévka Omáčka Bujón Vývar Šťáva Základ pokrmu Směs pro přípravu hotového pokrmu Směs pro přípravu dresinků Směs pro přípravu zálivky Směs pro přípravu dezertu Směs pro přípravu krému Směs pro přípravu polevy Směs pro přípravu zmrzliny Přísada do polévky
------------------------------	---

Tato vyhláška zároveň uvádí i smyslové požadavky na jejich jakost a hodnotí se vždy po přípravě dle návodu. Vzhled, barva, konzistence, chuť a vůně musí být charakteristické pro druh výrobku označený na jeho obalu. Chuť a vůně musí být vlastní, bez cizích příměsí, nebo jinak změněné chuti a vůně.

Dehydratované výrobky mají nízkou aktivitu vody, vůči které jsou spóry odolné, a proto dochází k jejich kontaminaci především sporulujícími mikroorganismy. Dehydrované potraviny, ve kterých je častá přítomnost spór, mohou být po rehydrataci vhodným substrátem pro následné pomnožení *Bacillus* spp. či zdrojem kontaminace dalších pokrmů. Mezi složky s velkým potenciálem kontaminovat širokou škálu produktů patří koření a různé byliny (Székács et al. 2018), kde lze celkem nalézt až 10^8 KTJ v 1 g (Spiced 2016). Některé dehydratované potraviny včetně sušené počáteční kojenecké výživy a sušených dietních potravin jsou konzumovány potenciálně choulostivými spotřebiteli, a proto, v souladu se stanoviskem EFSA by měly být počty spór *B. cereus* v těchto komoditách co možná nejnižší a kromě osvědčených postupů určených ke zmenšení časové prodlevy mezi přípravou a spotřebou by mělo být stanoveno kritérium hygieny výrobního procesu (Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007). Kontaminace mikroorganismy může nastat v mnoha fázích výrobního procesu a distribuce, viz Obrázek č. 6, a mohou pro spotřebitele představovat vážné riziko (Székács et al. 2018).



Obrázek 6 - Dodavatelský řetězec koření a bylin (Spiced 2016)

V rámci EU byl zaveden projekt „SPICED“ financovaný Evropskou unií, jehož cílem bylo zabezpečení koření a bylinek v Evropě, od primární výroby až po potraviny připravené ke konzumaci spotřebitelem, proti úmyslné, náhodné nebo přirozené biologické a chemické kontaminaci a tím i ochraně zdraví evropských spotřebitelů. Tento program byl zahájen v roce 2013 s cílem zvýšit bezpečnost dodavatelských řetězců v Evropě. SPICED se zaměřilo na potravinářské přísady s nízkou vlhkostí, sušené bylinky a koření. Většinou se tyto komodity dováží jako sušené suroviny ze zemí mimo EU. Projekt trval celkem 3 roky a stál 4 586 455 eur. Spolupracovalo na něm celkem 11 partnerů ze 7 zemí EU (Německo, Rakousko, Litva, Nizozemí, Maďarsko, Irsko a Slovensko). Konsorcium vybralo produkty ke zkoumání v závislosti na množství vyrobeném nebo spotřebovaném v Evropě, potenciálu zabránit kontaminaci a četnosti oznámení týkajících se kontaminace. Mezi vybrané druhy patřily pepř, paprika, muškátový oříšek, nové koření, vanilka, petržel, oregano a bazalka. V centru sledování byla kontaminace *Bacillus* spp., *Salmonella* spp. a *Escherichia coli*.

Díky tomuto projektu vznikly údaje o kontaminaci na národní, evropské a mezinárodní úrovni. Zainteresované strany tak byly podpořeny při identifikaci kritických kontrolních míst s cílem omezit šíření kontaminantů. Veřejnosti byly na vzdělávacích seminářích a konferencích poskytnuty důležité informace o bezpečnosti potravin a vědecké výsledky týkající se současného stavu. Tento projekt byl završen sympoziem v Berlíně, kde díky všem provedeným analýzám, byl prezentován ucelený přehled o kontaminaci těchto potravin. Ze skupiny

B. cereus, bylo nalezeno 59 izolátů. Kromě jednoho izolátu, který byl identifikován jako *B. mycoides*, nesly všechny ostatní kmeny geny kódující jeden či více toxinů. Nejčastěji šlo o toxiny, způsobující průjmové onemocnění (Hbl, NheA a CytK). Toxin způsobující emetické onemocnění (cereulid) byl nalezen jen u jednoho izolátu. Dále došli k závěru, že počet *B. cereus* se správným způsobem skladování snižuje v průměru o $\log_{10} 0,39 \pm 0,15$ za 50 týdnů (Spiced 2016).

3.2.1.3 Výskyt v ostatních potravinách

V případě medu, se jeho fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je pH, obsah vody, oxidačně-redukční potenciál, antimikrobiální složky a koncentrace cukru, stávají vhodnými pro přežití mikroorganismů tvořících spóry. Také existují informace o přítomnosti *Bacillus* spp. na rybích produktech. Rybí svaly jsou obvykle sterilní, ale mikroorganismy jsou obsaženy na kůži, žábrách a v zažívacím traktu a při špatné manipulaci dochází ke kontaminaci masa. Množství mikroorganismů závisí na prostředí, kde byla ryba ulovena (Iurlina et al. 2006; Griffiths 2010; Grutsch et al. 2018).

Kromě medu a ryb se může *Bacillus* vyskytovat také v rýži, tofu, čaji nebo třeba těstovinách. V rýži byly nalezeny druhy *B. cereus* (Ankolekar et al. 2009; Kim et al. 2014; Hwang & Huang 2019), *B. thuringiensis* (Ankolekar et al. 2009; Kim et al. 2014), *B. mycoides* (Ankolekar et al. 2009). V tofu byly zjištěny *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium* a *B. subtilis* (Lee et al. 2017a). A další nález *B. cereus* byl hlášen v zeleném čaji (Zhou et al. 2008b).

3.3 Využití *Bacillus*

Některé druhy či kmeny *Bacillus* spp. jsou naopak využívány pro výrobu fermentovaných potravin, jako aditivum pro výživu zvířat nebo jako probiotika. Dále se využívají v různých odvětvích průmyslu pro výrobu léčiv, enzymů či surfaktantů (Iurlina et al., 2006; Contesini et al., 2018).

3.3.1 Probiotika

Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které v případě, že jsou podávány v odpovídajícím množství, poskytují hostiteli zdravotní přínos (Hill et al. 2014). Druhy *Bacillus* jsou pro využití jako probiotika velice atraktivní, jelikož jsou schopny vydržet v kyselém prostředí žaludku a mají schopnost dlouho přežít v prostředí trávicího traktu (Cutting 2011; Logan 2011; Jeon et al. 2018). Mezi další výhody *Bacillus* spp, oproti všem běžně využívaným

kmenům (např. *Lactobacillus*), patří schopnost uchovávání v sušené formě neomezeně dlouhou dobu bez jakéhokoli nežádoucího vlivu na jejich životaschopnost. (Logan 2012; Lakshmi et al. 2017; Jeon et al. 2018). Produkují také řadu biologicky aktivních látek, které vykazují antagonistické vlastnosti proti patogenním bakteriím. Dále se uvádí, že zmírňují alergické symptomy a zánětlivá infekční onemocnění gastrointestinálního traktu (Lee et al. 2017b).

Jako probiotika je *Bacillus* využíván po dobu nejméně 50 let v italském produktu Enterogermina, zaregistrovaném v roce 1958 (Obrázek 7). Obsahuje spóry *B. clausii* a jeho účelem je předcházet průjmům. Další příklady probiotik obsahující *Bacillus* jsou Bactisubtil, Bio-Kult, Biosporin, Biovicerin, Bispan, Sustenex, Lactospore, Neolactoflorene nebo Domuvar (Cutting 2011; Logan 2011; Lakshmi et al. 2017; Majeed et al. 2018). Tato probiotika jsou zobrazena na Obrázku 8. V Tabulce č.3 je shrnuto, který druh *Bacillus* dané probiotikum obsahuje a lze z ní vyčíst, že nejčastěji jsou do probiotik využívány *B. cereus*, *B. subtilis* nebo *B. coagulans*.

B. subtilis vykazuje prospěšné probiotické účinky, včetně tvorby antimikrobiálních látek, stimulace imunitního systému a celkového zlepšení střevní mikrobioty. Mají také historii použití při přípravě několika tradičních fermentovaných potravin (mléčné výrobky, kimchi, sójové fermentované potraviny a fermentované maso). Konzumace těchto potravin je spojena s mnoha zdravotními přínosy, jako je zvýšená imunita a antialergické účinky (Lefevre et al. 2017; Lee et al. 2017b).



Obrázek 7 - Enterogermina (Cutting 2011)



Obrázek 8 – ostatní probiotika (Google)

Tabulka 3 - Probiotika rodu *Bacillus* pro lidské využití (Cutting 2011)

Probiotikum	Druh <i>Bacillus</i>
Bactisubtil	<i>B. cereus</i>
Bio-Kult	<i>B. subtilis</i>
Biosporin	<i>B. subtilis</i> <i>B. licheniformis</i>
Biovicerin	<i>B. cereus</i>
Bispan	<i>B. polyfermenticus</i>
Sustenex	<i>B. coagulans</i>
Lactospore	<i>B. coagulans</i>
Neolactoflorene	<i>B. coagulans</i>
Domuvar	<i>B. clausii</i> <i>B. subtilis</i>

Mnohé kmeny *Bacillus* bývají aplikovány jako probiotika pro zvířata (Abbas & Amran 2018). Používají se pro podporu růstu a jako prevence proti infekcím (Cutting 2016). Mezi probiotika aplikovaná při výživě zvířat patří produkty: AlCare (*B. licheniformis*) a Esporafeed Plus (*B. cereus*) pro prasnice, BioGrow (*B. licheniformis* a *B. subtilis*), Lactopure (*B. coagulans*) a Neoferm BS 10 (*B. clausii*) se využívají pro drůbež, telata a prasnice, BioPlus (*B. licheniformis* a *B. subtilis*) pro prasata, kuřata a krůty a Toyocerin (*B. cereus*) je určen pro drůbež, telata, králíky a prasnice (Cutting 2011). Probiotika jsou též využívána v akvakultuře, kde pomáhají zlepšit růst a zdraví ryb či ke zvýšení odolnosti proti chorobám u krevet (Cutting 2016). Známa probiotika využívaná v akvakultuře jsou BaoZyme-Aqua (*B. subtilis*), Biostart (*B. megaterium*, *B. licheniformis*, *Paenibacillus polymyxa*, *B. subtilis*) a Promarine (*B. subtilis*) (Cutting 2011).

Vzhledem k patogennímu potenciálu některých druhů či kmenů je nezbytné prokázat absenci faktorů virulence a zdravotní nezávadnosti dříve, než může být daný organismus uznán, jako probiotikum (Horáčková 2010). Některé kmeny, byť s probiotickým potenciálem a absencí faktorů virulence nelze využít z důvodu rezistence vůči antibiotikům. Požadavky na citlivost vůči konkrétním látkám a minimální inhibiční koncentrace stanovuje EFSA (2008). Studie zaměřená na charakterizaci *B. clausii* s cílem využít daný kmen jako probiotikum prokázala rezistenci na tři antibiotika (klindamycin, erythromycin a chloramfenikol). Geny, které rezistenci kódují, byly ale lokalizovány na chromozomální DNA, nikoliv na mobilním

genovém elementu, tudíž byl přenos rezistence na jiný organismus shledán jako nepravděpodobný a konzumace *B. clausii* pro člověka bezpečná (Lakshmi et al. 2017).

B. cereus probiotika nesou často enterotoxinové geny. Z tohoto důvodu byl produkt Paciflor, který byl používán v krmivech, stažen z trhu v EU. Stále používané jsou například Toyerocin a Bactisubtil, které ale obsahují stejný kmen *B. cereus* jako Paciflor (Cutting 2011).

3.3.2 Antimikrobiální látky

Je známo, že některé druhy *Bacillus* produkují širokou škálu antimikrobiálních látek. Těmi jsou antibiotika nebo bakteriociny (Collins et al. 2016).

3.3.2.1 Bakteriociny

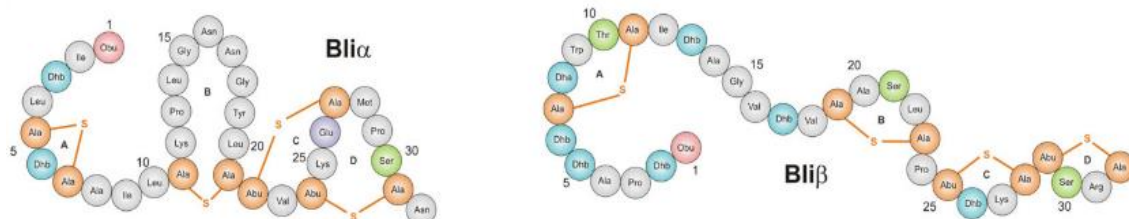
Bakteriociny jsou malé antimikrobiální peptidy produkované grampozitivními i gramnegativními bakteriemi. Na rozdíl od antibiotik jsou syntetizovány ribozomálně a nejen ve stacionární fázi růstu. Jejich spektrum účinku je obvykle úzké, přičemž inhibovány bývají bakterie stejného nebo blízce příbuzného druhu. Hrají důležitou roli v potravinářském průmyslu, kde mohou poskytovat výhody v oblasti kvality a bezpečnosti potravin. Nejvíce se využívají k inhibici růstu bakteriálních patogenů, jako jsou *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella* nebo *Staphylococcus aureus*. Dále se využívají také ve zdravotnictví jako alternativa antibiotik (Collins et al. 2016; Jamaluddin et al. 2018).

Celkem jsou popsány 3 základní třídy bakteriocinů, které se pak dále dělí do podtříd. První zahrnuje posttranslačně modifikované peptidy. Druhá třída jsou bakteriociny, u kterých po procesu translace nedochází k posttranslačním modifikacím a do třetí třídy se řadí velké termolabilní proteiny (Collins et al. 2016; Jamaluddin et al. 2018). Z hlediska využití pro potravinářské účely jsou doposud nejvýznamnější skupinou bakteriociny třídy Ia, takzvaná lantibiotika.

3.3.2.1.1 Lantibiotika

Lantibiotika se řadí do I. třídy bakteriocinů (3-10 kDa). Jsou ribozomálně syntetizována jako inaktivní prekurzory a posttranslačně modifikována na jejich biologicky aktivní formy. Obsahují neobvyklá modifikovaná rezidua aminokyselin, kterými jsou lanthionin a methyllanthionin (Caetano et al. 2011). Lantibiotika působí proti různým grampozitivním bakteriím, přičemž mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy peptidoglykanu buněčné stěny. Jiná (např. nisin) zase způsobují vznik pórů v cytoplazmatické membráně (Kotlářová 2009; Lee & Kim 2011;).

Jedná se o skupinu, která je obecně považována za bezpečnou pro použití v potravinářství. Zejména nisin, produkovaný bakterií *Lactococcus lactis*, má dlouhou tradici ve využití jako konzervant, s označením E234. Mezi známá lantibiotika získaná z *Bacillus* spp. patří lichenicidin, produkovaný *B. licheniformis* a skládající se ze dvou peptidů, bli α a bli β . Tyto peptidy jsou zobrazeny na Obrázku 9. Komplex lichenicidin je účinný proti *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes*, které jsou rezistentní vůči meticilinu (Caetano et al. 2011).



Obrázek 9 - Peptidy lantibiotik lichenicidin (Caetano et al. 2011)

Dalším popsaným bakteriocinem této třídy je clausin, získaný z probiotického kmene *B. clausii*. Působí proti grampozitivním, ale z části i proti gramnegativním bakteriím. Specificky se váže na lipidy, které tvoří peptidoglykan a ostatní polymerybakteriální stěny (Kotlářová 2009; Collins et al. 2016). Široce je využíván hlavně v Itálii a to již od 60. let 20. století. Používá se především pro léčbu virových průjmů (Frühauf et al. 2016).

Následujícím lantibiotikem je subtilin produkovaný *B. subtilis*. Skládá se z 32 AMK, z nichž je 8 modifikováno (Lee & Kim 2011). Další lantibiotika produkovaná *B. subtilis* jsou například ericin A, ericin S, mersacidin a sublancin (Lawton et al. 2007).

V roce 2016 byl z *Bacillus paralicheniformis* izolován formicin, nové dvou peptidové lantibiotikum. Je mnohem méně hydrofobní než jakékoliv ekvivalentní lantibiotikum. Má také široké spektrum účinku proti grampozitivním patogenům, např. *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Listeria monocytogenes* (Collins et al. 2016).

Dalším lantibiotikem je thusin, získaný z *B. thuringiensis*. Skládá se z peptidů Ths α a Ths β . Je vysoce tepelně stabilní (100 °C po dobu 30 minut) a pH tolerantní (pH 2,0 – 9,0). Vykazuje účinnost proti grampozitivním bakteriím a různým bakteriálním patogenům (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sciuri*, *Enterococcus faecalis* a *Streptococcus pneumoniae*). Je schopný také inhibovat klíčení spór *B. cereus*. Díky silné antimikrobiální aktivitě má potenciál pro vývoj nových léčiv (Li et al. 2016b).

B. halodurans produkuje lantibiotikum zvané haloduracin. Jedná se o širokospektrální dvoupeptidové lantibiotikum. Je účinné proti velkému počtu grampozitivních bakterií včetně laktokoků a bakterií rodu *Listeria*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* či *Pediococcus* (Lawton et al. 2007).

3.3.2.2 Antibiotika

Antibiotika jsou nízkomolekulární antimikrobiálně působící látky, produkované mikroorganismy ve stacionární fázi růstu. Po chemické stránce to jsou látky velice různorodé a na rozdíl od bakteriocinů jsou syntetizovány multienzymovými komplexy, nikoliv ribozomálně. Mezi nejznámější antibiotika produkovaná rodem *Bacillus* patří polymyxiny. Nejčastěji využívanými jsou polymyxin B (PMB) a kolistin (polymyxin E) produkované bakterií *Paenibacillus (Bacillus) polymyxa*. Využívají se do farmaceutických přípravků a zájem o ně roste. Je stále málo znalostí o tom, jak je optimálně používat, a proto jsou to většinou antibiotika poslední volby, pro závažné infekce, které se nedají jinak vyléčit. Účinkují proti gramnegativním bakteriím (nejčastěji *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* a *Klebsiela pneumoniae*). Rezistence těchto gramnegativních bakterií vůči polymyxinům je v současnosti nízká. Vysoká rezistence na polymyxiny by znamenala naprostý nedostatek ATB pro léčbu život ohrožujících infekcí způsobených danými gramnegativními bakteriemi (Velkov et al. 2010). *B. polymyxa* produkuje i následující antibiotika: gatavalin, jolipeptin, gavaserin či saltavalin (Pichard et al. 1995).

Dalším antibiotikem je bacitracin získaný z *B. subtilis* a některých kmenů *B. licheniformis*. Je pH neutrální, ve vodě rozpustný, netoxický a tepelně stabilní. Působí hlavně proti grampozitivním organismům, gonokokům a na jeho působení jsou citlivé i meningokoky. Používá se také jako širokospektrální antibiotikum proti bakteriím způsobujícím kožní infekce (Johnson et al. 1945; Radeck et al. 2016).

Mezi antibiotika produkovaná *Bacillus* patří dále kanosamin, zwittermicin A, ituriny, gramicidin, fengycin, plipastatin či kurstakin. Syntéza kanosaminu byla prokázána u několika druhů, např. *B. pumilus*, *B. subtilis* nebo *B. cereus*. Má silnou inhibiční aktivitu proti plísňovým patogenům *Oomycetes* a mírnou proti *Ascomycetes* (*Aspergillus flavus*, *Botrytis cinerea* nebo *Sclerotinia* spp.), *Basidiomycetes* (*Rhizoctonia solani*, *Ustilago maydis*) a *Deuteromycetes* (*Alternaria* spp., *Helminthosporium* spp., *Fusarium* spp.). Zwittermicin A je antibiotikum produkované *B. cereus*. Má široké spektrum inhibiční aktivity proti určitým grampozitivním a gramnegativním bakteriím nebo eukaryotickým organismům. Ituriny jsou velká skupina

antibiotických sloučenin zahrnující bacillomycin D a F, bacillopeptin, itulin A a C a mykosubtilin. Jeho syntéza byla prokázána např. u *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* a *B. subtilis*. Fengycin je užitečný při biologické likvidaci larev komárů a rostlinných patogenů degradujících jejich buněčnou strukturu a permeabilitu membrán. Mohou také inhibovat tvorbu biofilmu některých bakterií a degradovat polycyklické aromatické uhlovodíky. Je produkován druhy *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* nebo *B. licheniformis*. Kurstakiny jsou neribozomální syntetizované lipoproteiny, produkované *B. thuringiensis* a jinými druhy ze skupiny *Bacillus cereus*. Výjimkou jsou *B. anthracis* a *B. cytotoxicus*, u kterých produkce tohoto antibiotika doposud popsána nebyla (Kevany et al. 2009; Alina et al. 2015).

3.3.3 Ostatní využití

Někteří zástupci rodu *Bacillus* jsou využívány k výrobě produktů na ochranu rostlin, k výrobě enzymů nebo k výrobě fermentovaných potravin. Využití ale našel i při výrobě šamponu pro psy, kdy je do výrobku přidáván probiotický kmen *B. subtilis*. Tento šampon slouží k rozkladu různých páchnoucích molekul, vylučovaných mikrobiotou kůže (URL4).

B. thuringiensis je jednou z neúspěšnějších entomopatogenních bakterií, kdy se některé jeho kmeny používají v insekticidních přípravcích. Jako biopesticid se používá díky své schopnosti syntetizovat insekticidní proteiny během sporulace a vegetativní fáze. Jiné druhy zase produkují silné extracelulární enzymy, díky kterým se používají v biologických detergentech. Dále může produkovat i různé bakteriociny, nazývané thuriciny, které rozšiřují jeho oblast působení z oblasti insekticidů do oblasti konzervace potravin (Blackburn & McClure 2009; Lee & Kim 2011; Huang et al. 2016; Kimura & Yokoyama 2019).

Druhy, jako je *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. alkalophilus* a *B. lentus* mají vlastnosti, které se dají využít ve fermentačním průmyslu potravin. Ve východní Asii se jedná hlavně o produkty na bázi sóji, luštěnin, zeleniny a produkující různé antimikrobiální peptidy, které vykazují antibakteriální nebo antifungální aktivity (Blackburn & McClure 2009; Lee & Kim 2011; Kimura & Yokoyama 2019).

3.4 Legislativa

V roce 2005 bylo vydáno komisí Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) stanovisko k *Bacillus cereus* a dalším *Bacillus* spp. v potravinách. EFSA zde dospěla k závěru, že jedním z hlavních kontrolních opatření je kontrola teploty a zavedení systému založeného na zásadách analýzy rizika a kritických kontrolních bodů (Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007).

V současnosti Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 stanovuje limity pouze pro výskyt *B. cereus* u sušené počáteční kojenecké výživy a sušených dietních potravin pro zvláštní léčebné účely určené pro kojence do šesti měsíců. Konkrétní limity pro tyto potraviny jsou uvedeny v Tabulce č.4. Toto nařízení je závazné a právně vymahatelné. Dále jsou limity pro přípustné množství *B. cereus* v různých typech potravin uvedeny v české technické normě ČSN 56 9609 – Pravidla správné hygienické praxe – Mikrobiologická kritéria pro potraviny. V současné době jsou technické normy kvalifikovaným doporučením, které není závazné. Jejich používání je dobrovolné, avšak výhodné k udržení vysokých standardů pro kvalitu a bezpečnost potravin. Monitoring *B. cereus* se doporučuje v potravinách typu lahůdkářské výrobky s majonézou i bez ní, pekařské a cukrářské výrobky, mléčné pudinky, krémy či dezerty. Obecně bývají přípustná množství *B. cereus* v rozmezí 10^3 až 10^5 kolonie tvořících jednotek (KTJ) na 1 gram či mililitr vzorku, v závislosti na konkrétní komoditě. Některé oblasti však stanovily přísnější limity: na Tchaj-wanu je povolený limit pro všechny potraviny 10^2 KTJ/g (ml) (Li et al. 2016a).

Tabulka 4 – Předpokládaný výskyt *B. cereus* u sušené počáteční kojenecké výživy a sušených dietních potravin (Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007)

Plán odběru vzorků		Limity		Analytická referenční metoda	Fáze, na níž se kritérium vztahuje	Opatření, v případě nevyhovujících výsledků
n	c	m	M			
5	1	50 KTJ/g	500 KTJ/g	EN/ISO 7932	Konec výrobního procesu	Prevence opětovné kontaminace, zlepšení hygieny výroby, výběr surovin

n = počet jednotek tvořících vzorek, c = počet jednotek vzorku, jejichž hodnoty leží mezi m a M, m = množství MO přípustné u všech jednotek n, M = množství MO u vzorků s rozsahem $\leq c$

3.5 Metody stanovení a identifikace

Jak již bylo výše uvedeno, dle platných právních předpisů a norem, je vyžadován monitoring výskytu pouze *B. cereus*. ČSN EN ISO 7932 (560092) doporučuje stanovení počtu presumptivních *B. cereus* kultivační metodou za použití Mannitol Yolk Polymyxine B agar (MYP). K identifikaci bakteriálních druhů se nejčastěji používají techniky: kultivačních a sérologických metod, polymerázová řetězová reakce (PCR), pulzní gelová elektroforéza nebo hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS) (Grutsch et al. 2018).

3.5.1 Kultivační metody

Pro detekci a izolaci jsou komerčně dostupná chromogenní média, která dokáží odlišit jednotlivé mikroorganismy (MO) na úrovni rodů i druhů. Rozlišují je na základě specifické reakce MO se složkami média, která se projeví odpovídající barvou jejich kolonií. Příkladem chromogenních médií jsou CHROMagar, Brilliance *Bacillus cereus* agar nebo HiCrome *Bacillus* agar (Demnerová 2012).

CHROMagar slouží k detekci a stanovení skupiny *B. cereus*, která zde vytváří intenzivní modré kolonie s bílým „halo efektem“ okolo, zatímco ostatní druhy *Bacillus* vytváří kolonie modré až bezbarvé, které mohou být úplně potlačeny. Umožňuje detekovat *Bacillus* ve vzorcích již během 24 hodin při kultivaci o teplotě 30 °C (URL5).

Brilliance *Bacillus cereus* agar je chromogenní médium pro izolaci a diferenciaci *B. cereus* ze vzorků potravin. Agar obsahuje chromogenní substrát, který je štěpen enzymem β -glukosidázou, přítomným u *B. cereus*. Díky tomu vznikají na agaru modro-zelené kolonie. Polymyxin B, který se do agaru přidává, inhibuje ostatní druhy *Bacillus*. Spolehlivě odlišit na tomto médiu ovšem nelze některé blízké příbuzné druhy skupiny *B. cereus*, díky identickému biochemické profilu. Takovým druhem je např. *B. thuringiensis*. Pro potvrzení příslušnosti k danému druhu jsou pak třeba následné konfirmační testy. Výsledky jsou odečítány po 24 hodinové kultivaci při teplotě 37 °C (URL6).

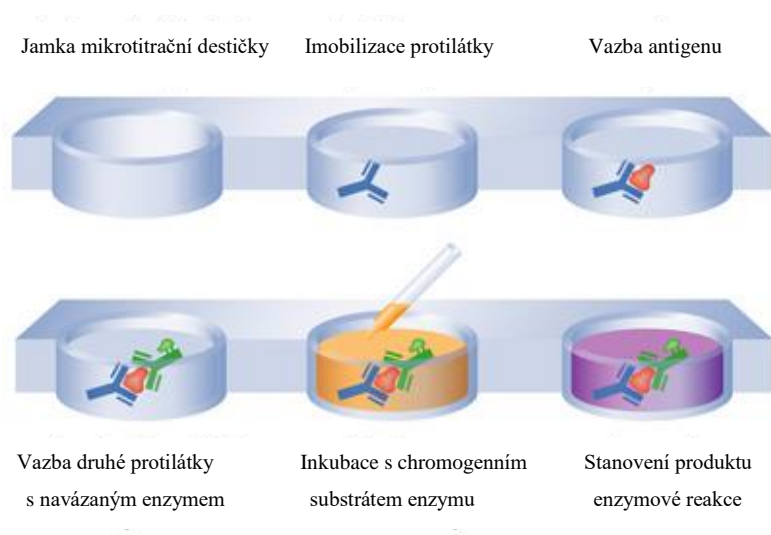
HiCrome *Bacillus* Agar je používán pro izolaci a diferenciaci různých druhů *Bacillus* z potravin, a to jak klinických, tak i neklinických vzorků. Organismy fermentující mannitol rostou na tomto agaru jako žluté kolonie, zatímco *B. cereus* tvoří ploché modré kolonie s modrými středy. *B. thuringiensis* vytváří kolonie modro-zelené s nepravidelnými okraji. Charakteristiky jsou pozorovatelné po inkubaci trvající 24-48 hodin při teplotě 30 °C (URL7).

3.5.2 Sérologické metody

Kromě životaschopných bakteriálních buněk, lze také detekovat toxiny přítomné ve vzorcích. K tomu slouží komerčně dostupné kity, založené na reverzní pasivní latexové aglutinaci (např. BCET-RPLA "SEIKEN" pro detekci enterotoxinu – citlivost 1 ng/ml) nebo na bázi imunologických metod ELISA (např. Duopath® *Cereus* Enterotoxins pro souběžnou detekci hemolysinu BL (HBL) a nehemolytického enterotoxinu (Nhe) (Beecher & Wong 1994; Day et al. 1994; Beattie & Williams 1999; Kotiranta et al. 2000).

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) je enzymová imunoanalýza na pevné fázi. Jedná se o vysoce specifickou a citlivou metodu. Často se používá pro rutinní detekci *B.*

cereus v klinických a výzkumných laboratořích. Je založena na komerčně dostupných protilátkách a jejich reakci s antigenem. Protilátka je při této metodě přichycena na pevný nosič, kam je přidán vzorek interagující s protilátkou. V dalším kroku se aplikuje druhá protilátka značená enzymem. Finální detekce se uskutečňuje enzymovou reakcí, kdy je bezbarvý substrát přeměněn na barevný produkt a měří se intenzita zbarvení. Princip této metody je znázorněn na Obrázku 10 (Demnerová 2012; Xu et al. 2016).

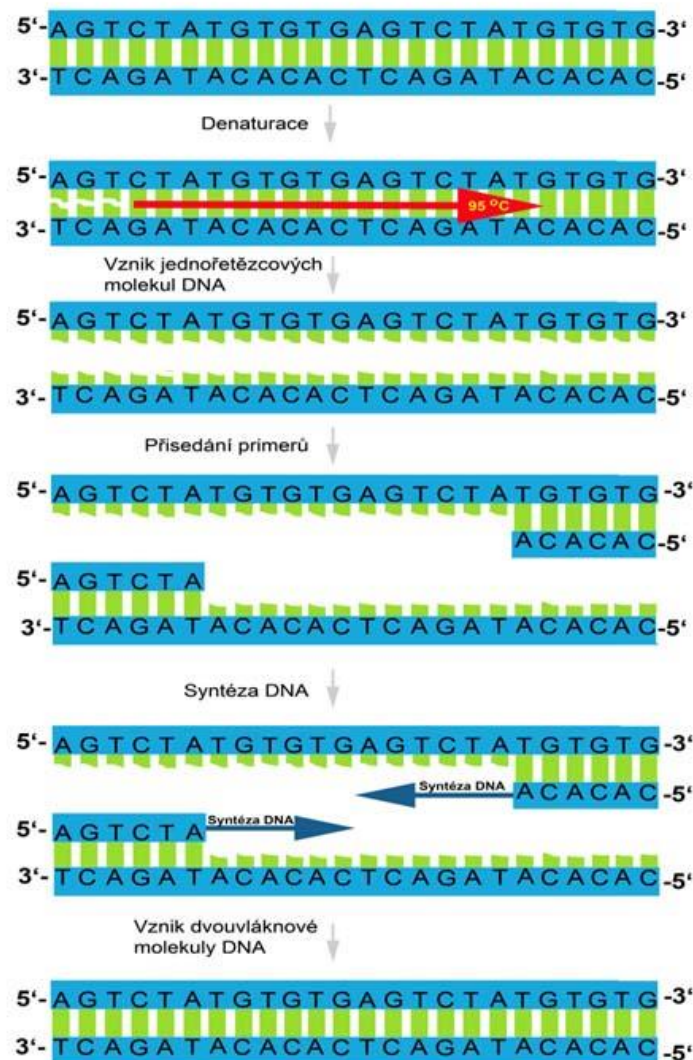


Obrázek 10 - Princip ELISA (Kodíček 2007)

3.5.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Techniku polymerázové řetězové reakce (PCR) vynalezl v roce 1985 americký chemik Kary Mullis a v roce 1993 za ni obdržel Nobelovu cenu. Jedná se o proces, který napodobuje přirozený proces replikace DNA v podmínkách *in vitro*. Díky této metodě lze vytvořit miliony kopií cílového fragmentu DNA z jediné templátové molekuly (Grutsch et al. 2018). Zjednodušeně lze říct, že umožňuje citlivou detekci a analýzu i nepatrného množství nukleových kyselin ve vzorku. Je založena na třech základních krocích. V první fázi se DNA zahřívá na teplotu 94 až 98 °C. Při této teplotě dochází k denaturaci dvojřetězce DNA a vzniku jednotlivých vláken. Ve druhém kroku tzv. hybridizaci či annealingu dochází k navázání primerů (oligonukleotidových sekvencí), které ohraničují požadovaný úsek DNA. Hybridizační teplota závisí na sekvenci a délce primerů. Obvykle se pohybuje v rozmezí 40 až 60 °C. Během posledního kroku je teplota opět mírně navýšena na 70 až 72 °C a za účasti enzymu taq DNA polymerázy je syntetizováno nové komplementární vlákno. Tato fáze je označována jako elongace či extenze. Pro získání dostatečného množství klonů bývá celý cyklus opakován 30 až 50 krát, přičemž počet kopií se po každém cyklu zdvojnásobí. Doba trvání jednotlivých kroků se může pohybovat od 10 sekund až po několik minut, v závislosti na objemu a složení

reakční směsi, délce požadovaného úseku, primární sekvenci templátové DNA a typu taq DNA polymerázy. Namnoženou DNA je pak možné vizualizovat na agarózovém gelu pomocí UV záření a vhodného barviva. Tento princip PCR je zobrazen na Obrázku 11 (Whitney et al. 2004; Evans 2009; Yeung et al. 2009; Miotto et al. 2019).



Obrázek 11 - princip PCR (URL8)

PCR je základem mnoha metod a má široké uplatnění v praxi. Rutinně se využívá v diagnostice onemocnění lidí i zvířat a kontrole potravin. V závislosti na účelu analýzy jsou zvoleny primery, které ohraničují požadovaný úsek. Pro identifikaci mikroorganismů je hojně využíván jako universální biomarker gen kódující malou ribozomální podjednotku – 16S rDNA u prokaryot a 18S rDNA u eukaryot. U některých velmi blízké příbuzných druhů ovšem nemá vždy dostatečnou diskriminační schopnost a proto mohou být jako biomarkery také použity některé protein kódující geny (Yeung et al. 2009; Miotto et al. 2019). Pro identifikaci či průkaz konkrétního mikroorganismu se používají primery rodově či druhově specifické. Další

možností využití PCR je detekce genů, které kódují faktory virulence (viz kapitola onemocnění způsobené *Bacillus cereus*). Tyto geny je možné detekovat ve smíšeném vzorku DNA nebo v DNA čisté kultury a tím stanovit patogenní potenciál daného kmene. Jednou z modifikací PCR, hojně využívanou pro studium patogenního profilu mikroorganismů, je multiplex PCR. Při této technice je během jedné reakce amplifikováno více cílových úseků DNA (genů) zároveň. Obvykle se ale nekombinují více než 4 cílové sekvence, protože je obtížné optimalizovat PCR podmínky pro více párů primerů tak, aby byla zajištěna dostatečná citlivost, specifická a účinnost metody. Dalším důvodem je usnadnění interpretace výsledků (Evans 2009).

Kvantitativní PCR nebo též PCR v reálném čase (qPCR, RT PCR) je další užitečný nástroj v mikrobiologii. Používá se pro přesnou, automatizovanou a kvantitativní detekci různých MO ve vzorku. V tomto případě probíhá detekce vzniklých produktů již v průběhu všech cyklů. Amplifikace DNA se monitoruje pomocí fluorescenčního signálu, který se měří po každém cyklu. Jeho intenzita odráží okamžité množství DNA ampliconů ve vzorku, v daném čase a zvyšuje se spolu s množstvím DNA. Síla signálu je přístrojem automaticky zaznamenávána do křivek. Jako fluorescenční činidla jsou používány buď specifické, nebo nespecifické sondy. Specifickými jsou oligonukleotidové sondy značené fluorescenčně, které se vážou na specifický úsek DNA. Nespecifické sondy jsou založeny na fluorescenčních (interkalačních) barvivech, které se přidávají do směsi a vážou se nespecificky do dvouřetězcové DNA (Evans 2009; Demnerová 2012; Navarro et al. 2015; Kralik & Ricchi 2017; Miotto et al. 2019).

Další variantou PCR jsou fingerprintové metody. Ty se používají pro genotypizaci bakterií, tedy pro studium jednotlivých genotypů. Jedná se o velice citlivou techniku, díky které je možné odlišit různé kmeny v rámci jednoho druhu (Demnerová 2012; Draganić et al. 2017). Mezi fingerprintové metody patří náhodná amplifikace polymorfni DNA (RAPD), interrepetitivní PCR (REP-PCR) nebo multilokusová sekvenční typizace (MLST). RAPD (random amplification of polymorphic DNA) je používána zejména pro analýzu DNA v oblasti genotoxicity. Jedná se o citlivou metodu, schopnou detekovat i malé odchylky v profilech genomu. Zahrnuje amplifikaci fragmentů DNA pomocí náhodně zvoleného primeru (8-12 nukleotidů). Produkt se vytvoří za předpokladu, že existují dvě podobná místa pro nasednutí primeru, které jsou od sebe vzdáleny 3-4 kb. Tato metoda je užitečná pro studium a charakterizaci organismů v lékařství nebo potravinářství. Obdobnou technikou je REP-PCR (repetitive element palindromic PCR). Metoda je cílena na nekódující repetitivní sekvence, které jsou rozptýleny v celém bakteriálním genomu. Rozdíly mezi kmeny jsou vyhodnocovány pomocí délek amplifikovaných úseků. Amplifikované DNA fragmenty představují genomový

otisk prstu, který může být používán k rozlišení poddruhů a vymezení jednotlivých kmenů bakterií. MLST (multilocus sequence typing) je technika molekulární typizace na základě tzv. „housekeeping“ genů. Při této metodě je sekvenován soubor vybraných protein kódujících genů, z nichž je pak vytvořen profil. Je to mezinárodně uznávaná, rychlá a spolehlivá metoda pro typizaci patogenních mikroorganismů a k průzkumu genetického vývoje. Pro MLST profily byla zřízena mezinárodní databáze, která slouží k mapování světového rozšíření klinicky významných druhů bakterií (<http://www.mlst.net/databases/default.asp>) (Nilsson et al. 1998; Hiett & Seal 2009; Demnerová 2012; Dogan et al. 2016; Yang et al. 2016; Draganić et al. 2017; Hercos et al. 2017; Tofalo & Corsetti 2017; Rabha et al. 2018).

3.5.4 Pulzní gelová elektroforéza

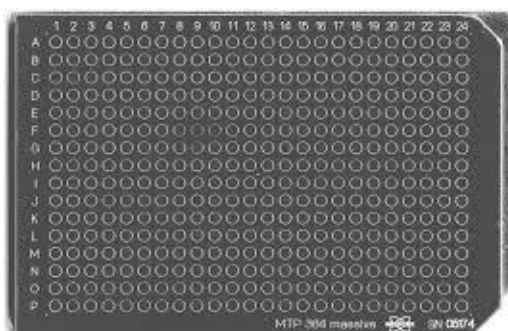
Pulzní gelová elektroforéza je elektroforetická metoda, která taktéž umožňuje rychlou a spolehlivou genotypizaci mikroorganismů, nicméně se neopírá o PCR. Pro separaci se používá chromozomální DNA, která je štěpená restrikcími enzymy na fragmenty o velikosti nad 50 kb. Takto velké fragmenty od sebe nelze oddělit pomocí klasické gelové elektroforézy. Separace tedy probíhá v elektrickém poli, které periodicky mění orientaci mezi třemi různými směry. Čím je molekula delší, tím déle trvá, než přizpůsobí svou orientaci novému poli a rychlost její migrace se zpomaluje. Takto lze přesně detekovat i malé odchylky v genomech (Grutsch et al. 2018).

Pulzní gelová elektroforéza je považována za zlatou standardní techniku pro studium genotypů a od roku 2004 je společně s dalšími metodami široce používána k detekci ohnisek a stopových zdrojů patogenů v Číně. Existuje také snaha o zavedení standardizovaného protokolu. Většina laboratoří totiž používá různé kritické parametry, jako jsou různé restrikcíni enzymy a elektroforetické podmínky. Přijetím tohoto protokolu by mohlo být dosaženo vytvoření mezinárodní databáze jako je tomu u MLST (Hui Juan et al. 2016; Akindolire & Ateba 2018).

3.5.5 MALDI-TOF

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry MALDI-TOF MS) je o jednoduchá, vysoce přesná a rychlá technika pro identifikaci mikroorganismů (Huong et al. 2014; Patel 2015; Grutsch et al. 2018; Karolski et al. 2018; Shannon et al. 2018; Sriram et al. 2018).

Vzorky jsou aplikovány na destičku z nerezové oceli (Obrázek 12) a překryty matricí. Jako matrice jsou obvykle používány aromatické organické kyseliny. Po umístění destičky do hmotnostního spektrometru jsou vzorky s matricí ozařovány krátkými pulsy laseru. Energie laseru je absorbována molekulami matrice, čím dochází k její desorpci. Současně dochází k desorpci analytu a jeho následné ionizaci, přenosem protonu z matrice. Ionty jsou v letové trubici oddělovány na základě poměru hmotnosti ku náboji (m/z) a analyzovány v detektoru, který měří čas letu. Na základě získaných informací je generováno charakteristické spektrum, známé jako hmotnostní. Srovnání tohoto hmotnostního spektra se spektry referenčních kmenů v databázi umožňuje identifikaci organismu. Vyhodnocení probíhá pomocí speciálních softwarových systémů, které vypočítává hodnoty skóre. Čím vyšší je hodnota skóre, tím spolehlivější identifikace viz níže. MALDI-TOF (Obrázek 13) hmotnostní spektrometrie je široce používána hlavně v nemocnicích a klinických laboratořích, pro rychlou identifikaci patogenů (Huong et al. 2014; Patel 2015; Grutsch et al. 2018; Karolski et al. 2018; Sriram et al. 2018).



Obrázek 12 -MALDI destička (URL9)



Obrázek 13 - MALDI-TOF (vlastní fotodokumentace)

Získané identifikace jsou rozděleny do následujících skupin:

Tabulka 5 - Identifikace MALDI-TOF

Skupina	Skóre	Identifikace
1	2,300 – 3,000	Vysoce pravděpodobná identifikace druhu
2	2,000 – 2,299	Bezpečná identifikace rodu, pravděpodobná identifikace druhu
3	1,700 – 1,999	Pravděpodobná identifikace rodu
4	0,000 – 1,699	Nespolehlivá identifikace

4 Materiál a metody

Praktická část diplomové práce byla zaměřena na detekci bakterií rodu *Bacillus* v běžně dostupných potravinách, které díky svým vlastnostem mohou být kontaminovány spórami právě těchto bakterií.

4.1 Testované vzorky

Vzorky potravin použité pro zjišťování přítomnosti bakterií rodu *Bacillus* jsou uvedeny v následující Tabulce č.6. Jednalo se o skupiny potravin: mléko a mléčné výrobky, koření, bylinné čaje, přílohy, sypké směsi pro přípravu nápojů a omáček, potraviny s vysokým obsahem proteinů, dětskou výživu, džem, marmeládu a med. Všechny rozborů byly provedeny v období od února do června 2018. Vzorky psané kurzívou byly před rozbořem ještě pasterovány. Detailnější informace (typ potraviny, datum použitelnosti a datum rozboru) jsou uvedeny v příloze, Tabulka č. I.

Tabulka 6 - Seznam použitých vzorků

Bylinné čajové směsi	Koření	Mléko + mléčné výrobky
<i>Bylinný čaj s ženšenem</i>	<i>Bazalka drhnutá</i>	Kozí bio mléko
<i>Čistící čaj s červenou řepou</i>	<i>Chilli mleté</i>	Kravské mléko
Dehydratované omáčky	<i>Chilli papričky Thai Pride</i>	Ovčí bio mléko
<i>Guláš</i>	<i>Instantní polévka – koření</i>	<i>Ovčí jogurtový nápoj</i>
<i>Svíčková omáčka</i>	<i>Majoránka drhnutá</i>	Sušené mléko
Dětské výživy	<i>Muškatový oříšek</i>	Potraviny s vysokým obsahem proteinů
Dětská zeleninová výživa	<i>Paprika</i>	<i>Hovězí bujón</i>
Dětská krutí výživa	<i>Pepř černý celý</i>	<i>Sušené maso – Beef jerky</i>
Džem, marmeláda, med	<i>Pepř černý mletý</i>	Přílohy
Džem jahodovo-jablečný	<i>Zázvor mletý</i>	<i>Rosické těstoviny</i>
Marmeláda	<i>Zeleninové ochucovadlo</i>	<i>Rýže</i>
<i>Med</i>		Sypké směsi pro přípravu nápojů
<i>Med květový</i>		<i>Horká čokoláda</i>
		<i>Nescafé 3 v 1 classic</i>

4.2 Mikrobiologický rozbor

Vzorky, které nebyly pasterované v průběhu výrobního procesu, byly před vlastním rozbohem ošetřeny teplotou 80 °C po dobu 10 min. Pouze vzorky medu, byly analyzovány jak po pasteraci, tak bez tepelného zásahu. U tekutých potravin byl stříkačkou odebrán 1 ml vzorku a převeden do vialky s 9 ml trypton-sójového bujónu (TSB, Oxoid). V případě sypkých a tuhých vzorků, byl odvážen 1 g vzorku a taktéž asepticky převeden do zkumavky s 9 ml TSB, přičemž tuhé vzorky byly nejdříve rozdrceny či rozemlety. Všechny vzorky byly důkladně homogenizovány na vortexu a sériově naředěny 10⁻⁵. Z každého ředění byl odebrán 1 ml, přenesen do sterilní Petriho misky a přelit příslušným agarem. Pro stanovení aerobních sporulujících bakterií obecně byl použit trypton-sójový agar (TSA, Oxoid), pro selektivní stanovení bakterií skupiny *B. cereus* byl použit Bacillus cereus agar base (Himedia), obohacený o Polymyxin B selektivní suplement (2 vialky/l, Himedia) a žloutkovou emulzi (50 ml/l, Himedia), dle ČSN ISO 7932.

Misky přelité TSA byly kultivovány aerobně při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Presumptivní *B. cereus* byly kultivovány při stejné teplotě po dobu 48 hodin anaerobně. Anaerobní kultivace bylo docíleno pomocí vyvíječe anaerobního prostředí (AnaeroGen, Oxoid viz Obrázek 14), který byl spolu se vzorky vložen do anaerostatu - polykarbonátové nádoby od firmy Oxoid (Obrázek 15).



Obrázek 14 - vyvíječ anaerobního prostředí (vlastní fotodokumentace)



Obrázek 15 – polykarbonátová nádoba (URL10)

4.3 Izolace čistých kultur

Po uplynutí doby kultivace byly na Petriho miskách spočítány kolonie tvořící jednotky (KTJ). Poté byly odebrány samostatné kolonie, převedeny do vialek s trypton-sójovým bujónem a kultivovány dalších 24 h.

Po kultivaci bylo mikroskopicky ověřeno, zda nejsou kultury kontaminované. Čisté kmeny byly dále identifikovány MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií.

4.4 Identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Jeden ml plně narostlé kultury byl odebrán do mikrocentrifugačních zkumavek (Eppendorf) o objemu 1,5 ml. Ty byly odstředěny při 14 500 ot./min po dobu 2 minut a po odstředění byl slit supernatant. Pelet byl resuspendován v 0,5 ml 70% ethanolu a opět odstředěn. Tento proces byl opakován dvakrát, aby bylo důkladně odstraněno veškeré kultivační médium. Připravené vzorky byly opět centrifugovány při 14 500 ot./min po dobu 2 minut, následně byl slit supernatant a pelet ponechán při pokojové teplotě několik minut vyschnout. K peletu bylo přidáno 15 μ l 70% kyseliny mravenčí a 15 μ l acetonitrilu. Vše bylo důkladně promícháno a poté centrifugováno po dobu 2 minut. Nakonec se 1 μ l supernatantu nanesl na MALDI destičku a ponechal uschnout (Obrázek 16). Po uschnutí byl překryt 1 μ l MALDI matrice (kyselina α -cyano-4-hydroxy-skořicová v 50% acetonitrilu s 2,5 % kyseliny trifluoroctové, Bruker Daltonik) a analyzovány pomocí MALDI-TOF hmotnostního spektrometru (Bruker Daltonik GmbH) softwarem FlexControl verze 3.4. Identifikace byla provedena na základě porovnání hmotnostních spekter softwarem BioTyper verze 2.0.

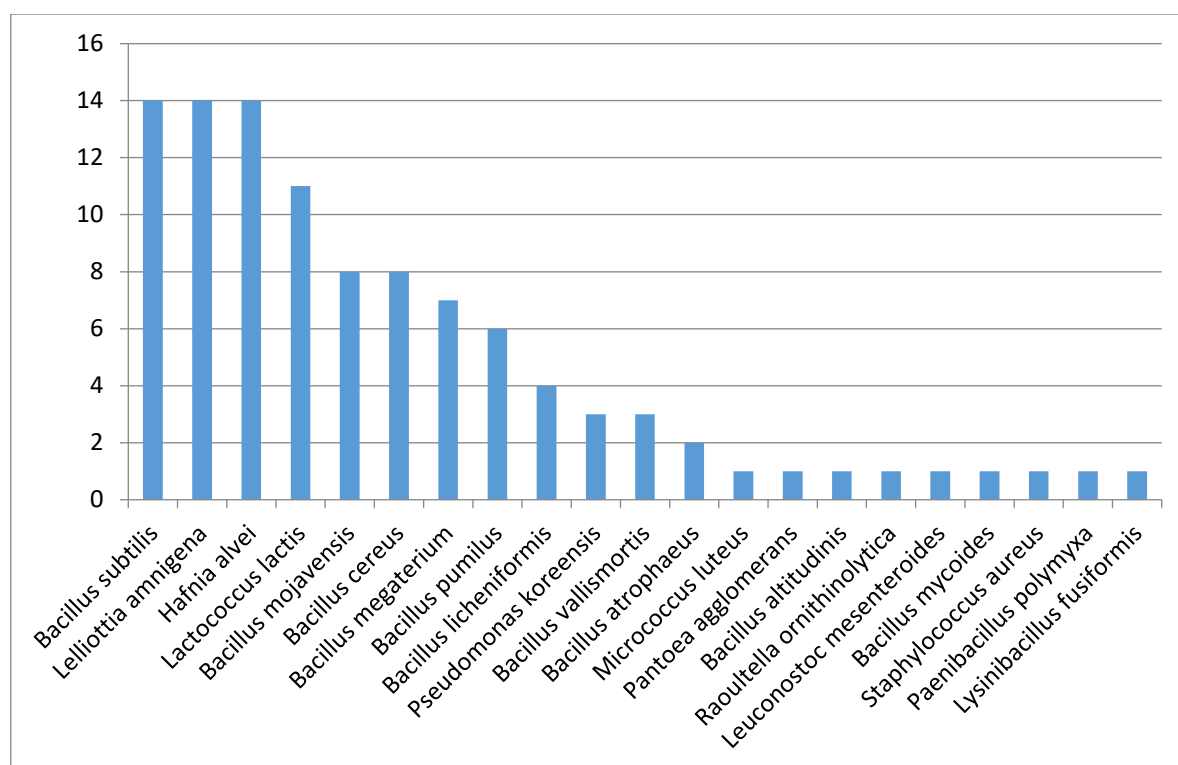


Obrázek 16 - Detail destičky na MALDI-TOF (URL11)

5 Výsledky

Celkem bylo testováno 36 vzorků, z nichž 26 bylo kontaminováno mikroorganismy. Z těchto vzorků bylo izolováno celkem 103 kmenů bakterií. Jejich druhové zastoupení je uvedeno v Grafu 1. Nejčastěji identifikovaným druhem byla bakterie *Bacillus subtilis*, která měla procentuální zastoupení 13,59 %. Ve stejném množství byly identifikovány i nesporulující bakterie *Lelliottia amnigena* a *Hafnia alvei*. Stanovené počty aerobních mikroorganismů jsou uvedeny v příloze v tabulce II.

Graf 1 – Četnost výskytu jednotlivých druhů bakterií

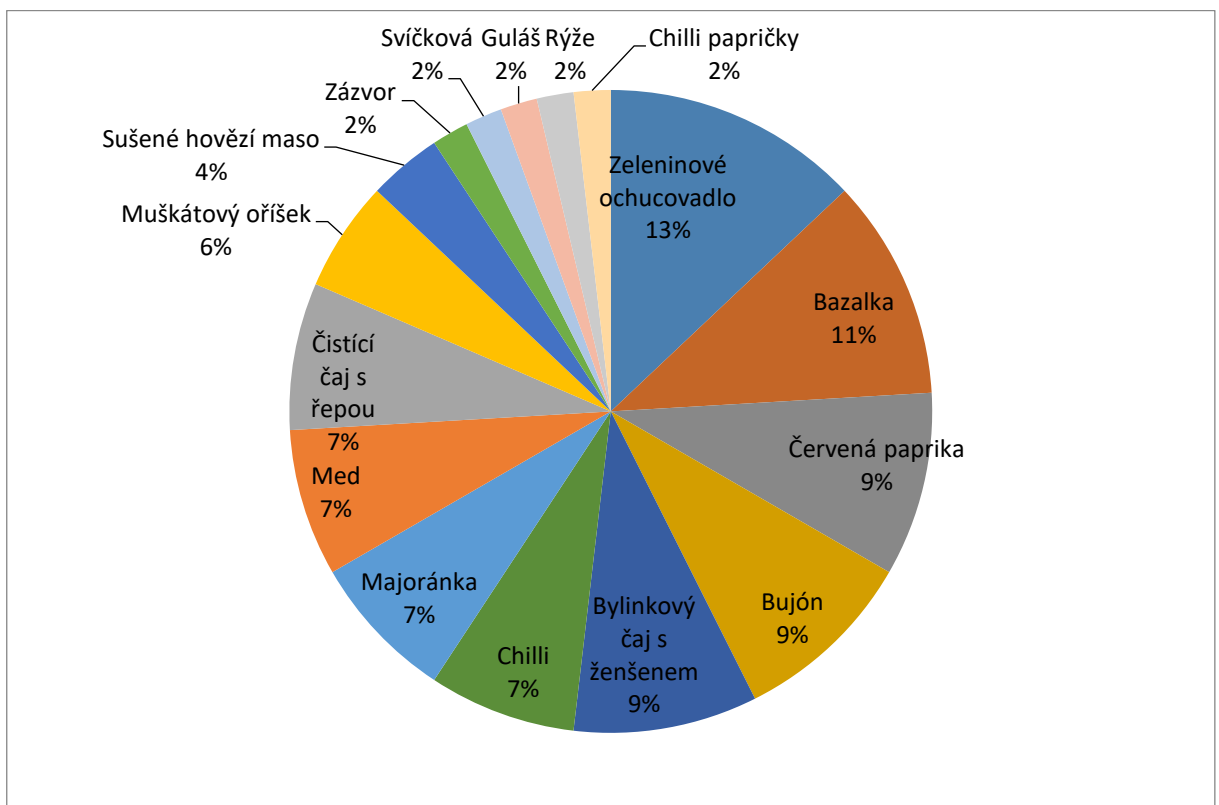


Bakterie rodu *Bacillus* zaujímaly 52,4 % z celkového množství izolátů. Nejčastěji se vyskytovaly v koření typu červená paprika, muškátový oříšek, chilli, zázvor mletý, majoránka, bazalka či v zeleninovém ochucovadle. Četnost bakterií identifikovaných jako *Bacillus* v daných vzorcích je uvedena v Grafu 2. Žádný druh tohoto rodu nebyl nalezen u všech zkoumaných skupin, kterými byly koření, bylinné čajové směsi, potraviny s vysokým obsahem proteinů, džem, marmeláda a med, dehydratované omáčky, přílohy, mléko, sypké směsi pro přípravu nápojů a dětské výživy. Nejrozšířenějším druhem byl *B. subtilis*, který byl nalezen ve 4 skupinách a to v koření, bylinných čajových směsích, přílohách a dehydratovaných omáčkách.

Většina nalezených druhů se vyskytovala ve 2-3 skupinách a jen 2 druhy byly nalezeny v určité skupině (*B. altitudinis* v koření a *B. mycoides* ve skupině marmelád a medu). Největší počet různých druhů (n=9) byl zjištěn u koření, přičemž celkový počet izolátů, identifikovaných jako *Bacillus* spp., byl 31. Nejvyšší diverzita byla ale pozorována u potravin s vysokým obsahem proteinů, kde bylo nalezeno pouze 5 různých druhů, ale celkový počet identifikovaných kmenů byl 7. Pět různých druhů bylo nalezeno také v bylinných čajových směsích z celkového počtu 9 izolátů. Ve skupině džemu, marmelád a medu byly nalezeny 2 různé druhy ze 4 izolátů. V dehydratovaných omáčkách se podařilo spolehlivě identifikovat jen malý počet kolonií (n=2), kdy každý izolát odpovídal jinému druhu. U příloh byla pouze jedna kolonie izolována jako *Bacillus*, zatímco v mléce, sypkých směsích pro přípravu nápojů a dětských výživách nalezen nebyl.

Všechny výsledky s počty nalezených bakterií jsou uvedeny v Příloze v Tabulce IIIa a IIIb.

Graf 2 – Četnost výskytu *Bacillus* v daných potravinách



5.1 Bylinné čajové směsi

V této kategorii nebyl nalezen žádný společný druh pro zkoumané vzorky. U bylinné čajové směsi se zázvorem byl identifikován hlavně *Bacillus megaterium* (n=2). Dalšími nalezenými byly *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* a *Lysinibacillus fusiformis*, od všech druhů po jedné kolonii. V čajové směsi s červenou řepou byl nalezen převažující počet *Bacillus subtilis* (n=4) a *Paenibacillus polymyxa* (n=1).

5.2 Dehydratované omáčky

Bacillus subtilis byl identifikován u směsi na přípravu svíčkové, zatímco ze směsi na guláš byl izolován *Bacillus pumilus*, spolu s *Pantoea agglomerans*.

5.3 Dětské výživy

Studii byly podrobeny také dvě dětské výživy. Zeleninová výživa byla kontaminována velkým množstvím aerobních mikroorganismů, a proto se nepodařilo odebrat a identifikovat žádný čistý kmen. Přesto, že výživa s krůtím masem měla počet mikroorganismů mnohem nižší než zeleninová výživa, podařilo se z ní určit jeden druh, a to *Hafnia alvei*.

5.4 Koření

Mezi dehydratované výrobky, ve kterých byl zjišťován výskyt *Bacillus*, patřily zejména lidmi velice využívané druhy koření. Průměrný počet sporulujících bakterií byl $2,03 \times 10^6$ KTJ/g. Nejčastěji se zde vyskytoval *B. subtilis*, který byl nalezen ve výrobcích typu mleté chilli, majoránka, muškátový oříšek, paprika a zeleninové ochucovadlo. Dále byl izolován *B. megaterium*, spolu se *Staphylococcus aureus*, který se vyskytoval jen u bazalky. *Bacillus cereus* také patřil mezi izolované druhy a nalezen byl v bazalce a majoránce. U chilli papriček, muškátového oříšku a v zeleninovém ochucovadlu byl nalezen druh *B. mojavensis*, poté byl v majoránce se zeleninovým ochucovadlem nalezen *B. licheniformis*. Další druhy byly nalezeny po jedné kolonii v různých vzorcích. V chilli to byl *B. altitudinis*, v paprice *B. atrophaeus* a v zeleninovém ochucovadle *B. vallismortis*.

5.5 Marmeláda, džem, med

Nejvíce se v této skupině vyskytovala *Hafnia alvei*, nalezená u marmelády, džemu i medu. U marmelády a džemu se jednalo o jediný identifikovaný druh. U medu byly dále nalezeny i další druhy - *B. cereus* a *B. mycooides*.

5.6 Mléko

V mléce bylo nalezeno v průměru $5,3 \times 10^4$ bakterií, z nichž žádná nenáležela rodu *Bacillus*. Ve všech vzorcích mlék byla přítomná bakterie *Hafnia alvei*, zatímco v kozím a ovčím mléce byly nalezeny společné druhy *Lelliottia amnigena* a *Lactococcus lactis*. V kozím mléce byly dále zjištěny druhy *Pseudomonas koreensis*, *Micrococcus luteus* a *Leuconostoc mesenteroides*, a u kravského mléka *Raoultella ornithinolytica*. Celkem bylo identifikováno 39 kolonií.

Posledními vzorky z této kategorie byly jogurtové mléko a sušené mléko. Ani u jednoho z těchto dvou vzorků nebyla zjištěna kontaminace sporulujícími bakteriemi.

5.7 Potraviny s vysokým obsahem proteinů

Z potravin tohoto typu bylo zkoumáno sušené hovězí maso a hovězí bujón. V sušeném hovězím mase byly nalezeny druhy *B. megaterium* a *B. licheniformis*. V bujónu byly nalezeny rozdílné druhy, a to *B. mojavensis*, *B. vallismortis* a *B. atrophaeus*. Průměrná kontaminace mikroorganismy byla $1,045 \times 10^3$ KTJ.

5.8 Přílohy

Dále byly testovány přílohy (rýže a těstoviny), kdy v každé z nich byla nalezena pouze jedna kolonie. V rýži to byl *B. subtilis* a v těstovinách *Lactococcus lactis*.

5.9 Sypké směsi pro přípravu nápojů

Z této skupiny byla zkoumání podrobena instantní horká čokoláda a Nescafé 3 v 1 classic. Průměrný počet sporulujících organismů byl $2,345 \times 10^2$ KTJ, ale nepodařilo se spolehlivě identifikovat žádný druh.

6 Diskuze

Potravinami, které bývají nejčastěji kontaminovány *Bacillus* spp. jsou mléčné produkty, dehydratované výrobky (včetně koření), maso, rýže či dětské příkrmy. V této práci bylo zkoumáno 36 vzorků těchto typů potravin a u 17 z nich byla zjištěna kontaminace spórami rodu *Bacillus*.

U žádného zkoumaného druhu mléka nebyl zjištěn výskyt rodu *Bacillus*. Jeho přítomnost ovšem nelze zcela vyloučit, jelikož ve vzorcích byly ve vysokých počtech zjištěny nesporeující bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*. Ty mohly izolaci méně početných skupin mikroorganismů znemožnit. Všechny testované vzorky mlék byly na trh uvedené jako pasterované. Proces pasterace ovšem přežívají pouze spóry bakterií Clostridiales a Bacillales, nebo jen několik termotolerantních druhů z řádu Lactobacillales (Porcellato et al. 2018b). V této práci se však u všech zkoumaných mlék vyskytovaly pouze nesporeující druhy, a to v počtech pohybujících se v rozmezí 5×10^3 až $1,1 \times 10^5$ v 1ml vzorku. Počet mikroorganismů v pasterovaném kravském mléce ($1,1 \times 10^5$) byly dokonce vyšší, než povoluje Nařízení Komise (ES) č. 853/2004, které uvádí, že celkové počty mikroorganismů nesmí být vyšší než 10^5 . V případě *Enterobacteriaceae* je u 5ti vzorků přípustné množství <1 KTJ/g, z nichž je ve dvou případech ještě přípustné množství 5 KTJ/g. Obě tyto skutečnosti svědčí o špatné výrobní a hygienické praxi, přičemž nejpravděpodobnější příčinou byl nedostatečný pasterační proces. V kozím a ovčím mléku byl nalezen také *Lactococcus lactis*, který ale může být vůči pasteraci odolný (Tamime 2009). To potvrzuje i náš výsledek rozboru rosických těstovin, které byly pasterovány po dobu 10 minut při 80 °C, ale přesto v nich byl tento druh nalezen. *L.lactis* patří mezi bakterie mléčného kvašení a je součástí startovací smetanové kultury, využívané k výrobě kysaných mlék, zakysané smetany, tvarohu nebo čerstvých sýrů. Je schopen produkovat kyselinu mléčnou, díky níž se mléko stává kyselé (Tamime 2009). Dále může způsobovat kovovou příchut' mléka (Lidmilová 2016). Tento druh produkuje bakteriocin nisin a některé další biologicky aktivní látky, které inhibují růst některých mikroorganismů rezistentních vůči antibiotikům a chrání proti infekcím. Je účinný proti *Candida*, *Aspergillus* a dalším plísním. Funguje i jako přirozený posilovač imunity, kdy může pomoci předcházet pneumokokové infekci či snížit poškození plic (URL12).

Sosnowski et al. (2016) detekovali v pasterovaném kozím mléce bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, které jsou široce používány jako hygienické indikátory. Do této čeledi patří mimo jiné rody *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* a *Hafnia*, které se řadí k běžným kontaminantům mléka (Tamime 2009). *Hafnia alvei* je druh, který byl izolován ve všech

vzorcích pasterovaných mlék, testovaných v této práci. Vyskytuje se hlavně v mléce, mase či rybích produktech a je považována za běžný bakteriální kontaminant (Souza Viana et al. 2009). Dále ji můžeme najít ve stolici člověka a jiných živočichů, v odpadních vodách, půdě, vodě a bývají poměrně hojné. Pro člověka je to oportunní patogen (Sedláček 2007). Další nalezené bakterie v mlékách byly *Pseudomonas koreensis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Micrococcus luteus* nebo *Raoultella ornithinolytica*. Počty zjištěných bakterií v daných vzorcích jsou uvedeny v příloze v Tabulce IIIb.

V ČR byl zkoumán výskyt bakterií v čerstvém a pasterovaném kozím mléce. V pasterovaném kozím mléce byly nalezeny bakterie *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus* (Cupáková et al. 2012), kdy oba druhy jsou schopny přežít pasteraci (Necidová & Bogdanovičová 2015). V další studii byla hodnocena mikrobiologická kvalita mléka z restaurací ve Španělsku, kdy ve více než 30 % vzorků bylo zjištěno nadlimitní množství *Enterobacteriaceae*, což mohlo být způsobeno nesprávnou manipulací s mlékem a nedostatečnou dezinfekcí nádob. Dvě procenta zkoumaných vzorků bylo pozitivních na *Escherichia coli*, zatímco všechny byly negativní na přítomnost *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* nebo salmonely (Sospedra et al. 2009), které se v našich vzorcích mléka také nevyskytovaly. Porcellato et al. (2018b) prokázali, že se v pasterovaném mléce se nejvíce vyskytuje *Bacillus*, což je v rozporu s výsledky této práce. V jiné studii zase zjistili, že pasterované kozí a kravské mléko neobsahovalo žádné mikroorganismy, ale v čerstvém kravském mléce z automatu se již mikroorganismy nacházely. Pomocí MALDI-TOF byly identifikovány jako *Lysinibacillus fusiformis* (Růžičková 2016). Tato bakterie byla v rámci této práce objevena pouze u bylinné čajové směsi se zázvorem. Rozbor sušeného mléka byl v této práci prostý od mikroorganismů, stejný výsledek byl zjištěn i v jiné práci (Táborská 2009).

Zkoumání bylo podrobena také 50 vzorků sýra, kdy 20 z nich bylo kontaminováno bakteriemi rodu *Bacillus*. Z 50 % se jednalo o bakterie *B. cereus*. Dalším nejhojnějším druhem ve vzorcích sýra byl *B. pumilus* (Iurlina et al. 2006).

Koření je konzumováno mnoha lidmi, včetně potenciálně citlivých spotřebitelů. Přítomné spóry *Bacillus*, které klíčí po zvýšení vodní aktivity, mohou způsobit různá onemocnění. Proto by se měly v potravinách vyskytovat v co možná nejnižších počtech. Tato studie prokázala velké množství bakterií rodu *Bacillus* v potravinách se sníženým obsahem vlhkosti typu dehydratované produkty a koření. Bylo zkoumáno celkem 11 druhů koření, z nichž 8 jich bylo kontaminováno právě bakteriemi rodu *Bacillus*. Mezi tyto kontaminované typy koření patřily bazalka, mleté chilli, celé chilli papričky, majoránka, muškátový oříšek, paprika, mletý zázvor a zeleninové ochucovadlo (vegeta). Nejvíce vyskytující se druh byl *B.*

subtilis, následovaný *B. mojavensis* a *B. pumilus*. Nejobávanější *Bacillus* způsobující onemocnění, *B. cereus*, byl zjištěn jen ve 2 vzorcích koření (bazalka a majoránka) a u 3 zkoumaných vzorků se neprojevila žádná kontaminace. Z toho vyplývá, že dané potraviny byly dobře ošetřeny a následně skladovány za správných podmínek.

Výrazné změny výskytu *Bacillus* v kořeních mohou být zaznamenány mezi značkami i mezi vzorky stejné značky. Mc Kee (1995) uvádí, že několik druhů koření (paprika, červený pepř, černý pepř, tymián a kari) bývá vysoce kontaminováno *B. cereus*, což je opět v rozporu s výsledky této práce. V této práci byly testovány z výše uvedených paprika a černý pepř, v žádném ze vzorků ale *B. cereus* detekován nebyl. Nalezen byl pouze v bazalce a majoránce. V bazalce byla dále nalezena i jedna kolonie *S. aureus*. Tento druh se nejčastěji vyskytuje na kůži lidí, což značí, že ke kontaminaci vzorku došlo v průběhu manipulace. Není ale jasné, zda k ní došlo již při výrobě a balení koření, anebo během laboratorní práce. Jelikož se ale jedná o jedinou narostlou kolonii, tohoto druhu, ve všech zkoumaných vzorcích, lze předpokládat, že ke kontaminaci došlo již ve fázi výroby. Kromě toho byla popsána odolnost tohoto organismu vůči pasteračním teplotám (Necidová & Bogdanovičová 2015), což je s touto teorií v souladu. Absence *B. cereus* v aktuálně studovaných kořeních by mohla být vysvětlena s ohledem na přirozené odchylky výskytu a parametry, o kterých je známo, že ovlivňují mikrobiální kontaminaci, jako je zdroj koření, výrobní proces, stáří a druh koření. Ve studii, provedené autory Frentzel et al. (2018) bylo nalezeno několik kolonií *B. cereus* v kořeních druhu bazalka, oregano, nové koření, petržel a pepř. V novém koření identifikovali ještě *B. toyonensis*, zatímco v pepři byly dále nalezeny *B. weihenstephanensis* (bazonym *B. mycooides*) a *B. thuringiensis*. Poslední zmíněný druh identifikovali také v koření typu paprika. To jsou odlišné výsledky, než které byly zjištěny v této práci, kde v paprice byl nejvíce zastoupen *B. subtilis*, spolu s *B. atrophaeus* a *B. pumilus*. Ze vzorku pepře se nepodařilo identifikovat žádný organismus přesto, že byla izolována čistá kultura. To mohlo být způsobeno tím, že daný druh není součástí databáze pro MALDI-TOF, anebo se jedná o taxon, který zatím nebyl validně popsán. Počet sporulujících bakterií byl ale stanoven na $4,18 \times 10^3$ KTJ/g v mletém pepři, což je vyšší hodnota, než kterou zjistili ve studii Fogle et al. (2018), kde nejvíce kontaminovaný byl právě černý mletý pepř, a to v průměru $3,1 \times 10^2$ KTJ/g. Dále také zjistili, že skořice, kmín, hřebíček, rozmarýn či tymián měly nízkou koncentraci *B. cereus*, což obsahejme pravděpodobně dáno přirozeným obsahem silic a éterických olejů, které působí antimikrobiálně. Celkově byly pozorovány vyšší hladiny kontaminace ve vzorcích z trhu než ze supermarketu. Nejmenší zjištěnou kontaminaci vykazovala hořčice a to 10^1 KTJ/g. Mezi další vzorky patřila bazalka, tymián, kopr, rozmarýn a petržel, z nichž nejmenší množství *B. cereus* měla petržel ze

supermarketu a nejvíce ho bylo v bazalce, také ze supermarketu. Zjištěno bylo množství $9,55 \times 10^2$ KTJ/g (Fogele et al. 2018), což je ale opět nižší počet, než který byl zjištěn v této práci.

Další studium bylo provedeno v Argentině na 30 vzorcích koření. Prevalence výskytu *Bacillus* byla 100 %, kdy průměrné počty byly $2,2 \times 10^3$ KTJ/g v oreganu, $1,4 \times 10^3$ KTJ/g u černého pepře, $2,7 \times 10^3$ KTJ/g u papriky, $2,8 \times 10^2$ KTJ/g u bobkového listu a $2,5 \times 10^4$ KTJ/g u mletého pepře. Všechny druhy koření obsahovaly *B. mycooides*, kdy největší množství bylo zjištěno v červené mleté paprice (Iurlina et al. 2006). V této práci nebyl *B. mycooides* nalezen v žádném druhu koření.

Také ve studii Hariram & Labbé (2015) zkoumali výskyt *Bacillus* v chilli, bazalce, muškátovém oříšku, kurkumě, tymiánu, oreganu, novém koření, kari, mleté cibuli, černém a bílém pepři, zázvoru, majoránce, paprice, skořice nebo třeba česneku. V bazalce byl nalezen jen *B. cereus*, stejně jako v chilli, černém pepři, zázvoru, majoránce, muškátovém oříšku nebo skořici. To je v rozporu s výsledky této práce, kde v chilli bylo nalezeno několik druhů *Bacillus*, ale ani jeden nebyl *B. cereus*, také v muškátovém oříšku nebyl *B. cereus* nalezen. V paprice a česneku byl spolu s *B. cereus* zjištěn i *B. thuringiensis*. V této práci se dospělo u majoránky ke stejnému výsledku jako v předchozí studii, která zjistila, že *B. cereus* byl dominantní druh.

V jiné práci zabývající se mikrobiologickou analýzou koření zjistili, že ve vzorcích jasně dominoval druh *B. subtilis*. Z 294 izolovaných kmenů rodu *Bacillus* se jednalo o *B. subtilis* ve 166 případech. Dále byly identifikovány druhy *B. pumilus* (n=45), *B. cereus* (n=37) a *B. licheniformis* (n=32) (Little et al. 2009). V této práci byl z celkového počtu 54 bakterií identifikovaných jako *Bacillus* sp., zastoupen *B. subtilis* 14 kmeny, *B. pumilus* 6, *B. cereus* 8 a *B. licheniformis* 4 izoláty. Dále byly identifikovány druhy *B. mojavenis* (n=8), *B. megaterium* (n=7), *B. vallismortis* (n=3), *B. atropheus* (n=2), *B. altitudinis* (n=1) a *B. mycooides* (n=1). Witkowska et al. (2011) zjistili, že z 30 kořeních přípravků 80 % obsahovalo sporulující a termofilní bakterie, ale jen majoránka obsahovala *B. cereus*. V této práci byla majoránka také jedním ze dvou druhů, ve kterém se *B. cereus* vyskytoval.

V další studii byl zkoumán výskyt *B. cereus* v sušených kojeneckých mlécích ze Saúdské Arábie a Egypta, kde byl nalezen především *B. licheniformis* spolu s dalšími druhy, jako je *B. sphaericus*, *B. subtilis* a *B. polymyxa* (Organji et al. 2015). To je v rozporu s výsledky Heini et al. (2018), kteří v kojenecké výživě zakoupené ve Švýcarsku zjistili *B. cereus* v 7 vzorcích z 9. Dále jeho výskyt zkoumali v Číně, kde pro tyto produkty neexistují mikrobiologická kritéria. Snažili se tedy dospět k výsledkům, které by poskytly údaje

použitelné pro zajištění bezpečnosti. U nás má sušená kojenecká výživa výskyt *B. cereus* limitovaný legislativou. V dané práci bylo zjištěno, že 7,53 % výrobků (ze 31 vzorků) bylo kontaminováno *B. cereus* v množství $\geq 10^1$ KTJ/g a 1,11 % v množství $> 10^2$ KTJ/g (Pei et al. 2018). Všechny tyto výrobky by tedy v ČR splňovaly předepsaná kritéria. V dalším výzkumu bylo testováno 205 vzorků kojeneckých výživ osmi různých značek získaných na trzích v Káhiře a Gíze. U vzorků byla zjištěna kontaminace aerobními bakteriemi. Kojenecká výživa na bázi pšeničného mléka byla kontaminována bacily v 95 % případech, jídla „ready to eat“ s ovocem z 60 % a se zeleninou z 65 %. Ukázalo se, že nejčastějším kontaminantem tohoto typu potravin je *B. subtilis*, následován *B. circulans* a *B. licheniformis*, zatímco *B. cereus* se vyskytoval jen v 10,2 % z celkového počtu izolátů. Nejvíce se vyskytoval v potravinách s ovocem a zeleninou, poté medem, rýží a pšenící. Ačkoliv se objevil jen v nižším množství, je považován za jeden z nejškodlivějších (Sadek et al. 2018). V této práci byl *B. subtilis* také stanoven jako nejčastější kontaminant potravin. Tento druh byl také zjištěn ve vzorcích celozrnné mouky (Iurlina et al. 2006). V této práci byly rozboru podrobeny dva dětské pokrmy, které mohou způsobit onemocnění nejnáchylnější skupiny. Tyto pokrmy měly po minimálním datu trvanlivosti, ale stále byly dostupné v obchodě. Čistá kolonie se podařila odebrat jen z jedné přesnídávky a byla identifikována jako *Hafnia alvei*, která je již popsána výše.

V této práci byla dále zkoumána směs pro přípravu guláše a svíčkové, kde byl nalezen *B. pumilus* a *Pantoea agglomerans* u směsi na guláš, zatímco u směsi k přípravě svíčkové se vyskytoval pouze *B. subtilis*. Přítomnost *Bacillus* se díky vlastnostem produktu předpokládala, ale *P. agglomerans* je gramnegativní bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, která neodolává pasteračním teplotám. Vysvětlením proto může být nedostatečná homogenizace vzorku. Buňky mohly být skryty mezi slepenými částicemi, kde byly chráněny před tepelným ošetřením. *P. agglomerans* bývá přítomen především na rostlinách a je pouze oportunistickým patogenem lidí a zvířat (Mardaneh et al. 2013). Dalším zkoumaným vzorkem byl hovězí bujón, kde byly izolovány druhy *B. mojavensis*, *B. vallismortis* a *B. atrophaeus*. Jelikož je bujón dehydratovaný výrobek, tak se u něj předpokládal výskyt sporulujících bacilů. *Bacillus* se často vyskytuje i na mase, proto se zkoumal také výskyt těchto bakterií na sušeném hovězím mase, z kterého jsme izolovali *B. licheniformis* a *B. megaterium*.

Iurlina et al. (2006) dále zjišťovali přítomnost bacilů v 70 vzorcích medu, kdy ve 28 z nich, byl identifikován *Bacillus* spp. V těchto 28 vzorcích bylo z celkového množství izolátů 23 % označeno jako *B. cereus* a 4 % jako *B. pumilus*. V této práci byly v medu nalezeny *B. cereus* (n=2), *B. mycoides* a *Hafnia alvei*.

Hariram & Labbé (2016) ve svém výzkumu testovali přítomnost *B. cereus* ve vařené rýži, která byla ponechána při 20 °C bez a s přidavkem koření. Bylo zjištěno, že po přidání koření k rýži jeho množství a tedy i hrozba alimentárních otrav významně narostla. To podporuje tvrzení, že koření bývá často kontaminováno *B. cereus*. Hlavními faktory přispívajícími k výskytu *Bacillus* jsou, pokud je rýže vařená ve velkém množství a následně nedostatečně zchlazená, anebo skladovaná při pokojové teplotě po delší dobu (Vijay K. Juneja et al. 2019). Ankolekar et al. (2009) analyzovali celkem 178 vzorků rýže, z nichž 95 bylo pozitivních na výskyt bakterií rodu *Bacillus*. U 83 z 95 byla většina izolátů identifikována jako *B. cereus* (46,6 %) a u 11 jako *B. thuringiensis* (6,1 %). *Bacillus mycoides* byl převažujícím druhem pouze v jednom vzorku rýže. Kim et al. (2014) detekovali *B. cereus* v hnědé a bílé rýži, přičemž pozitivních na výskyt tohoto druhu bylo 80,6 % (50 vzorků z 62) vzorků hnědé a 57,8 % bílé rýže (37 vzorků z 64). Dále byl u 6 vzorků hnědé rýže a u 6 bílé rýže detekován *B. thuringiensis*. Všechny tyto výsledky odporují výsledkům této práce, jelikož ve zkoumané rýži byl nalezen pouze jediný druh, a to *B. subtilis*. Organji et al. (2015) v rýži našel také druh *B. licheniformis*.

Jako další byly rozboru podrobeny 2 druhy čaje, čistící čaj s řepou a bylinný čaj se zázvorem. U obou čajů byl předpoklad výskytu čeledi *Bacillaceae*, jelikož se jednalo o sušenou směs bylin s kořenovou zeleninou, která mohla být kontaminována z půdy. Často mohou být kontaminovány také bakteriemi čeledí *Staphylococcaceae* a *Paenibacillaceae* (Polášek 2014). V bylinném čaji byly identifikovány druhy *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* a druh *Lysinibacillus fusiformis*. Zatímco v čistícím čaji s řepou byly identifikovány 4 kmeny jediného druhu *Bacillus*, a to *B. subtilis*. Nalezen byl také jeden kmen druhu *Paenibacillus polymyxa*. Výsledky tedy vyšly podle předpokladu. Song (2016) v čaji našel hlavně bakterie patřící do čeledi *Bacillaceae*, což je stejný výsledek, jako v této práci. Jako druhou dominantní skupinu uvádí autor *Pseudomonaceae*. Tato čeleď sdružuje gramnegativní bakterie, které netvoří spóry. V našich vzorcích tedy nebyla zjištěna, pravděpodobně kvůli procesu pasterace před rozbořením.

V roce 2014 proběhlo zkoumání kontaminace tofu ze supermarketů v Soulu, Jižní Korea. Tofu je produkt, který rychle podléhá zkáze a v porovnání s jinými sójovými produkty má velmi krátkou dobu skladovatelnosti. Bylo zkoumáno 100 komerčních produktů a ve 32 z nich byly detekovány aerobní bakterie s průměrným počtem $5,37 \times 10^3$ KTJ/g. Jako dominantní organismus byl zjištěn *B. cereus* (Lee et al. 2017a).

Následující studie se týkala tungrymbai a bekangare, což jsou fermentované sójové potraviny, které se běžně konzumují v Indii. Shromážděné vzorky pocházely z různých vesnic

a trhů v oblastech Meghalaya a Mizoram. V obou typech vzorků byl *Bacillus* přítomen v průměrném množství $1,59 \times 10^8$ KTJ/g a celkem bylo identifikováno 428 izolátů. Druhy *Bacillus* izolované z tungrymbai byly *B. licheniformis* (25,5 %), *B. pumilus* (19,5 %) a *B. subtilis* (55 %). Z bekang izolovali druhy *B. brevis* (2 %), *B. circulans* (7,5 %), *B. coagulans* (6,5 %), *B. licheniformis* (16,5 %), *B. sphaericus* (4,6 %), *B. subtilis* (51,8 %) a *Lysinibacillus fusiformis* (2 %). V obou produktech tedy dominoval *B. subtilis* (Chettri & Tamang 2015).

Vzájemně odlišné výsledky mohou být způsobeny použitím vzorků z různých lokalit nebo různých metod analýzy. Dalším důvodem mohla být nepřesná identifikace. Některé blízké příbuzné druhy od sebe není možné metodou MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie zcela spolehlivě odlišit. Nevýhodou této metody je také omezení identifikace pouze na druhy uvedené v databázi. Druhy, které nejsou součástí databáze, dosud nepopsané taxony a některé atypické kmeny touto metodou identifikovat nelze. Izoláty, které se nepodařilo spolehlivě identifikovat pocházely ze směsi na přípravu guláše, z chilli, mletého zázvoru, zeleninového ochucovadla, celého pepře, hovězího bujónu a čistícího čaje s řepou. V budoucnu budou identifikovány pomocí molekulárně genetických metod.

7 Závěr

Testována byla přítomnost a druhové zastoupení *Bacillus* spp. v různých druzích potravin. Z 36 analyzovaných vzorků byl výskyt zjištěn u 17. Dohromady bylo ze vzorků izolováno 103 kolonií, z nichž 54 bylo identifikováno jako *Bacillus*. Ve vzorcích bylo nalezeno 10 různých druhů, kdy převažujícím byl *B. subtilis*. Ten se vyskytoval ve 4 skupinách potravin (koření, bylinné čajové směsi, přílohy a omáčky), zatím co ostatní druhy byly nalezeny v 1 až 3 skupinách. Žádný z druhů nebyl nalezen ve všech typech výrobků.

Nejčastěji kontaminovanou skupinou bylo koření, které obsahovalo široké spektrum bakterií rodu *Bacillus*. Nejvyšší diverzita byla zjištěna u potravin s vysokým obsahem proteinů, kdy 7 izolovaných kmenů představovalo 5 různých druhů.

Z výsledků a dostupné literatury lze tedy dojít k závěru, že výskyt a druhové zastoupení je závislé na typu potraviny, ale také na původu produktu a postupech zpracování.

8 Seznam literatury

- Evropská Komise. 2007. Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 ze dne 5. prosince 2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Pages 12-29 in Úřední věstník Evropské unie.
- Ministerstvo zemědělství. 2016. Vyhláška č. 398 / 2016 ze dne 2. prosince 2016 o požadavcích na koření, jedlou sůl, dehydratované výrobky, ochucovadla, studené omáčky, dresinky a hořčici. Pages 6286-6311 in Sbírka zákonů. Česká republika.
- Abbas AAY, Amran AM. 2018. *Bacillus Pumilus* Isolated From Healthy Honey Bees. *World Journal of pharmaceutical research* **7** (10): 50–57.
- Akel H, Al-Quadani F, Yousef TK. 2009. Characterization of a Purified Thermostable Protease from Hyperthermophilic *Bacillus* Strain HUTBS71. *European Journal of Scientific Research* **31** (2): 280–288.
- Akindolire MA, Ateba CN. 2018. Use of pulsed field gel electrophoresis genetic typing for tracing contamination with virulent *Escherichia coli* O157:H7 in beef-cattle producing farms. *Gene Reports* **13** (August): 59–65.
- Albert RA, Archambault J, Tindall BJ, Matheny M, Rosselló-Mora R. 2005. *Bacillus acidicola* sp. nov., a novel mesophilic, acidophilic species isolated from acidic Sphagnum peat bogs in Wisconsin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 2125–2130.
- Alina SO, Constantinescu F, Petruța CC. 2015. Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection. *Romanian Biotechnological Letters* **20** (5): 10737–10750.
- Amodio-Cocchieri R, Cirillo T, Villani F, Moschetti G. 1998. The occurrence of *Bacillus cereus* in fast foods. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **49** (4):303–308.
- Angeletti S. 2017. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology *Journal of Microbiological Methods*. Roč. 138. Elsevier B.V. p. 20-29. ISBN: 3906225411461.
- Ankolekar C, Rahmati T, Labbé RG. 2009. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *International Journal of Food Microbiology* **128** (3):460–466.
- Banykó J, Vyletělová M. 2009. Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Letters in Applied Microbiology* **48** (3):318–323.

- Bartoszewicz M, Hansen BM, Swiecicka I. 2008. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiology* **25** (4):588–596.
- Bassi D, Colla F, Gazzola S, Puglisi E, Delledonne M, Sandro P. 2016. Transcriptome analysis of *Bacillus thuringiensis* spore life , germination and cell outgrowth in a vegetable-based food model. *Food Microbiology* **55**: 73–85.
- Beattie SH, Williams AG. 1999. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Letters in Applied Microbiology* **28** (3):221–225.
- Beecher DJ, Wong ACL. 1994. Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits. *Applied and Environmental Microbiology* **60** (12):4614–4616.
- Blackburn C de W, McClure PJ. 2009. Pathogenic *Bacillus* species. *Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control: Second Edition*. Woodhead Publishing Limited. p. 844-888. ISBN: 9781845693626.
- Bron S, Meima ROB, Dijl JANM Van, Wipat A, Harwood CR. 1990. Molecular Biology and Genetics of *Bacillus* species. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* **35**: 1-49.
- Brožová M, Kubizniaková P, Matoulková D. 2018. Mikrobiologie pivovarské výroby – bakterie rodů *Bacillus*, *Brevibacillus* a *Paenibacillus* a kultivační metody pro jejich detekci – 1.část. *Kvasny Prumysl* **64** (2):50–57.
- Caamano-Antelo S, Fernandez-No IC, Bohme K, Ezzat-Alnakip M, Quintela-Baluja M, Barros-Velazquez J, Calo-Mata P. 2015. Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus* spp. based on three housekeeping genes. *Food Microbiology* **46**: 288–298.
- Cadirci O, Gucukoglu A, Terzi Gulel G, Uyanik T. 2018. Enterotoxigenic structures of *Bacillus cereus* strains isolated from ice creams. *Journal of Food Safety* **38** (6):1–6.
- Caetano T, Krawczyk JM, Mösker E, Süßmuth RD, Mendo S. 2011. Heterologous expression, biosynthesis, and mutagenesis of type II lantibiotics from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. *Chemistry and Biology* **18** (1):90–100.
- Castiaux V, Liu X, Delbrassinne L, Mahillon J. 2015. Is Cytotoxin K from *Bacillus cereus* a bona fi de enterotoxin? *International Journal of Food Microbiology* **211**: 79–85.
- Chettri R, Tamang JP. 2015. *Bacillus* species isolated from tungrymbai and be kang , naturally fermented soybean foods of India. *International Journal of Food Microbiology* **197**: 72–

- Collins FWJ, O'Connor PM, O'Sullivan O, Rea MC, Hill C, Ross RP. 2016. Formicin – a novel broad-spectrum twocomponent lantibiotic produced by *Bacillus paralicheniformis* APC 1576. *Microbiology (United Kingdom)* **162** (9):1662–1671.
- Contesini FJ, Melo RR de, Sato HH. 2018. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology* **38** (3):321–334.
- Cupáková Š, Pospíšilová M, Karpíšková R, Janštová B, Vorlová L. 2012. Microbiological quality and safety of goat's milk from one farm. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* **60** (6):33–38.
- Cutting SM. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology* **28** (2):214–220.
- Cutting SM. 2016. Probiotika *Bacillus* - Mechanismus fungování a použití. *Klinické použití probiotik a vlákniny*: 14–19.
- Darland BG, Brock TD. 1971. *Bacillus acidocaldarius* sp.nov., an Acidophilic Thermophilic Spore-forming Bacterium. *Journal of General Microbiology* **67**: 9–15.
- Day TL, Tatani SR, Notermans S, Bennett RW. 1994. A comparison of ELISA and RPLA for detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. *Journal of Applied Bacteriology* **77**: 9–13.
- De Jonghe V, Coorevits A, De Block J, Van Coillie E, Grijspeerdt K, Herman L, De Vos P, Heyndrickx M. 2010. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology* **136** (3):318–325.
- Demnerová K. 2012. Mikrobiologická bezpečnost potravin: Současné strategie pro efektivní kontrolu. *Chemicke Listy* **106** (10):920–925.
- Dodd CER. 2017. Infrequent Microbial Infections Foodborne Diseases. Third Edit. Elsevier Inc. p. 277-288. ISBN: 9780123850072.
- Dogan I, Ozyigit II, Tombuloglu G, Sakcali MS, Tombuloglu H. 2016. Assessment of Cd-induced genotoxic damage in *Urtica pilulifera* L . using RAPD-PCR analysis. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **30** (2):284–291.
- Doll VM. 2012. Analysis of *Bacillus cereus* virulence factors in vitro and in vivo. Technische Universität München. München.
- Draganić V, Lozo J, Biočanin M, Dimkić I, Garalejić E, Fira D, Stanković S, Berić T. 2017. Genotyping of *Bacillus* spp. isolate collection from natural samples. *Genetika* **49** (2):445–456.
- EFSA. 2008. Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *Technical Guidance* **732**: 1-15.

- Ehrenberg. 1835. Dritter Beitrag zur Erkenntniss grosser Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. Physikalische Abhandlungen der Koeniglichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin: 143–336.
- Evans MF. 2009. The polymerase chain reaction and pathology practice. *Diagnostic Histopathology* **15** (7):344–356.
- Fan B, Blom J, Klenk HP, Borriss R. 2017. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an „Operational Group *B. amyloliquefaciens*“ within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in Microbiology* **8** (JAN):1–15.
- Filho JC, Jorge S, Kremer FS, de Oliveira NR, Campos VF, da Silva Pinto L, Dellagostin OA, Feijó RG, de Menezes FGR, de Sousa OV, Maggioni R, Marins LF. 2018. Complete genome sequence of native *Bacillus cereus* strains isolated from intestinal tract of the crab *Ucides* sp. *Data in Brief* **16** :381–385.
- Fogele B, Granta R, Valciņa O, Bērziņš A. 2018. Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. *Food Control* **83** :69–74.
- Frankland GC, Frankland PF, Trans P, Lond RS. 1887. XI. Studies on some new micro-organisms obtained from air. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. **178** :257–287.
- Frentzel H, Kraushaar B, Krause G, Bodi D, Wichmann-Schauer H, Appel B, Mader A. 2018. Phylogenetic and toxinogenic characteristics of *Bacillus cereus* group members isolated from spices and herbs. *Food Control* **83** :90–98.
- Frühauf MP, Kotlářová PL, Slíva J, Ambrožová H. 2016. *Bacillus clausii* – probiotikum rezistentní vůči antibiotikům. *Biotherapeutics* **3** :38–39.
- Ghosh K, Kang HS, Hyun W Bin, Kim K. 2018. High prevalence of *Bacillus subtilis* -infecting bacteriophages in soybean- based fermented foods and its detrimental effects on the process and quality of Cheonggukjang. *Food Microbiology* **76** (May):196–203.
- Glasset B, Herbin S, Granier SA, Laurent C, Lafeuille E, Guérin C, Ruimy R, Casagrande-Magne F, Levast M, Chautemps N, Decousser J-W, Belotti L, Pelloux I, Robert J, Brisabois A, Ramarao N. 2018. *Bacillus cereus*, a serious cause of nosocomial infections: Epidemiologic and genetic survey. *PLoS ONE* **13** (5):1–19.
- Griffiths MW. 2010. *Bacillus cereus* and Other *Bacillus* spp. Pages 1-19 in: Juneja VK, Sofos JN, editors. *Pathogens and Toxins in Foods: Challenges and Interventions*. ASM Press. Washington, DC. ISBN: 0957890710.
- Griffiths MW, Schraft H. 2017. *Bacillus cereus* Food Poisoning. *Foodborne Diseases*. Roč. 22. p. 395-405. ISBN: 9780123850072.

- Grutsch AA, Nimmer PS, Pittsley RH, McKillip JL. 2018. *Bacillus* spp. as Pathogens in the Dairy Industry. Foodborne Diseases. Elsevier Inc. p. 193-211. ISBN: 9780128114445.
- Guo LY, Ling SK, Li CM, Chen GJ, Du ZJ. 2018. *Bacillus marinisedimentorum* sp. nov., isolated from marine sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **68** (1):198–203.
- Hariram U, Labbé R. 2015. Spore Prevalence and Toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Isolates from U.S. Retail Spices. Journal of Food Protection **78** (3):590–596.
- Hariram U, Labbé RG. 2016. Growth and inhibition by spices of growth from spores of enterotoxigenic *Bacillus cereus* in cooked rice. Food Control **64** :60–64.
- Heini N, Stephan R, Ehling-Schulz M, Johler S. 2018. Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from powdered food products. International Journal of Food Microbiology **283** (January):59–64.
- Hercos F, Bezerra da Silva V, Bezerra da Silva R. 2017. Characterization of *Bacillus thuringiensis* Using Plasmid Patterns, AFLP and Rep-PCR. Pages 79-88 in: Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N, editors. *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Springer. Switzerland. ISBN: 9783319566771.
- Hiatt KL, Seal BS. 2009. Use of Repetitive Element Palindromic PCR (rep-PCR) for the Epidemiologic Discrimination of Foodborne Pathogens. Molecular Epidemiology of Microorganisms **551** (6):49–58.
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. 2015. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the the term probiotic. Gastroenterology & Hepatology **11**: 506-514.
- Hirota K, Nishita M, Tu Z, Matsuyama H, Yumoto I. 2018. *Bacillus fermenti* sp. nov., an indigo-reducing obligate alkaliphile isolated from indigo fermentation liquor for dyeing. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **68** (4):1123–1129.
- Horáčková Š. 2010. Nové trendy v probiotikách. Mlékařské listy **120** :19–22.
- Huang T, Zhang X, Pan J, Su X, Jin X, Guan X. 2016. Purification and Characterization of a Novel Cold Shock Protein-Like Bacteriocin Synthesized by *Bacillus thuringiensis*. Scientific Reports **6**:1–15.
- Hui Juan Z, Zhuo P, Jian Chun W, En Min Z, Hong C, Xu Dong L, Wei L. 2016. Optimization of Pulsed-field Gel Electrophoresis Procedure for *Bacillus cereus*. Biomed Environ Sci **29** (3):233–237.
- Huong TT, Kopel P, Komínková M, Guráň R, Ruttkay-Nedecký B, Trnková L, Zítka O, Adam

- V, Kizek R. 2014. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* **1**: 64–66.
- Hwang C-A, Huang L. 2019. Growth and Survival of *Bacillus cereus* from Spores in Cooked Rice – One-Step Dynamic Analysis and Predictive Modeling. *Food Control* **96**:403–409.
- Iurlina MO, Saiz AI, Fuselli SR, Fritz R. 2006. Prevalence of *Bacillus* spp. in different food products collected in Argentina. *LWT - Food Science and Technology* **39** (2):105–110.
- Jamaluddin N, Stuckey DC, Ariff AB, Faizal Wong FW. 2017. Novel approaches to purifying bacteriocin: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **58**:2453–2465.
- Jeon HL, Yang SJ, Son SH, Kim WS, Lee NK, Paik HD. 2018. Evaluation of probiotic *Bacillus subtilis* P229 isolated from cheonggukjang and its application in soybean fermentation. *Lwt Food Science and Technology* **97**:94–99.
- Johnson BA, Anker H, Meleney FL. 1945. Bacitracin: A new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group. *Science* **102** (2650):376–377.
- Juneja VK, Golden CE, Mishra A, Harrison MA, Mohr T, Silverman M. 2019. Predictive model for growth of *Bacillus cereus* during cooling of cooked rice. *International Journal of Food Microbiology* **290**:49–58.
- Kalhotka L, Němcová M, Vyletělová M, Havlíková Š. 2011. Dekarboxylasová Aktivita *Bacillus licheniformis* a její ovlivnění teplotou a dobou kultivace. *Mlékařské listy* **124**:8–11.
- Karolski B, Cardoso LOB, Gracioso LH, Nascimento CAO, Perpetuo EA. 2018. MALDI-Biotyper as a tool to identify polymer producer bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **153**:127–132.
- Kavitha M, Raja M, Perumal P. 2018. Evaluation of probiotic potential of *Bacillus* spp. isolated from the digestive tract of freshwater fish *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822). *Aquaculture Reports* **11**:59–69.
- Kevany BM, Rasko DA, Thomas MG. 2009. Characterization of the complete zwittermicin A biosynthesis gene cluster from *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* **75** (4):1144–1155.
- Kim B, Bang J, Kim H, Kim Y, Kim B sam, Beuchat LR, Ryu JH. 2014. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in Korean rice: Prevalence and toxin production as affected by production area and degree of milling. *Food Microbiology* **42** :89–94.
- Kimura K, Yokoyama S. 2019. Trends in the application of *Bacillus* in fermented foods. *Current Opinion in Biotechnology* **56** :36–42.

- Kodíček M. 2007. *ELISA*. VŠCHT Praha. Available from: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=elisa (accessed 21.3.2019)
- Koelbl T, Bernhard S, Egger B, Meuli-Simmen C, Ly T. 2018. Fulminant wound infection with *Clostridium perfringens* and *Bacillus cereus* in a healthy five year old boy. *Journal of Pediatric Surgery Case Reports* **38**:64–65.
- Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infection. *Microbes and Infection* **2** :189–198.
- Kotlářová ML. 2009. *Bacillus clausii* a jeho antimikrobiální účinky. *Pediatric*: 16.
- Kralik P, Ricchi M. 2017. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology* **8**:1–9.
- Kusmiatun A, Rusmana I, Budiarti S. 2015. Characterization of Bacteriophage Specific to *Bacillus pumilus* from Ciapus River in Bogor, West Java, Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences* **22** (1):27–33.
- Lakshmi SG, Jayanthi N, Saravanan M, Ratna MS. 2017. Safety assesment of *Bacillus clausii* UBBC07, a spore forming probiotic. *Toxicology Reports* **4** :62–71.
- Lawton EM, Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2007. Identification of a novel two-peptide lantibiotic, Haloduracin, produced by the alkaliphile *Bacillus halodurans* C-125. *FEMS Microbiology Letters* **267** (1):64–71.
- Lechner S, Mayr R, Francis KP, Pruss BM, Kaplan T, Wiessner-Gunkel E, Stewart GSAB, Scherer S. 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48** (4):1373–1382.
- Lee H, Kim HY. 2011. Lantibiotics, Class I Bacteriocins from the Genus *Bacillus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **21** (3):229–235.
- Lee DY, Kwon KH, Chai C, Oh SW. 2017a. Microbial contamination of tofu in Korea and growth characteristics of *Bacillus cereus* isolates in Tofu. *LWT - Food Science and Technology* **78** :63–69.
- Lee S, Lee J, Jin YI, Jeong JC, Chang YH, Lee Y, Jeong Y, Kim M. 2017b. Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce. *LWT - Food Science and Technology* **79** :518–524.
- Lefevre M, Racedo SM, Denayrolles M, Ripert G, Desfougères T, Lobach AR, Simon R, Pélerin F, Jüsten P, Urdaci MC. 2017. Safety assessment of *Bacillus subtilis* CU1 for use as a probiotic in humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **83** :54–65.

- Li F, Zuo S, Yu P, Zhou B, Wang L, Liu C, Wei H, Xu H. 2016a. Distribution and expression of the enterotoxin genes of *Bacillus cereus* in food products from Jiangxi Province, China. *Food Control* **67** :155–162.
- Li J, Sajid M, Xin B, Zheng J, Sun M, Liu H, Peng D, Ruan L. 2016b. Thusin, a Novel Two-Component Lantibiotic with Potent Antimicrobial Activity against Several Gram-Positive Pathogens. *Frontiers in Microbiology* **7**:1–12.
- Lidmilová J. 2016. Mikrobiologie tepelně ošetřeného mléka [BSc. Thesis]. Mendelova univerzita v Brně. Brno.
- Little C, Sagoo S, Grant K, Mithani V, Threlfall E, Greenwood M, McLauchlin J, Depinna E. 2009. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. *Food Microbiology* **26** (1):39–43.
- Liu Y, Du J, Lai Q, Zeng R, Ye D, Xu J, Shao Z. 2017. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **67** (8): 2499-2508.
- Liu B, Liu GH, Wang XY, Wang JP, Zhu YJ, Zhang HF, Sengonca C. 2018a. *Bacillus populi* sp. nov. isolated from *Populus euphratica* rhizosphere soil of the Taklamakan desert. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **68** (1):155–159.
- Liu Y, Yu M, Zhang X-H. 2018b. *Bacillus alkalitolerans* sp. nov., isolated from marine sediment near a hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **68** (4):1184–1189.
- Logan NA. 2011. *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of Applied Microbiology* **112** (3):417–429.
- Majeed M, Majeed S, Nagabhushanam K, Arumugam S, Beede K, Ali F. 2018. Evaluation of probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 viability after tea and coffee brewing and its growth in GIT hostile environment. *Food Research International* **12**: 1-28.
- Mardaneh J, Mehdi M, Dallal S. 2013. Isolation , identification and antimicrobial susceptibility of *Pantoea* (Enterobacter) agglomerans isolated from consumed powdered infant formula milk (PIF) in NICU ward : First report from Iran. *Iranian Journal of Microbiology* **5** (3):263–267.
- Miller MB, Bassler BL. 2001. Quorum sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology* **55** :165–199.
- Miotto M, Fonseca AA, Barretta C, da Silva HS, Pellizzaro T, De Dea Lindner J, Vieira CRW, Parveen S, Prudencio ES. 2019. Development and application of a real-time polymerase chain reaction method for quantification of *Escherichia coli* in oysters (*Crassostrea gigas*).

- Food Microbiology **77**:85–92.
- Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* **439** :231–250.
- Necidová L, Bogdanovičová K. 2015. Vliv pasteračních teplot na aktivitu stafylokokových enterotoxinů typu A, B, C. *Mlékařské listy* **152** :7–9.
- Nilsson J, Svensson B, Ekelund K, Christiansson A. 1998. A RAPD-PCR method for large-scale typing of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology* **27**:168–172.
- Niu L, Xiong M, Zhang J, Xiang Y, Song L, Hua Z, Li W. 2018. *Bacillus camelliae* sp. nov., isolated from Pu'er tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **68**: 564-569.
- Oren A, Garrity GM. 2018. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **68**:693–694.
- Organji SR, Abulreesh HH, Elbanna K, Osman GEH, Khider M. 2015. Occurrence and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* in food and infant feces. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **5** (7):515–520.
- Osimani A, Aquilanti L, Clementi F. 2018. *Bacillus cereus* foodborne outbreaks in mass catering. *International Journal of Hospitality Management* **72**:145–153.
- Paldrychová M, Kvasničková E, Mařátková O, Masák J. 2017. Quorum sensing ve vztahu k virulenci mikroorganismů. *Chemicke Listy* **111** (10):637–643.
- Patel R. 2015. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical Chemistry* **61** (1):100–111.
- Pei X, Yang S, Zhan L, Zhu J, Song X, Hu X, Liu G, Ma G, Li N, Yang D. 2018. Prevalence of *Bacillus cereus* in powdered infant and powdered follow-up formula in China. *Food Control* **93**:101–105.
- Pichard B, Larue JP, Thouvenot D. 1995. Gavaserin and saltavalin, new peptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa*. *FEMS Microbiology Letters* **133** (3):215–218.
- Polášek V. 2014. Mikrobiální kontaminace čajů [MSc. Thesis]. Mendelova univerzita v Brně. Brno.
- Porcellato D, Aspholm M, Skeie SB, Mellegård H. 2018a. Application of a novel amplicon-based sequencing approach reveals the diversity of the *Bacillus cereus* group in stored raw and pasteurized milk. *Food Microbiology* **In Press**.
- Porcellato D, Aspholm M, Skeie SB, Monshaugen M, Brendehaug J, Mellegård H. 2018b. Microbial diversity of consumption milk during processing and storage. *International*

- Journal of Food Microbiology **266**:21–30.
- Rabha M, Acharjee S, Sarmah KB. 2018. Multilocus sequence typing for phylogenetic view and vip gene diversity of *Bacillus thuringiensis* strains of the Assam soil of North East India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **34** (7):1–9.
- Radeck J, Gebhard S, Orchard PS, Kirchner M, Bauer S, Mascher T, Fritz G. 2016. Anatomy of the bacitracin resistance network in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **100** (4):607–620.
- Rasigade J, Hollandt F, Wirth T. 2018. Genes under positive selection in the core genome of pathogenic *Bacillus cereus* group members. *Infection, Genetics and Evolution* **65**:55–64.
- Růžičková K. 2016. Výskyt sporulujících bakterií v potravinách [MSc Thesis]. Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha.
- Sadek ZI, Abdel-Rahman MA, Azab MS, Darwesh OM, Hassan MS. 2018. Microbiological evaluation of infant foods quality and molecular detection of *Bacillus cereus* toxins relating genes. *Toxicology Reports* **5**:871–877.
- Sang FM, Li X, Liu J. 2017. Development of Nano-Polymerase Chain Reaction and Its Application. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **45** (11):1745–1753.
- Savini V. 2016. *Bacillus cereus* Pneumonia The Diverse Faces of *Bacillus cereus*. Elsevier Inc. p. 73-84. ISBN: 9780128014745.
- Sedláček I. 2007. Taxonomie prokaryot. Brno, Czech republic. p. 271. ISBN: 80-210-4207-9.
- Shannon S, Kronemann D, Patel R, Schuetz AN. 2018. Routine use of MALDI-TOF MS for anaerobic bacterial identification in clinical microbiology. *Anaerobe* **54** :191–196.
- Shimoyama Y, Umegaki O, Ooi Y, Agui T, Kadono N, Minami T. 2017. *Bacillus cereus* pneumonia in an immunocompetent patient : a case report. *JA Clinical Reports* **3**: 1–5.
- Singh H, Kaur M, Sharma S, Kaur L, Mishra S, Tanuku NRS, Pinnaka AK. 2018. *Bacillus alkalilacus* sp. Nov., isolated from a sediment sample from a lake in India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **68**: 1665-1671.
- Slepecky RA, Hemphill HE. 2006. The Genus *Bacillus* — Nonmedical. p. 530-562. ISBN: 0387307443.
- Song T. 2016. Microbial composition of four kinds of tea with different degree of oxidation [MSc. Thesis]. LUND university. Lund.
- Sosnowski M, Rola JG, Osek J. 2016. Alkaline phosphatase activity and microbiological quality of heat-treated goat milk and cheeses. *Small Ruminant Research* **136** :132–136.
- Sospedra I, Rubert J V, Soler C, Soriano JM, Manes J. 2009. Microbial Contamination of Milk and Dairy Products from Restaurants in Spain. *Foodborne pathogens and Disease* **6**

- (10):2005–2008.
- Souza Viana E, Dantas Vanetti MC, Martino Campos ME, Cuquetto Mantovani H, Reis Ponce A. 2009. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in *Hafnia alvei* isolated from raw milk. *Biological Research* **42** (4):427–436.
- Spencer RC. 2003. Review *Bacillus anthracis*. *Journal of Clinical Pathology* **56** :182–187.
- Spiced. 2016. NEWS letter #3. SPICED, spices & herbs (April).
- Sriram R, Sahni AK, Dudhat VL, Pujahari AK. 2018. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of *Mycobacterium abscessus*. *Medical Journal Armed Forces India* **74** (1):22–27.
- Sultanpuram VR, Mothe T, Chintalapati S, Chintalapati VR. 2017. *Bacillus catenulatus* sp. nov., an alkalitolerant bacterium isolated from a soda lake. *Archives of Microbiology* **199** (10): 1391-1397.
- Sun QL, Yu C, Luan ZD, Lian C, Hu YH, Sun L. 2018. Description of *Bacillus kexueae* sp. nov. and *Bacillus manusensis* sp. nov., isolated from hydrothermal sediments. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **68** (3): 829-834.
- Šviráková E, Hanušová J, Múhlhansová A, Jebavá I, Purkrťová S. 2014. Identifikace *Bacillus* sp. izolovaných z mlékárenských výrobků a výrobního zařízení pomocí PCR a MALDI TOF MS. *Mlékárenské listy* **146** :25–28.
- Székács A, Wilkinson MG, Mader A, Appel B. 2018. Environmental and food safety of spices and herbs along global food chains. *Food Control* **83** :1–6.
- Tabit FT. 2018. Prevalence and growth characteristics of *Bacillus sporothermodurans* in UHT milk. *British Food Journal* **120** (10):2250–2260.
- Táborská K. 2009. Výskyt bakterií rodu *Bacillus* v dehydrovaných potravinách [BSc. Thesis]. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Zlín.
- Tamime AY. 2009. Milk Processing and Quality Management Milk Processing and Quality Management. p. 1-324. ISBN: 9781405145305.
- Tirloni E, Ghelardi E, Celandroni F, Bernardi C, Stella S. 2017. Effect of dairy product environment on the growth of *Bacillus cereus*. *Journal of Dairy Science* **100** (9):7026–7034.
- Tofalo R, Corsetti A. 2017. RAPD-PCR as a Rapid Approach for the Evaluation of Genotoxin-Induced Damage to Bacterial DNA. *Fast detection of DNA Damage: Methods and Protocols* **1644**: 195–201.
- Velkov T, Thompson PE, Nation RL, Li J. 2010. Structure-activity relationships of polymyxin antibiotics. *Journal of Medicinal Chemistry* **53** (5):1898–1916.

- Visiello R, Colombo S, Carretto E. 2016. *Bacillus cereus* Hemolysins and Other Virulence Factors. The Diverse Faces of *Bacillus cereus*. Elsevier Inc. p. 35-44. ISBN: 9780128014745.
- Whitman WB, Vos P De, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Karl-Heinz S. 2012. Bergey's manual of systematic bacteriology - Vol 3: The Firmicutes. Springer-Verlag New York Inc. p. 1-1476. ISBN: 9780387950419.
- Whitney SE, Sudhir A, Nelson RM, Viljoen HJ. 2004. Principles of rapid polymerase chain reactions: Mathematical modeling and experimental verification. *Computational Biology and Chemistry* **28** (3):195–209.
- Witkowska AM, Hickey DK, Alonso-Gomez M, Wilkinson MG. 2011. The microbiological quality of commercial herb and spice preparations used in the formulation of a chicken supreme ready meal and microbial survival following a simulated industrial heating process. *Food Control* **22** (3–4):616–625.
- Wong HC, Chen YL, Chen CLF. 1988. Growth , Germination and Toxigenic Activity of *Bacillus cereus* in Milk Products. *Journal of Food Protection* **51** (9): 707-710.
- Xu W, Cao X, Zhu L, Huang K, He J, Luo Y. 2016. Development of a double-antibody sandwich ELISA for rapid detection of *Bacillus cereus* in food. *Scientific Reports* **6** (1):1–10.
- Yang Y, Yu X, Zhan L, Chen J, Zhang Y, Zhang J. 2016. Multilocus sequence type profiles of *Bacillus cereus* isolates from infant formula in China. *Food Microbiology* **9** (7): 1-16.
- Yeung SN, Butler A, Mackenzie PJ. 2009. Applications of the polymerase chain reaction in clinical ophthalmology. *Canadian Journal of Ophthalmology* **44** (1):23–30.
- Yu S, Wu H, Chen M, Feng Z, Kong L, Wu S, Yu P, Liu C, Zeng H, Wu Q, Ding Y, Zhang J, Gao T, Wang J. 2018. Prevalence, Virulence Genes, Antimicrobial Susceptibility, and Genetic Diversity of *Bacillus cereus* Isolated From Pasteurized Milk in China. *Frontiers in Microbiology* **9**:1–11.
- Yumoto I, Yamazaki K, Tomoo S, Nakano K, Kawasaki K, Ezura Y, Shinano H. 1998. *Bacillus horti* sp. nov., a new Gram-negative alkaliphilic *bacillus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48** :565–571.
- Yusuf U, Kotwal SK, Gupta S, Ahmed T. 2018. Identification and antibiogram pattern of *Bacillus cereus* from the milk and milk products in and around Jammu region. *Veterinary World* **11** (2):186–191.
- Zhang YG, Zhou XK, Guo JW, Xiao M, Wang HF, Wang Y, Bobodzhanova K, Li WJ. 2018. *Bacillus tamaricis* sp. nov., an alkaliphilic bacterium isolated from a Tamarix cone soil.

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **68** (2): 558-563.
- Zhou G, Liu H, He J, Yuan Y, Yuan Z. 2008a. The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. International Journal of Food Microbiology **121** (2):195–200.
- Zhou G, Yan J, Dasheng Z, Zhou X, Yuan Z. 2008b. The residual occurrences of *Bacillus thuringiensis* biopesticides in food and beverages. International Journal of Food Microbiology **127** (1–2):68–72.

Webové stránky:

- URL1 – CDC/Dr. William A. Clark. 1977. Stained using the Leifson flagella stain method, this photomicrograph revealed the presence of three flagellated, *Bacillus cereus* bacteria. CDC. Available from: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=1059> (accessed 12.1.2019).
- URL2 – Acharya T. 2015. Endospore Staining: Principle, Procedure and results. Microbe online. Available from: <https://microbeonline.com/endospore-staining-principle-procedure-results/> (accessed 20.1.2019).
- URL3 – Microbiology in pictures. Sporulating *Bacillus cereus*. Available from: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-micrographs/gram-stain/gram-positive/bacillus-cereus.html> (accessed 12.1.2019).
- URL4 – Vitalvéto expert anti-odor šampón pro psy. Available from: <https://www.vmpprofil.cz/Vitalveto-expert-anti-odor-sampon-pro-psy-300ml-d1692.htm> (accessed 10.3.2019).
- URL5 – Food & Water Q.C. 2018. The chromogenic Media Pioneer. Available from: <http://www.chromagar.com/food-water-chromagar-b-cereus-focus-on-bacillus-60.html#.XId4XjemlaQ> (accessed 15.3.2019).
- URL6 – Oxoid. Dehydrated Culture Media. Available from: http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1036&org=9&c=uk&lang=EN (accessed 15.3.2019).
- URL7 – HiMedia. HiChrom *Bacillus* agar. Available from: <http://himedialabs.com/TD/M1651.pdf> (accessed 15.3.2019).
- URL8 – LabGuide. Polymerázová řetězová reakce (PCR). Available from: <https://labguide.cz/metody/pcr/> (accessed 15.3.2019).
- URL9 – Laboratoř metalomiky a nanotechnologií. Hmotnostní detekce biologicky významných sloučenin pro biotechnologie. Available from: .

http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanolabsys/kurzy/KU1-1_2013_pr.pdf (accessed 13.1.2019).

URL10 – ThermoFisher. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/HP0011A> (accessed 13.1.2019).

URL11 - Bittnerová, Z. 2011. Hmotnostní spektrometrie jako nový způsob identifikace mikroorganismů. ChemPoint. Cit. 13.1.2019. Available from: <http://www.chempoint.cz/hmotnostni-spektrometrie-jako-novy-zpusob-identifikace-mikroorganismu> (accessed 13.1.2019).

URL12 – Picincu A. 2018. SF Gate Healthy eating. Available from: <https://healthyeating.sfgate.com/good-bacteria-found-milk-11465.html> (accessed 15.3.2019).

9 Samostatné přílohy

Tabulka I: Seznam testovaných vzorků

Výrobek	Datum rozboru	Datum trvanlivosti	Výrobek	Datum rozboru	Datum trvanlivosti
Bazalka drhnutá	18.6.2018	11.3.2015	Instantní polévka – koření	18.4.2018	15.5.2020
Bylinný čaj s ženšenem	18.6.2018	31.10.2019	Kozí bio mléko	22.3.2018 11.6.2018	27.3.2018 12.6.2018
Čistící čaj s červenou řepou	18.6.2018	8.2.2018	Kravske mléko	11.6.2018	13.6.2018
Dětská krůtí výživa	11.6.2018	22.3.2018	Majoránka	18.6.2018	30.1.2020
Dětská zeleninová výživa	11.6.2018	22.3.2018	Marmeláda	11.6.2018	29.5.2017
Džem	11.6.2018	5.10.2019	Med	11.6.2018	14.1.2018
Guláš	18.4.2018	30.1.2020	Med květový	11.6.2018	8.2.2020
Horká čokoláda	18.6.2018	31.8.2019	Muškatový oříšek	Únor 2018	30.3.2019
Hovězí bujon	18.6.2018	30.6.2018	Nescafé 3v1 classic	18.6.2018	31.8.2019
Chilli mleté	18.4.2018	30.1.2020	Ovčí bio mléko	22.3.2018 11.6.2018	27.3.2018 12.6.2018
Chili papričky Thai Pride	18.6.2018	28.12.2016	Ovčí jogurtový nápoj	22.3.2018	1.4.2018
Paprika mletá	Únor 2018	30.3.2019	Sušené maso – Beef natural jerky	18.6.2018	17.5.2019
Pepř černý celý	18.6.2018	30.6.2019	Sušené mléko	22.3.2018	3.9.2018
Pepř černý mletý	18.4.2018	19.2.2020	Svíčková omáčka	18.4.2018	28.3.2019
Rosické těstoviny	11.6.2018	20.3.2020	Zázvor mletý	18.4.2018 18.6.2018	30.12.2019 10.11.2010
Rýže	11.6.2018	30.9.2019	Zeleninové ochucovadlo	18.4.2018 18.6.2018	Březen 2018

Tabulka II: Počty sporulujících mikroorganismů

Vzorek	Počet mikroorganismů (KTJ/g)	Vzorek	Počet mikroorganismů (KTJ/g)
Bazalka	$2,05 \times 10^4$	Majoránka	$1,76 \times 10^4$
Bylinný čaj s ženšenem	$1,036 \times 10^6$	Marmeláda	$1,4 \times 10^3$
Čistící čaj s řepou	$9,45 \times 10^5$	Nescafé	$1,09 \times 10^2$
Dětská krutí přesnídávka	$5,4 \times 10^2$	Ovčí mléko	$1,10 \times 10^5$
Dětská zeleninová přesnídávka	1×10^5	Pepř	$4,18 \times 10^3$
Džem	$5,4 \times 10^2$	Pepř celý	2×10^2
Guláš	$1,072 \times 10^6$	Rosické těstoviny	0
Hovězí bujón	2×10^3	Rýže	4×10^3
Horká čokoláda	$3,6 \times 10^2$	Sušené maso	9×10^1
Chilli	$2,59 \times 10^5$	Sušené mléko	4×10^1
Chili papričky	$4,54 \times 10^2$	Svíčková	9×10^3
Kozí mléko	$4,3 \times 10^4$	Zázvor	$1,9 \times 10^7$
Kravné mléko	5×10^3	Zeleninové ochucovadlo	$3,72 \times 10^3$

KTJ – kolonii tvořící jednotka

Tabulka IIIa: Druhové zastoupení a četnost identifikovaných bakterií v daném typu vzorku

Vzorek	Bakterie	Počet izolátů	Vzorek	Bakterie	Počet izolátů
Bylinné čajové směsi			Koření		
Bylinný čaj se zázvorem	<i>Bacillus megaterium</i>	2	Bazalka drhnutá	<i>Bacillus megaterium</i>	4
	<i>Bacillus cereus</i>	1		<i>Bacillus cereus</i>	2
	<i>Bacillus licheniformis</i>	1		<i>Staphylococcus aureus</i>	1
	<i>Bacillus pumilus</i>	1	Chilli	<i>Bacillus pumilus</i>	2
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	1		<i>Bacillus altitudinis</i>	1
Čistící čaj s řepou	<i>Bacillus subtilis</i>	4	Chilli papričky	<i>Bacillus mojavensis</i>	1
	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	1	Majoránka drhnutá	<i>Bacillus cereus</i>	2
Dehydratované omáčky				<i>Bacillus licheniformis</i>	1
Guláš	<i>Bacillus pumilus</i>	1		<i>Bacillus subtilis</i>	1
	<i>Pantoea agglomerans</i>	1	Muškatový oříšek	<i>Bacillus mojavensis</i>	2
Svíčková	<i>Bacillus subtilis</i>	1	Paprika	<i>Bacillus subtilis</i>	1
				Dětské výživy	<i>Bacillus subtilis</i>
Dětská krutí přeseňdávka	<i>Hafnia alvei</i>	1			<i>Bacillus atrophaeus</i>
	Džem, marmeláda, med			<i>Bacillus pumilus</i>	1
Džem jahodovo-jablečný	<i>Hafnia alvei</i>	1	Zeleninové ochucovadlo	<i>Bacillus mojavensis</i>	3
				<i>Bacillus subtilis</i>	2
Marmeláda	<i>Hafnia alvei</i>	1		<i>Bacillus licheniformis</i>	1
				<i>Bacillus valismortis</i>	1
Med	<i>Hafnia alvei</i>	2			
	<i>Bacillus cereus</i>	1			
Med květový	<i>Bacillus cereus</i>	2			
	<i>Bacillus mycoides</i>	1			

Tabulka IIIb: Druhové zastoupení a četnost identifikovaných bakterií v daném typu vzorku

Vzorek	Bakterie	Počet izolátů	Vzorek	Bakterie	Počet izolátů
Mléko + mléčné produkty			Potraviny s vysokým obsahem proteinů		
Koží bio mléko	<i>Lactococcus lactis</i>	7	Hovězí bujón	<i>Bacillus mojavenensis</i>	2
	<i>Lelliottia amnigena</i>	4		<i>Bacillus valismortis</i>	2
	<i>Pseudomonas koreensis</i>	3		<i>Bacillus atrophaeus</i>	1
	<i>Hafnia alvei</i>	3	Sušené maso	<i>Bacillus licheniformis</i>	1
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1		<i>Bacillus megaterium</i>	1
	<i>Micrococcus luteus</i>	1		Přílohy	
Ovčí mléko	<i>Lelliottia amnigena</i>	10	Rosické těstoviny	<i>Lactococcus lactis</i>	1
	<i>Hafnia alvei</i>	4	Rýže	<i>Bacillus subtilis</i>	1
	<i>Lactococcus lactis</i>	3			
Kravské mléko	<i>Hafnia alvei</i>	2			
	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1			