

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Detekce faktorů virulence u bakterií skupiny *Bacillus cereus***

**Diplomová práce**

**Bc. Michaela Šebestová  
Výživa a potraviny**

**Ing. Hana Šubrtová Salmonová, Ph.D.**

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Detekce faktorů virulence u bakterií skupiny *Bacillus cereus*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího 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 14. 4. 2022

---

## Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Haně Šubrtové Salmonové, Ph.D. za veškerý čas věnovaný vedení této diplomové práce, velkou ochotu, trpělivost a podnětné připomínky. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Marii Pruchové za skvělé zaškolení k praktické části i za čas věnovaný kontrolám práce a nápomocnost. Děkuji také mé rodině a partnerovi za veškerou podporu, kterou mi poskytovali v průběhu celého studia.

# Detekce faktorů virulence u bakterií skupiny *Bacillus cereus*

Souhrn

Bakterie skupiny *B. cereus* jsou široce rozšířeny v prostředí a významné jsou zejména v souvislosti s potravinami, jakožto etiologičtí činitelé alimentárních otrav. Zároveň se mohou podílet i na kažení potravin. Významnou roli v patogenezi otrav hrají extracelulární toxiny, které mohou produkovat.

Cílem diplomové práce bylo stanovení toxigenního profilu 105 kmenů izolovaných z potravin, krmiv a životního prostředí a zhodnocení jejich potenciálního rizika pro lidské zdraví. Dále bylo posuzováno, zda se patogenní profil mezi kmeny liší v závislosti na jejich původu. Patogenní potenciál byl stanoven detekcí genů pro cereulid (*ces*), hemolyzin BL (*hbl*), nehemolytický enterotoxin (*nhe*), cytotoxin K (*cytK*), cereolyzin O (*clo*), hemolyzin II (*hlyII*), hemolyzin III (*hlyIII*), immune inhibitor A (*inhA2*), fosfatidylinositol-specifickou fosfolipázu C (*phosC*), fosfatidylcholin-preferující fosfolipázu C (*cerA*), a sfingomyelinázu (*cerB*) metodou PCR. Stanoven byl také potenciál pro quorum quenching detekcí genu pro AHL-laktonázu (*aiiA*).

Převážná většina kmenů v této práci byla identifikována jako *B. cereus sensu stricto*, ostatní druhy byly zastoupeny pouze v malém počtu. U všech testovaných bakterií byly nalezeny nejméně 2 toxinové geny, u žádného se však nevyskytoval *ces* ani *hbl*. Nejvyšší prevalence byla pozorována u *hlyIII* (99 %), *clo* (96 %), *cerA* (94 %), *nhe* (91 %), *pipIc* (90 %) a *cerB* (90 %). Poměrně častý byl také *cytK* (53 %). Málo byl naopak detekován *hlyII* (16 %) a *inhA2* (3 %). Potenciál pro quorum quenching byl zjištěn u 68 % kmenů. V prevalenci 4 genů (*aiiA*, *cytK*, *hlyII* a *pipIc*) byly prokázány statisticky významné rozdíly mezi kmeny různého původu. Nikdy se však vzájemně nelišily izoláty ze všech posuzovaných prostředí. Prevalence *aiiA* a *cytK* byla nejvyšší u kmenů z jedlého hmyzu (98 % a 100 %) a výrobků z hmyzu (91 % a 82 %), *hlyII* u izolátů z výrobků z hmyzu (45 %), ostatních potravin (40 %) a kategorie ostatní (40 %) a *pipIc* dominoval u izolátů z krmiva pro psy (100 %), jedlého hmyzu (98 %), výrobků z hmyzu (100 %) a ostatních potravin (100 %).

Na základě přítomnosti jednotlivých genů pro faktory virulence v genomu byly bakterie rozděleny do 19 patotypových skupin. Nejčastější byla skupina č. 6 (37 kmenů), která byla zastoupena zejména kmeny z jedlého hmyzu a nesla geny *nhe*, *cytK*, *clo*, *hlyIII*, *pipIc*, *cerA* a *cerB*. Druhá nejpočetnější pak byla skupina č. 8 (35 kmenů), která se odlišovala absencí genu pro cytotoxin K a nejvíce se vyskytovala v krmivu pro psy. U těchto 2 patotypových skupin, byly prokázány statisticky významné rozdíly ve výskytu mezi sledovanými prostředími.

Druh *B. cereus sensu stricto* a ostatní druhy se od sebe statisticky významně lišily pouze v prevalenci genů *cytK* a *pipIc*, které byly častější u *B. cereus s. s.* Jiné rozdíly mezi nimi nalezeny nebyly. Jelikož naprostá většina kmenů měla ve své genetické výbavě předpoklady



pro produkci alespoň jednoho enterotoxinu a k tomu i dalších faktorů virulence, potenciálně by u člověka mohla vyvolat průjmové onemocnění. Větší potenciál oproti ostatním kmenům byl pozorován u izolátů z jedlého hmyzu a výrobků z hmyzu, jelikož měly vyšší prevalenci enterotoxinového genu *cytK*. U žádného z kmenů nebyly detekovány geny pro cereulid, tudíž by neměly představovat riziko emetického syndromu.

**Klíčová slova:** *Bacillus cereus*, emetický toxin, enterotoxiny, hemolyziny, alimentární onemocnění, PCR

# Detection of *Bacillus cereus* group virulence factors

## Summary

Bacteria of *B. cereus* group are widely distributed in the environment and in connection with food they are known for their ability to cause foodborne diseases. They can be involved in food spoilage as well. The toxins they may produce play an important role in the pathogenesis of the disease.

The aim of the diploma thesis was to determine the toxigenic profile of 105 strains isolated from food, feed and the environment and to evaluate the potential threat for human health they may pose. It was further assessed whether the pathogenic profile differed between strains of different origin. The pathogenic potential was assessed based on the detection of genes for cereulide (*ces*), hemolysin BL (*hbl*), non-hemolytic enterotoxin (*nhe*), cytotoxin K (*cytK*), cereolysin O (*clo*), hemolysin II (*hlyII*), hemolysin III (*hlyIII*), immune inhibitor A (*inhA2*), phosphatidylinositol-specific phospholipase C (*pipIc*), phosphatidylcholine-preferring phospholipase C (*cerA*), sphingomyelinase (*cerB*) using the PCR method. Quorum quenching potential was evaluated by the detection of AHL-lactonase gene (*aiiA*) as well.

Most of the strains in this thesis were identified as *B. cereus sensu stricto*, while other species were much less common. Each of the bacteria tested carried at least 2 toxin genes. However, none of them harboured *ces* or *hbl*. The highest prevalence was observed for *hlyIII* (99 %), *clo* (96 %), *cerA* (94 %), *nhe* (91 %), *pipIc* (90 %) a *cerB* (90 %). The cytotoxin K gene was also detected in a number of strains (53 %). On the other hand, *hlyII* (16 %) and *inhA2* (3 %) were not found to be frequent among the isolates. The potential for quorum quenching was confirmed for 68 % of the strains. The prevalence of 4 of the genes (*aiiA*, *cytK*, *hlyII* a *pipIc*) differed statistically significantly between the isolates of distinct origin. Nevertheless, the difference was never found between the strains from all the assessed environments. The highest prevalence of *aiiA* and *cytK* was found among isolates from edible insects (98 % and 100 %) and edible insect products (91 % and 82 %). *HlyII* was most common in strains from edible insect products (45 %), other foodstuff (40 %) and other environments (40 %). *PipIc* prevailed in dog food (100 %), edible insects (98 %), edible insect products (100 %) and other foodstuff (100 %) isolates. The bacteria were divided into 19 pathotype groups based on the presence of virulence genes in their genome. Group no. 6 (37 strains), which consisted mostly of the edible insect isolates, was the most common. It harboured the following genes: *nhe*, *cytK*, *clo*, *hlyIII*, *pipIc*, *cerA* a *cerB*. The second most common group (no. 8, 35 strains) differed from group no. 6 in the absence of *cytK* gene. This group was most prevalent in dog food. Statistically significant differences in incidence of these 2 pathotype groups were observed between the monitored environments.

The *B. cereus sensu stricto* species differed statistically significantly from other species only in prevalence of *cytK* and *pipIc* genes, which were more common among *B. cereus s. s.* strains. Other differences were not observed. As the vast majority of strains carried at least one enterotoxin gene along with other virulence genes, they might potentially cause diarrhoeal disease in humans. Greater potential to cause the disease was observed for edible insect and insect product isolates as they had a higher prevalence of the *cytK* enterotoxin gene. None of the isolates were tested positive for the cereulide genes, therefore they should not pose a risk of emetic syndrome.

**Keywords:** *Bacillus cereus*, emetic toxin, enterotoxins, hemolysins, foodborne diseases, PCR

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Taxonomie .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2</b>	<b>Rod <i>Bacillus</i> .....</b>	<b>12</b>
<b>3.3</b>	<b>Charakteristika bakterií skupiny <i>B. cereus</i>.....</b>	<b>13</b>
3.3.1	Selektivní stanovení.....	15
3.3.2	Výskyt a význam .....	16
3.3.2.1	Skupina <i>B. cereus</i> a potraviny.....	16
3.3.2.2	Prevence onemocnění z potravin.....	19
3.3.3	Druhy .....	19
3.3.3.1	<i>Bacillus anthracis</i> .....	19
3.3.3.2	<i>Bacillus cereus sensu stricto</i> .....	21
3.3.3.3	<i>Bacillus cytotoxicus</i> .....	22
3.3.3.4	<i>Bacillus mycoides</i> .....	22
3.3.3.5	<i>Bacillus pseudomycooides</i> .....	23
3.3.3.6	<i>Bacillus thuringiensis</i> .....	23
3.3.3.7	<i>Bacillus toyonensis</i> .....	24
<b>3.4</b>	<b>Patogenita a faktory virulence.....</b>	<b>25</b>
3.4.1	Alimentární onemocnění.....	25
3.4.2	Další onemocnění .....	25
3.4.3	Faktory virulence .....	26
3.4.3.1	Cereulid .....	26
3.4.3.2	Hemolyzin BL .....	28
3.4.3.3	Nehemolytický enterotoxin.....	28
3.4.3.4	Cytotoxin K .....	29
3.4.3.5	Hemolyzin I (Cereolyzin O) .....	29
3.4.3.6	Hemolyzin II.....	30
3.4.3.7	Hemolyzin III.....	30
3.4.3.8	Fosfolipázy.....	31
3.4.3.9	Enterotoxin T.....	32
3.4.3.10	Enterotoxin FM.....	32

3.4.3.11	Immune inhibitor A.....	32
3.5	Quorum sensing, quorum quenching a AHL-laktonáza.....	33
3.6	Regulátory a faktory ovlivňující expresi faktorů virulence.....	34
3.7	Detekce toxinů a toxinových genů .....	35
3.7.1	Polymerázová řetězová reakce.....	35
4	Metodika .....	38
4.1	Testované kmeny .....	38
4.2	Příprava buněčného lyzátu .....	39
4.3	Amplifikace genů pro faktory virulence a AHL-laktonázu .....	39
4.4	Separace a vizualizace PCR produktů.....	42
4.5	Sekvenování .....	42
4.5.1	Purifikace .....	42
4.5.2	Příprava k sekvenování a zpracování sekvencí.....	43
4.6	Statistické vyhodnocení .....	43
5	Výsledky .....	44
5.1	Přítomnost stanovovaných genů .....	44
5.2	Rozdělení kmenů do skupin na základě patotypu .....	47
5.3	Přítomnost sledovaných genů v závislosti na druhu bakterie .....	49
6	Diskuze .....	51
7	Závěr .....	55
8	Literatura.....	56
9	Samostatné přílohy .....	I

# 1 Úvod

Bakterie skupiny *B. cereus* jsou blízce příbuzné bakterie (Baldwin 2020), které jsou široce rozšířeny v prostředí (Logan a De Vos 2009) a často kontaminují také potraviny (Griffiths a Schraft 2017). Jelikož jsou schopny tvořit velmi odolné spory s adhezivními vlastnostmi, bývá problematické je odstranit z potravinářských výrobních zařízení (Parihar 2014). Snadno také mohou přežít šetrnější konzervační postupy a následně hrozí jejich pomnožení. To může mít za následek kažení potraviny, ale i rozvoj alimentárního onemocnění po její konzumaci (Abee et al. 2011). Z tohoto důvodu je výskyt bakterií skupiny *B. cereus* v potravinách předmětem zájmu mnoha studií. Kromě alimentárních nálezů mohou způsobovat také jiná onemocnění, a to nejen u člověka, ale i u dalších živočišných druhů (Logan a De Vos 2009). Na jejich rozvoji se podílí celá řada faktorů virulence (Ramarao a Lereclus 2006) a velmi významnou roli zde hrají bakteriální toxiny (Ceuppens et al. 2013). Geny, které tyto toxiny kódují, jsou umístěny na plasmidech či na chromozomech (Ehling-Schulz et al. 2006) a jejich přítomnost v genomu bakterie je možné stanovit pomocí metody PCR. Díky tomu lze posoudit, jaký patogenní potenciál daná bakterie může mít (Ceuppens et al. 2013). Míra patogenity se totiž mezi jednotlivými kmeny liší (EFSA 2016). Je však třeba podotknout, že přítomnost genu pro určitý toxin nemusí nutně znamenat, že dochází k jeho expresi (Bhunja 2008). Exprese toxinových genů je ovlivněna celou řadou faktorů, mezi něž patří například dostupnost živin (Frenzel et al. 2012) či růstová fáze buňky (Lücking et al. 2009). Přesto lze tímto způsobem zhodnotit, zda daný kmen může pro člověka představovat zdravotní riziko či nikoli (Jessberger et al. 2019b).

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Kmeny *Bacillus cereus sensu lato* izolované z různých prostředí budou produkovat odlišné typy toxinů v závislosti na původu.

Cílem diplomové práce bylo stanovení toxigenního profilu bakterií skupiny *Bacillus cereus* a zhodnocení jejich potenciálního rizika pro lidské zdraví.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Taxonomie

Skupina *Bacillus cereus* neboli *Bacillus cereus sensu lato* se řadí do kmene Firmicutes, třídy Bacilli, řádu Bacillales, čeledi *Bacillaceae* a rodu *Bacillus*. Je tvořena blízce příbuznými bakteriemi, které jsou si po genetické stránce velmi podobné, ale liší se mezi sebou fenotypicky (Baldwin 2020).

Počet druhů náležících k této skupině stále roste a stejně tak se vyvíjí i jejich klasifikace (Bazinet 2017). V současné době skupina sdružuje okolo 20 různých druhů, mezi než patří *B. albus*, *B. anthracis*, *B. bingmayongensis*, *B. cereus sensu stricto*, *B. clarus*, *B. cytotoxicus*, *B. fungorum*, *B. gaemokensis*, *B. luti*, *B. manliponensis*, *B. mobilis*, *B. mycoides*, *B. nitratreducens*, *B. pacificus*, *B. paramycoides*, *B. paranthracis*, *B. proteolyticus*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. toyonensis*, *B. tropicus* a *B. wiedmannii*. Některé z nich však nebyly publikovány v souladu s pravidly Mezinárodního kódu nomenklatury prokaryot a nejsou tak plně validovány. Jedná se o *B. bingmayongensis*, *B. clarus*, *B. gaemokensis* a *B. manliponensis* (Carroll et al. 2021). Taxonomické uspořádání na úrovni druhů a poddruhů v rámci skupiny je stále předmětem výzkumu a diskuzí (Baldwin 2020). V roce 2020 bylo Carroll et al. (2020) navrženo nové uspořádání, a to do následujících druhů: *B. bingmayongensis*, *B. cereus sensu stricto*, *B. clarus*, *B. cytotoxicus*, *B. gaemokensis*, *B. luti*, *B. manliponensis*, *B. mosaicus*, *B. mycoides*, *B. paramycoides*, *B. pseudomycoides* a *B. toyonensis*, přičemž *B. anthracis* by byl nově označován jako *B. mosaicus* subsp. *anthracis*. Toto rozdělení by mělo být jasnější než současné, jelikož je postaveno na genomice, zohledňuje fenotyp a historicky významné názvy druhů (Carroll et al. 2020). Není však zřejmé, zda bude nové názvosloví přijato vědeckou komunitou, jelikož to stávající je hluboce zakořeněno (Baldwin 2020).

### 3.2 Rod Bacillus

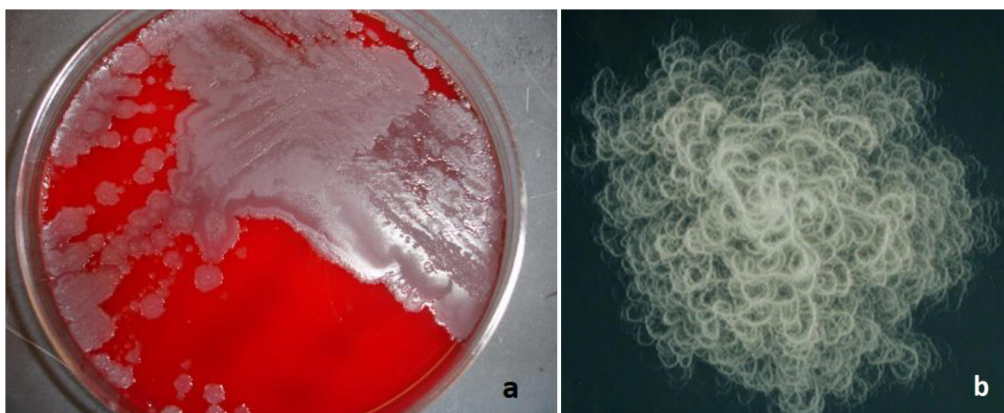
Rod *Bacillus* je velice heterogenní soubor sporulujících bakterií, v rámci něhož je rozeznáváno několik skupin blízce příbuzných druhů, jako je například skupina *B. cereus*, *B. pumilus* nebo *B. subtilis* (Starostin et al. 2015). Zástupci rodu jsou převážně grampozitivní, mají tyčinkovitý tvar a vytvářejí odolné endospory. Obvykle bývají aerobní nebo fakultativně anaerobní, jsou však popsány i druhy striktně anaerobní. Rod *Bacillus* zahrnuje pohyblivé i nepohyblivé zástupce s různými požadavky na teplotu i pH prostředí. Převážně jsou chemoorganotrofní a řada z nich dokáže rozkládat biopolymery. Tyto bakterie jsou prakticky všudypřítomné. Nejvíce se vyskytují v půdě a prostředích kontaminovaných půdou. Izolovány bývají také z vody, potravin či klinických vzorků (Logan a De Vos 2009). Většina z nich je nepatogenní nebo má jen mírný patogenní potenciál, často se však podílejí na kažení potravin. Významné patogeny, které představují zdravotní riziko pro zvířata i člověka sdružuje právě skupina *B. cereus* (Logan a De Vos 2009).



### 3.3 Charakteristika bakterií skupiny *B. cereus*

*B. cereus sensu lato* zahrnuje fakultativně anaerobní grampozitivní sporulující bakterie ve tvaru rovných či mírně zahnutých tyčinek, často se zaoblenými až hranatými konci (Logan a De Vos 2009). Velikost buněk se pohybuje kolem 1–1,2 µm na 3–5 µm (Gordon, Haynes a Pang 1973; Nakamura 1998). Mohou se vyskytovat samostatně, ve dvojicích i řetězcích a některé tvoří dlouhá vlákna (Logan a De Vos 2009). Zástupci skupiny mohou být psychrotolerantní, mezofilní i termotolerantní (Lechner et al. 1998; Logan a De Vos 2009; Guinebretière et al. 2013; Miller et al. 2016). Zatímco některé kmeny jsou schopny růstu při teplotě pod 10 °C (Lechner et al. 1998, Miller et al. 2016) a mohou jim stačit i pouhé 4 °C (Lechner et al. 1998), jiné vyžadují alespoň 10–15 °C. Horní hranicí pak zpravidla bývá teplota 40–45 °C (Logan a De Vos 2009; Liu et al. 2017). *B. cytotoxicus* však roste i při 50 °C (Guinebretière et al. 2013). *B. cereus sensu lato* dokážou růst při pH v rozmezí 4,4–9,3 a vyžadují vodní aktivitu minimálně 0,91–0,93. Zdroje uhlíku, které metabolizují, se mezi druhy liší. Řada z nich je schopna metabolizovat maltózu, D-ribózu, D-glukózu, D-fruktózu, N-acetylglukosamin, trehalózu, škrob, glykogen, arbutin či salicin. Některé druhy pak umí využít i jiné látky, jako je například sacharóza. Některé z nich také dokážou hydrolyzovat škrob, želatinu či kasein (Logan a De Vos 2009; Liu et al. 2017). Jako zdroj dusíku mohou bakterie rodu *Bacillus* využívat organické i anorganické látky (Logan a De Vos 2009). Pro růst *B. cereus* se však ukázaly být nezbytné aminokyseliny valin, leucin a threonin (Agata et al. 1999).

Kolonie *B. cereus sensu lato* bývají i přes značnou variabilitu poměrně snadno rozpoznatelné. Mohou mít kruhový či nepravidelný tvar o průměru asi 2–7 mm. Okraje bývají rovné, zvlňžené, vroubkované či vláknité. Povrch může být matný, zrnitý i hladký a vlhký. Specifické jsou kolonie *B. mycooides*, které se od ostatních druhů liší rhizoidním tvarem a snadno se rozrůstají po celém povrchu agarové plotny, viz Obrázek č. 1 (Logan a De Vos 2009).



**Obrázek č. 1:** (a) Šedé neprůsvitné kolonie *B. cereus* na krevním agaru (Bottone 2010); (b) Rhizoidní kolonie *B. mycooides* na trypton sójovém agaru (Di Franco et al. 2002)

Některé druhy jsou pohyblivé díky peritrichálním bičíkům (Logan a De Vos 2009). Obecně bičíky umožňují dva hlavní typy pohybu, a to plavání v tekutých médiích (tzv. swimming) či plazivý pohyb na pevném povrchu (tzv. swarming). Bylo zjištěno, že plazivý pohyb napomáhá bakteriím v kolonizaci hostitele, a v případě patogenních kmenů tímto významně přispívá k jejich patogenitě (Senesi et al. 2010). Tyto plazivé buňky se od běžných buněk liší. Jsou delší a nesou více bičíků. U *B. cereus sensu lato* se lze setkat s oběma typy pohybu, přičemž bylo vypořádáno, že s diferenciací na buňku schopnou plazivého pohybu je spojeno i významné zvýšení sekrece hemolysinu BL (Ghelardi et al. 2007).

Důležitou vlastností bakterií skupiny je schopnost vytvářet endospory (Logan a De Vos 2009), které odolávají teplu, radiaci, desinfekčním prostředkům i vysušení (Parihar 2014). Mívají elipsoidní tvar a mohou být umístěny centrálně až subterminálně. Nezpůsobují zduření buňky (Logan a De Vos 2009; Guinebretière et al. 2013; Jiménez et al. 2013). Jejich délka se pohybuje okolo 1,5  $\mu\text{m}$  a průměr bývá kolem 0,8–0,9  $\mu\text{m}$  (Carrera et al. 2007). Jedna buňka *B. cereus sensu lato* vytváří pouze jednu endosporu, a to na konci exponenciální růstové fáze (Logan a De Vos 2009). Struktura spor se výrazně liší od vegetativních buněk. Povrch spory je tvořen exosporiem, pod nímž se nachází pláště, vnější membrána, kortex, buněčná stěna, a nakonec jádro obklopené vnitřní membránou (Setlow 2006). Tato membrána obsahuje receptory, na něž se vážou živiny indukující klíčení spor (Setlow 2003). K těmto živinám patří například aminokyseliny či ribosidy (Moir et al. 2002). Mimoto mohou klíčení vyvolat také další faktory, jako je lysozym, vysoký tlak či vápenaté kationty (Gould 1969 cit. dle Setlow 2003).

Spory mají díky povrchovým strukturám a hydrofobní povaze schopnost adherovat na různé povrchy (Tauveron et al. 2006; Faille et al. 2007; Griffiths a Schraft 2017). Mezi jednotlivými kmeny se míra této schopnosti liší (Tauveron et al. 2006; Faille et al. 2007). Adherované spory je obtížné odstranit z různých výrobních zařízení, například v potravinářských provozech (Parihar 2014). Ve chvíli, kdy pominou nepříznivé podmínky, spory mohou vyklíčit a vegetativní buňky se významně pomnožit. K tomu může docházet i v potravinách konzervovaných za použití šetrnějších konzervačních metod. Tyto potraviny pak činností mikroorganismů podléhají zkáze, případně mohou vyvolat onemocnění, jedná-li se o patogeny (Abee et al. 2011). Spory i vegetativní buňky *B. cereus* jsou vyobrazeny na Obrázku č. 2.



**Obrázek č. 2:** Vegetativní buňky a elipsoidní spory *B. cereus* (Logan a De Vos 2009)

Bakterie skupiny mohou vytvářet biofilm, což je přisedlé společenství mikrobu obklopených extracelulární polymerní hmotou, kterou sami produkují. Uvnitř něho najdeme diferencované skupiny buněk. Bakterie, jež jsou součástí biofilmu, jsou odolnější oproti planktonicky rostoucím a bývají také příčinou řady perzistentních a chronických infekcí (Costerton et al. 1999). Tvorba biofilmu může být ovlivněna řadou faktorů. V laboratorních podmínkách byl pozorován vliv použitého živného média i délky inkubace. Bylo zjištěno, že nižší pH a nižší koncentrace glukózy přispívá u *B. cereus* k jeho vzniku, zatímco vyšší koncentrace glukózy tvorbě brání (Kwon et al. 2017). Biofilm se rozdílně tvoří také na površích z různého materiálu. Dle studií *B. cereus* vytvářel více biofilmu na povrchu z nerezové oceli v porovnání s polystyrenem (Hayrapetyan et al. 2015) nebo sklem. To může být obzvlášť problematické v potravinářských provozech (Kwon et al. 2017), kde je nerezová ocel běžně používána. Z biofilmu se totiž mohou uvolňovat jak bakteriální buňky, tak i spory a kontaminovat potraviny. Oproti planktonickým buňkám byla v biofilmu pozorována vyšší tvorba spor (Hayrapetyan et al. 2015). Tvorba společenství se liší mezi jednotlivými kmeny (Park et al. 2019, Adame-Gómez et al. 2020).

Harada a Nascimento (2021) zkoumali efekt několika metod sanitace na biofilm *B. cereus* a porovnávali je s roztokem chlornanu sodného (200 mg/l), sanitčního prostředku běžně používaného v potravinářských provozech. Konkrétně testovali plynný ozón, suché teplo (90 °C), UV-C záření, 70% etanol a komerční sanitční prostředek na bázi kvartérních amoniových solí a isopropyl alkoholu. Nejvyššího účinku dosahovalo UV-C záření, avšak v porovnání s kontrolou (chlornan sodný) měly všechny tyto metody nízkou účinnost. Autoři také zaznamenali, že lepších výsledků bylo možné dosáhnout prodloužením expozice testovaným metodám. Delší čas expozice by však nemusel vyhovovat potřebám potravinářských podniků.

### 3.3.1 Selektivní stanovení

Od ostatních druhů rodu *Bacillus* lze členy skupiny *B. cereus* odlišit na základě jejich odolnosti 0,001 % lysozymu, lecitinázové aktivity, absence fermentace manitolu a pozitivní reakce ve Voges-Proskauerově testu (Griffiths a Schraft 2017). K běžně používaným selektivním médiím pro izolaci a identifikaci

*B. cereus* patří MYP agar (mannitol–egg yolk–polymyxin) a PEMBA agar (polymyxin–pyruvate–egg yolk–mannitol–bromothymol blue agar). Kolonie na MYP agaru mají fialovo–červené pozadí a vytvářejí kolem sebe zónu precipitace. Na PEMBA pak vznikají typicky tyrkysové až modré kolonie, taktéž obklopené precipitátem vaječného žloutku. Standardizované postupy k izolaci bakterií jsou k nalezení v normách ISO 7932 a ISO 21817. Udává je také FDA (Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) (Griffiths a Schraft 2017).

### 3.3.2 Výskyt a význam

Bakterie skupiny *B. cereus* jsou prakticky všudypřítomné (Griffiths a Schraft 2017). Nacházejí se například v půdě, vodě, organických materiálech jako je kůže, ovčí vlna, rostliny či hnůj, také v papíru a domácím i nemocničním prostředí. Izolovány byly též ze zažívacího traktu hmyzu, zvířat i člověka (Logan a De Vos 2009) či z celé řady potravin, o čemž je více pojednáno v následující podkapitole. Ve skupině najdeme patogeny, které mají negativní dopad na zdraví zvířat i lidí (Baldwin 2020). V této souvislosti bývá často zmiňován zejména *B. anthracis* (Sternbach 2003) či *B. cereus* (Parihar 2014), ale nejedná se o jediné zástupce schopné vyvolat onemocnění (Guinebretière et al. 2013). Dále se bakterie skupiny mohou podílet na kažení potravin. Za něj jsou zodpovědné jejich proteázy, lipázy a fosfolipázy (Meer et al. 1991). V mléce může *B. cereus* způsobovat vadu označovanou jako sladké srážení (Overcast a Atmaram 1974). Zapříčiňuje také hořknutí smetany a další nežádoucí organoleptické změny (Cox 1975). *B. cereus sensu lato* zahrnují však i druhy, které mají pozitivní význam. Konkrétním příkladem je *B. thuringiensis*, jenž nachází využití v zemědělství jako biopesticid (Kumar et al. 2021) nebo *B. toyonensis*, který je díky svým probiotickým vlastnostem používán jako doplněk stravy zvířat (Jiménez et al. 2013).

#### 3.3.2.1 Skupina *B. cereus* a potraviny

Jak bylo zmíněno, bakterie skupiny *B. cereus* se mohou nacházet v řadě potravin, mezi něž patří maso a masné výrobky, mléko a mléčné výrobky, rýže, zelenina či koření. Jelikož se jedná o všudypřítomné bakterie, jejich spory jsou zcela běžně přítomny v různých surovinách (Griffiths a Schraft 2017) a jejich výskytu v potravinách se nelze zcela vyhnout (Jessberger et al. 2020). Aby však došlo k rozvoji onemocnění, jsou zapotřebí vysoké počty těchto bakterií, kterých může být dosaženo zejména při uchovávání potravin v podmínkách podporujících jejich růst (Griffiths a Schraft 2017). Alimentární onemocnění vyvolaná skupinou *B. cereus* bývají většinou spojena s kontaminací potraviny či pokrmu v koncentraci nad  $10^5$  KTJ/g, byly však hlášeny i případy onemocnění v souvislosti s nižší úrovní kontaminace. U některých případů tzv. emetického syndromu, který se projevuje zvracením, bylo zjištěno i méně než  $10^2$  KTJ/g potraviny (EFSA 2016). Kontaminace potraviny však nemusí vždy nutně znamenat riziko pro zdraví konzumenta, jelikož ne všechny kmeny jsou patogenní (Jessberger et al. 2019b) a i mezi patogenními kmeny se míra patogenity liší. Je však třeba podotknout, že faktory virulence jsou mezi zástupci skupiny široce rozšířeny. Téměř u všech kmenů *B. cereus*

je možné najít geny pro nehemolytický enterotoxin a kódující sekvence pro hemolyzin BL a cytotoxin K bývají detekovány u 30–70 % izolátů. Na rozdíl od genů pro cereulid, tyto geny běžně nesou i ostatní druhy skupiny. V genetické výbavě dále mohou mít bakterie skupiny *B. cereus* také sekvence kódující hemolyziny, fosfolipázy C, sfingomyelinázu a metaloproteázy, jejichž role je ještě potřeba lépe prozkoumat (EFSA 2016). Zmíněné faktory virulence jsou blíže popsány v kapitole 3.4.3.

V potravinářském průmyslu představují *B. cereus sensu lato* riziko pro porušení zdravotní nezávadnosti potravin, zároveň však i riziko zbytečných ekonomických ztrát, pokud by docházelo k likvidaci šarží výrobků kontaminovaných nepatogenními kmeny. Z těchto důvodů by bylo užitečné najít spolehlivý a prakticky použitelný způsob, jak posoudit riziko, které může z kontaminace plynout. Jessberger et al. (2019b) vypožorovali korelaci mezi třemi faktory (exprese B komponentu nehemolytického enterotoxinu a sfingomyelinázy a aktivita exoproteáz) a mírou enteropatogenity testovaných kmenů. Vysoce patogenní kmeny exprimovaly zmíněný B komponent i sfingomyelinázu a měly vyšší proteázovou aktivitu. Tato zjištění by mohla sloužit jako základ pro vývoj rychlých metod posouzení míry patogenity, které by našly využití v rutinní diagnostice.

#### 3.3.2.1.1 Prevalence v potravinách

Výskytem *B. cereus sensu lato* v různých potravinách se již zabývala řada autorů a z jejich výsledků si lze povšimnout rozdílů ve zjištěné prevalenci (Kim et al. 2014; Tewari et al. 2015; Saleh-Lakha et al. 2017; Pei et al. 2018). Například Samapundo et al. (2011) při rozboru čerstvého mletého masa odhalili kontaminaci u 15 % testovaných výrobků. Tewari et al. (2015) pak shledali přítomnost *B. cereus* u 30,85 % ze zkoumaných vzorků masa a masných výrobků, přičemž jejich počty se pohybovaly v řádech  $10^2$  až  $10^4$  KTJ/g. Podobnou prevalenci jako Tewari et al. uvedli pro maso také Rather et al. (2012), zjistili však vyšší úroveň kontaminace (až  $1,51 \times 10^6$  KTJ/g). Vyšší byla v této studii také prevalence *B. cereus* v masných výrobcích (51,85 %). V případě pasterizovaného mléka byla v jedné studii zjištěna prevalence 30 % (Berthold-Pluta et al. 2019), zatímco v jiné, dřívější, 56 % a úroveň kontaminace se zde pohybovala od 10 do  $3 \times 10^5$  KTJ/ml (Larsen a Jørgensen 1997). Jak zjistili Saleh-Lakha et al. (2017), na prevalenci má patrný vliv teplota skladování (podrobněji viz kapitola 3.3.2.2), čímž by mohla být odůvodněna skutečnost, že během léta byla v mléce pozorována výrazně vyšší prevalence (72 %) než během zimy (28 %) a stejně tak to platilo pro počty bakterií (Larsen a Jørgensen 1997). Další významnou potravinou je rýže. Ankolekar et al. (2009) našli spory *B. cereus* u 52,8 % testovaných vzorků. Kim et al. (2014) pak zkoumali rozdíly mezi rýží nezpracovanou, hnědou a bílou a pozorovali, že se prevalence snižovala s postupem zpracování. Zatímco v případě nezpracované rýže se podařilo izolovat spory *B. cereus* z 96,8 % vzorků, u hnědé rýže už jen z 80,6 % a u bílé pouze z 57,8 %. Izolovány byly také spory *B. thuringiensis*, ale v daleko menší míře a obdobný trend u nich nebyl patrný. Oproti předešlým studiím Berthold-Pluta et al. (2019) zaznamenali nižší výskyt *B. cereus*. Pozitivních bylo jen 27,1 % vzorků rýže, přičemž stanovené počty těchto bakterií nepřesáhly  $10^3$  KTJ/g. Ve stejné studii byla věnována pozornost také těstovinám, u nichž

prevalence činila 37 %. Naproti tomu Rusul a Yaacob (1995) našli *B. cereus* u 100 % testovaných pšeničných nudlí. Analyzovali však jen poměrně malý počet vzorků (12). Samapundo et al. (2011) dále zjistili 20% prevalenci u vařených těstovin. Kromě toho analyzovali také zeleninu a *B. cereus* identifikovali u 27,5 % z celkového počtu vzorků. K podobnému výsledku (20,1 %) došli už dříve Kaneko et al. (1999). Kontaminována může být dále také umělá mléčná výživa. Pei et al. (2018) odhalili *B. cereus* u 7,53 %, Sánchez-Chica et al. (2021) u 11 % a Berthold-Pluta et al. (2019) dokonce u 30 % vzorků. Úroveň kontaminace však byla u naprosté většiny z nich pod  $10^3$  KTJ/g (Pei et al. 2018; Berthold-Pluta et al. 2019; Sánchez-Chica et al. 2021). Kromě výše zmíněných potravin a pokrmů bývají *B. cereus sensu lato* kontaminovány také například snídaňové cereálie, koření, sladké pečivo, pokrmy z brambor, pšeničná mouka, kukuřičný škrob, různé sýry či luštěniny a výrobky z nich (Rusul a Yaacob 1995; Bonerba et al. 2010; Berthold-Pluta et al. 2019; Sánchez-Chica et al. 2021).

Zajímavou kategorií potravin, u níž je skupina *B. cereus* taktéž předmětem zájmu, je jedlý hmyz a výrobky z něj. Jedlý hmyz patří mezi tzv. nové potraviny, tedy potraviny, které nebyly na území Evropské Unie ve významné míře konzumovány před 15. 5. 1997. Na trh v rámci EU mohou být uváděny, pokud jsou autorizovány a zahrnuty v seznamu Unie (Union list), kde jsou k nalezení také podmínky pro jejich uvádění na trh či pro jejich přidávání do jiných potravin (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283). Z kategorie jedlého hmyzu jsou aktuálně na seznamu uvedeny saranče stěhovavá, larva potměníka moučného a cvrček domácí. Jedním z mikrobiologických kritérií, která se na ně vztahují, je předpokládaný *B. cereus*, jehož maximální obsah v potravinech by neměl překročit  $10^2$  KTJ/g (Prováděcí nařízení Komise (EU) 2017/2470; Prováděcí nařízení Komise (EU) 2022/188). Jako předpokládaný je označován proto, že se stanovuje podle normy ISO 7932 na MYP agaru a toto stanovení neumožňuje rozlišit *B. cereus* od blízké příbuzných druhů, jako je například *B. anhracis*, *B. mycooides* či *B. thuringiensis* (EFSA 2016).

Výrobky z jedlého hmyzu rostou na oblibě, je však ještě potřeba lépe probádat jejich mikrobiologii (Grabowski a Klein 2017; Fasolato et al. 2018; Fernandez-Cassi et al. 2020). Mezi mikroorganismy, které se z nich podařilo izolovat, patří například *Aspergillus* spp., *Bacillus* spp. včetně *B. cereus sensu lato*, *Enterococcus faecium*, *Listeria ivanovii*, *Macrococcus* spp., *Mucor* spp., *Pediococcus acidilactici*, *Penicilium* spp., *Serratia liquefaciens*, či *Staphylococcus* spp. (Grabowski a Klein 2017; Fasolato et al. 2018). Bylo zjištěno, že mikrobiologické charakteristiky se mohou lišit mezi různými druhy hmyzu a rozdíly mohou být také mezi hmyzem chovaným v laboratoři a v komerčním chovu (Vandeweyer et al. 2020). Kromě toho zřejmě záleží i na způsobu zpracování.

Fasolato et al. (2018) detekovali *B. cereus sensu lato* ve všech testovaných vzorcích jedlého hmyzu, přičemž u čtvrtiny vzorků byly jejich počty v řádech  $10^4$ – $10^6$  KTJ/g a mezi izoláty byl významně zastoupen *B. cytotoxicus* (Fasolato et al. 2018). Vandeweyer et al. (2020) uvedli, že by ke kontaminaci *B. cereus s. l.* mohl být náchylný cvrček domácí, jelikož zhruba 86 % izolátů, které se z něj podařilo získat, patřilo k této skupině. Fernandez-Cassi et al. (2020) naproti tomu neodhalili kontaminaci *B. cereus s. l.* u žádného ze studovaných



cvrčků. Tito cvrčci však byli chováni v kontrolovaných podmínkách v univerzitním prostředí, zatímco Vandeweyer et al. (2020) studovali hmyz z komerčního chovu.

### 3.3.2.2 Prevence onemocnění z potravin

Vzhledem k tomu, že *B. cereus sensu lato* jsou prakticky všudypřítomné a potraviny jsou jimi běžně kontaminovány, je pro prevenci onemocnění či otravy z potravin kontaminovaných těmito bakteriemi potřeba především zabránit jejich pomnožení. Zatímco vegetativní buňky je možné zničit tepelnou úpravou, problémem jsou spory, které jsou velmi odolné (EFSA 2016). Působením tepla nedochází k jejich eliminaci, naopak jím mohou být aktivovány a následně vyklíčit. Z důvodu redukce počtu ostatních mikroorganismů během tepelné úpravy se *B. cereus sensu lato* dostávají do málo konkurenčního prostředí a snadno se pomnoží (Juneja et al. 2018). Důležité tedy je pokrmy neuchovávat v podmínkách, které bakteriím vyhovují a umožňují jim aktivně růst. Vhodné je skladování buď při teplotě nad 60 °C (Griffiths a Schraft 2017), nebo do 7 °C, ideálně však do 4 °C (EFSA 2016), vzhledem ke schopnosti některých zástupců růst i za nízkých teplot (Lechner et al. 1998). Saleh-Lakha et al. (2017) sledovali prevalenci a počty *B. cereus* v pasterizovaném mléce skladovaném při teplotě 4 °C, 7 °C a 10 °C a pozorovali, že s vyšší teplotou prevalence rostla. Zatímco při 4 °C se podařilo *B. cereus* stanovit pouze u 0,8 % vzorků, při 7 °C již u 13,4 % a při 10 °C u 40,9 % vzorků. Zároveň rostlo také procento vzorků, v nichž kontaminace *B. cereus* přesahovala 10<sup>5</sup> KTJ/g. Při 4 °C se jednalo o 0,4 %, při 7 °C o 5,5 % a při 10 °C o 31,1 %. Je tedy vidět, že i mírné zvýšení skladovací teploty může mít dopad na zdravotní nezávadnost potravin. Ošemetné také je, že potravina může být pro zdraví riziková, aniž by byly nutně zhoršeny její organoleptické vlastnosti. Dále je třeba vyzdvihnout důležitost neporušování teplotního řetězce u chlazených potravin (Saleh-Lakha et al. 2017) a pokud možno co nejrychlejší zchlazení. To se týká i doma připravených a následně skladovaných pokrmů (Juneja et al. 2018), které je navíc vhodné před podáváním znovu důkladně prohřát. Pozornost je také třeba věnovat potravinám v prášku, které se před konzumací připravují smícháním s tekutinou. Pokud je sušená potravina rehydratována a ponechána při pokojové teplotě, opět jsou tím připraveny příznivé podmínky pro vyklíčení spor a pomnožení vegetativních buněk, což může být navíc provázeno také produkcí toxinů (Griffiths a Schraft 2017).

### 3.3.3 Druhy

Jak již bylo zmíněno výše, skupina *B. cereus* zahrnuje vícero druhů, z nichž některé byly popsány již před lety, zatímco jiné teprve nedávno. Níže je představeno několik významných druhů, známých pro své patogenní působení nebo pro jiné, naopak pozitivní, vlastnosti.

#### 3.3.3.1 *Bacillus anthracis*

*B. anthracis* byl popsán jako první z druhů skupiny *B. cereus* (Carroll et al. 2021) a to už v 19. století. Nazván je podle onemocnění antrax, jehož je původcem (Sternbach 2003). Fenotypicky se podobá *B. cereus*, ale najdeme i několik odlišností. *B. anthracis* je

nepohyblivý, jeho kolonie bývají menší, nehemolytické a mívají tuhou konzistenci, zatímco kolonie *B. cereus* nebo také *B. thuringiensis* bývají spíše máslovité. Teploty, při kterých *B. anthracis* roste, se pohybují v rozmezí 20–40 °C (Logan a De Vos 2009).

Antrax postihuje především býložravce, ale může se rozvinout i u člověka, který je k němu však méně vnímavý. Infekční dávka u člověka bývá poměrně vysoká a střední smrtná dávka (LD<sub>50</sub>) se pohybuje v rozmezí 2500–55000 pozřených či vdechnutých spor (Logan a De Vos 2009). Za rozvoj onemocnění jsou zodpovědné antraxové toxiny a kapsula, která brání fagocytóze bakterie (Tessier 2017). Geny pro toxiny i komponenty pouzdra jsou kódovány na plazmidech, označovaných jako pXO1 a pXO2 (Griffiths a Schraft 2017).

K nákaze dochází prostřednictvím krve infikovaného jedince, dále také z mrtvých těl nakažených, ze živočišných produktů nebo z půdy kontaminované sporama, které v ní dokážou přežít řadu let (Logan a De Vos 2009). Do těla se patogen dostává vdechnutím, pozřením nebo přes oděrky na kůži (Murray et al. 1999) a v závislosti na cestě vstupu se rozvíjí jedna ze tří forem onemocnění – kožní, gastrointestinální či plicní (Brook 2002). V případě kožní formy, která se u lidí vyskytuje nejčastěji (FDA 2018), se po uplynutí inkubační doby trvající 1–12 dní začnou na kůži objevovat léze. Tyto léze jsou obvykle nebolestivé a jejich vzhled se vyvíjí až v černý příškvár, viz Obrázek č. 3 (Brook 2002), podle kterého dostalo onemocnění své označení antrax, tedy uhlí či vřed (Logan a De Vos 2009). Onemocnění je doprovázeno horečkami, bolestí hlavy a lokálním zduřením mizních uzlin. Bez léčby je kožní antrax smrtelný asi pro 20 % postižených. Při gastrointestinální formě se po inkubační době v délce 1–7 dní objevují těžké bolesti břicha, horečka a septikémie. Další příznaky se mohou lišit v závislosti na postižené části trávicího traktu (Brook 2002). Mortalita se zde pohybuje mezi 25–75 % (FDA 2018). Nejzávažnější je forma plicní, jejíž inkubační doba mívá také obvykle délku 1–7 dní, ale může být i delší, a to až 60 dní. Při této formě antraxu se ze začátku objevuje malátnost, horečka a bolesti svalů a později může onemocnění přecházet až v respirační selhání provázené meningitidou (Plotkin et al. 1960; Brook 2002). Mortalita je 80 % nebo i více (FDA 2018). V léčbě i profylaxi u exponovaných osob se využívají antibiotika, například ciprofloxacin či penicilin (Quintiliani a Quintiliani 2003). Pro úspěšnost léčby je zásadní její včasné zahájení (Brook 2002). Antibiotická terapie bývá poměrně účinná pro léčbu kožní formy (FDA 2018), u níž smrtnost snižuje pod 1 % (Savransky et al. 2020). U jiných forem však může být i navzdory antimikrobiálním lékům mortalita poměrně vysoká (Pillai et al. 2015). U plicní formy může být zredukována na 45 % při agresivní terapii pomocí kombinace antibiotik, imunoglobulinů a podpůrné léčby (Savransky et al. 2020). Pro prevenci onemocnění je k dispozici vakcína s oslabeným *B. anthracis* (Quintiliani a Quintiliani 2003), jejíž účinnost by měla být přes 90 % (FDA 2018).





**Obrázek č. 3:** Černý příškvár, projev kožní formy antraxu (Kelley et al. 2005; Tessier 2017)

Význam antraxu jakožto onemocnění člověka začal narůstat v souvislosti s bioteroristickými útoky v USA v roce 2001, kdy byly spory bakterií šířeny prostřednictvím pošty (Quintiliani a Quintiliani 2003). Již v roce 1979 však propukla epidemie plicního antraxu v dnešním Jekatěrinburgu v Rusku jako následek nechtěného úniku spor ze zařízení pro vývoj biologických zbraní. Došlo při ní nejméně k 68 úmrtím (Abramova et al. 1993; Quintiliani a Quintiliani 2003).

### 3.3.3.2 *Bacillus cereus sensu stricto*

*B. cereus sensu stricto* byl poprvé izolován v 19. století ze vzduchu v kravíně a růst jeho kolonií byl provázen zkapalněním želatiny v Petriho misce, na níž byl zachycen (Frankland a Frankland 1887), což prokazuje jeho schopnost želatinu hydrolyzovat (Logan a De Vos 2009). Na agaru pak byly jeho kolonie popsány jako hladké, vlhké, šedobílé útvary voskovitého vzhledu (Frankland a Frankland 1887), podle čehož dostal tento druh název „cereus“, tedy voskový. *B. cereus* je fakultativně anaerobní, obvykle pohyblivý a má tvar tyčinek o rozměru 1–1,2 na 3–5  $\mu\text{m}$ . Vytváří elipsoidní nebo cylindrické spory, které jsou umístěny subterminálně či paracentrálně. K růstu obvykle potřebuje teplotu alespoň 10–20 °C, ale podařilo se již izolovat i psychrotolerantní kmeny, které rostly při 6 °C. Teplotní maximum se pak pohybuje kolem 40–45 °C a optimum kolem 37 °C (Logan a De Vos 2009). Tento druh se běžně vyskytuje v životním prostředí, zejména v půdě. Bývá častým kontaminantem potravinářských provozů a lze ho izolovat z celé řady potravin. Rovněž může kontaminovat nemocniční prostředí (Parihar 2014).

*B. cereus sensu stricto* je často spojován s alimentárními onemocněními (Parihar 2014), která jsou blíže popsána v kapitole 3.4.1. Kromě toho je schopen způsobit i jiné lokální či systémové infekce. Postižen může být například dýchací trakt, oko či centrální nervový systém (Bottone 2010). Na *B. cereus* však nemusí být pohlíženo pouze negativně. Některé studie naznačují, že je schopen rozkládat ropu, a tudíž by mohl být společně s dalšími mikroorganismy užitečný v ropou kontaminovaných oblastech (Yengejeh et al. 2017). Může také žít v symbiotickém či komenzálním vztahu se zvířaty i rostlinami (Swiecicka 2008).

### 3.3.3.3 *Bacillus cytotoxicus*

Typový kmen *B. cytotoxicus* byl izolován ve Francii roku 1998 během epidemie alimentárního onemocnění (Guinebretière et al. 2013), která měla za následek tři úmrtí. Z něho byl poprvé izolován enterotoxin zvaný cytotoxin K-1 (Lund et al. 2000; Fagerlund et al. 2004), který dal tomuto druhu svůj název (Guinebretière et al. 2013).

*B. cytotoxicus* má podobu pohyblivých fakultativně anaerobních tyčinek, které však za aerobních podmínek rostou rychleji. Jeho endospory, obvykle elipsoidního tvaru, bývají umístěny centrálně až subterminálně. Bakterie dokážou růst při teplotě 20–50 °C s optimem v rozmezí 30–37 °C. Jejich dalším charakteristickým znakem je také to, že nehydrolyzují škrob a nerostou na syntetických médiích bez obsahu tryptofanu (Guinebretière et al. 2013). *B. cytotoxicus* byl izolován zejména z některých rostlinných potravin a jedlého hmyzu. Nebývá detekován často, což však může být způsobeno tím, že běžnými detekčními metodami jej obvykle nelze odlišit od *B. cereus sensu stricto*. Jeho přirozené prostředí zatím není zcela známo, nicméně se předpokládá, že bude v životním prostředí rozšířen podobně jako další druhy skupiny *B. cereus* (Cairo et al. 2022).

### 3.3.3.4 *Bacillus mycooides*

*B. mycooides* popsal Flüggé v roce 1886. Tyto tyčinkovité bakterie, o rozměrech 1–1,2 na 3–5 µm, jsou fakultativně anaerobní, nepohyblivé a vytváří elipsoidní spory umístěné paracentrálně až subterminálně. Rostou při teplotě 10–40 °C a jejich typickým znakem jsou rhizoidní kolonie bílé až krémové barvy, které mohou na pohled připomínat pěnu. Odtud plyne také jejich druhový název *mycooides*, který znamená slovo „houbovitý“. Některé bakterie však mohou schopnost vytvářet takovéto kolonie ztratit. *B. mycooides* se vyskytuje v různých prostředích včetně půdy (Logan a De Vos 2009). V rhizosféře se podílí na koloběhu dusíku a může podporovat růst některých rostlin (Ambrosini et al. 2015). Některé kmeny mohou být též endofytické (Yi et al. 2017). Obecně je tento druh považován spíše za nepatogenní (Heidt et al. 2019), ale byly izolovány i kmeny schopné produkce enterotoxinů (Průš et al. 1999; Fletcher a Logan 2002) nebo emetického toxinu, cereulidu (Carroll et al. 2020). S rozvojem onemocnění bývá spojován např. u ryb (Goodwin et al. 1994; Orozova et al. 2017), ale i u člověka byl již dán do souvislosti s alimentární nákazou (McIntyre et al. 2008).

V roce 1998 byl popsán psychrotolerantní druh *B. weihenstephanensis* (Lechner et al. 1998), který na rozdíl od *B. mycooides* nevytváří rhizoidní kolonie, neumí využívat D-sacharózu a naopak využívá arginin. Při porovnání jeho genomu s genomem *B. mycooides* se však ukázalo, že jsou si natolik podobné, že by měly být považovány za jeden druh, a to právě *B. mycooides* (Liu et al. 2018).

### 3.3.3.5 *Bacillus pseudomycooides*

*B. pseudomycooides* byl ustanoven v roce 1998 (Nakamura 1998) poté, co vyšlo najevo, že kmeny dříve řazené k druhu *B. mycooides* je možné rozdělit do dvou skupin, které se od sebe liší po genetické stránce (Nakamura a Jackson 1995) i profilem mastných kyselin. První ze skupin pak byla označena jako *B. mycooides sensu stricto*, zatímco druhá získala svůj vlastní druhový název. *B. pseudomycooides* je fakultativně anaerobní, má tyčinkovitý tvar a je nepohyblivý (Nakamura 1998). Jeho buňky bývají 1 µm široké a 3–5 µm dlouhé (Logan a De Vos 2009). Bývá izolován především z půdy, a podobně jako *B. mycooides*, obvykle vytváří rhizoidní kolonie (Nakamura 1998). Tvoří spory elipsoidního tvaru, které mohou být uloženy paracentrálně až subterminálně (Logan a De Vos 2009).

Zdá se, že by tento druh mohl najít uplatnění ve farmacii. Kmen MA02, izolovaný z půdy na drůbežích jatkách, je schopen produkce fibrinolytické proteázy, což je enzym využívaný v prevenci a léčbě kardiovaskulárních onemocnění (Chandramohan et al. 2019). Zajímavá je dále také jeho schopnost odstraňovat z vody ionty mědi a tím bránit jejich vstupu do rostlin a chránit tak nejen rostliny, ale i další organismy před jejich nadbytkem (Li et al. 2022). *B. pseudomycooides* je považován spíše za nepatogenní druh, nicméně bylo prokázáno, že i on může produkovat toxiny (Miller et al. 2018).

### 3.3.3.6 *Bacillus thuringiensis*

*B. thuringiensis* byl objeven začátkem 20. stol. (Beegle a Yamamoto 1992) v německé spolkové zemi Durynsku, německy Freistaat Thüringen (Logan a De Vos 2009). Izolován byl z nemocných hmyzích larev (Beegle a Yamamoto 1992). Je to fakultativně anaerobní, obvykle pohyblivý druh mající tvar tyčinek o rozměrech 1–1,2 na 3–5 µm. Roste při teplotách mezi 10–45 °C. Jeho endospory se hojně nacházejí v půdě i v jiných prostředích. Mívají elipsoidní ale někdy i cylindrický tvar a jsou umístěny subterminálně nebo paracentrálně. Ve sporangiu jsou umístěny našikmo a kromě spor zde mohou být uloženy také krystalické inkluze, známé jako δ-endotoxiny nebo insekticidní krystalické proteiny (Logan a De Vos 2009). Tyto krystalické proteiny (Cry proteiny) jsou kódovány tzv. cry geny a jsou exprimovány během sporulace (Deng et al. 2014). Existuje celá řada těchto proteinů, které působí odlišně na různé druhy hmyzu. Jejich zastoupení se u různých kmenů *B. thuringiensis* liší (Patel et al. 2013) a ne všechny kmeny vykazují toxické účinky proti hmyzu (Ohba a Aizawa 1986). Cry proteiny jsou zodpovědné nejen za onemocnění u některých zástupců z třídy hmyzu (Aoki a Chigasaki 1916 cit. dle Beegle a Yamamoto 1992), ale též u hlístic (Fernández-Chapa et al. 2019).

Vzhledem ke svým insekticidním vlastnostem je *B. thuringiensis* využíván jako biopesticid (Kumar et al. 2021) a jeho geny byly využity také v rámci genetického inženýrství pro přípravu některých transgenních plodin, například kukuřice (ISAAA 2016). Ukazuje se též, že *B. thuringiensis* je schopen potlačovat rozvoj některých chorob rostlin a podporovat jejich růst (Qi et al. 2016). Vytváří pro patogeny konkurenci a může produkovat látky potlačující jejich rozvoj, jako je například chitináza, bakteriociny či enzymy degradující buněčnou stěnu.

Mimoto je schopen produkce fytohormonů a dalších látek podporujících růst rostlin (Jouzani et al. 2017). Některé z jeho krystalických proteinů, tzv. parasporiny, dále mají potenciál pro uplatnění v onkologické léčbě, jelikož působí cytotoxicky na nádorové buňky (Ohba et al. 2009; Moazamian et al. 2018; Borin et al. 2021). Bakterie *B. thuringiensis* nesou také geny pro enterotoxiny, tudíž mají potenciál vyvolat alimentární onemocnění (Schwenk et al. 2020).

### 3.3.3.7 *Bacillus toyonensis*

Typový kmen BCT-7112 byl izolován v roce 1966 v Japonsku a původně byl přiřazen k druhu *B. cereus*, ale pro své odlišné vlastnosti dostal označení *B. cereus* var. *toyoi* (Kozasa et al. 1977 cit. dle Jiménez et al. 2013). Později byl reklasifikován a ustanoven jako samostatný druh – *B. toyonensis*. Pojmenován byl podle společnosti Toyo Jozo, jejíž výzkumný tým se zabýval izolací a vývojem probiotických mikroorganismů. *B. toyonensis* je fakultativně anaerobní pohyblivý druh tyčinkovitého tvaru o délce 3–4  $\mu\text{m}$ , který vytváří elipsoidní centrálně až subterminálně umístěné spory. Dokáže růst za anaerobních podmínek i při absenci tryptofanu. Roste v rozmezí 10–45 °C, optimálně při 35 °C (Jiménez et al. 2013). V nedávné době se však podařilo z hlubokomořského sedimentu izolovat kmen *B. toyonensis* P18, který je schopen růstu i při teplotě 4 °C a koncentraci chloridu sodného až 8 % (Luo et al. 2021).

*B. toyonensis* představuje pro některé živočišné druhy vhodné probiotikum (Jiménez et al. 2013). Byl pozorován například jeho příznivý vliv na nárůst tělesné hmotnosti u selat. Zároveň selata, kterým bylo toto probiotikum podáváno, méně trpěla na průjemová onemocnění a při užívání vyšších dávek docházelo ke snížení počtů patogenních mikroorganismů přítomných v jejich výkalech. Vzhledem k tomuto příznivému působení začaly být životaschopné spory *B. toyonensis* (Kantas et al. 2014) využívány jako součást komerčního přípravku TOYOCERIN®, který slouží jako doplněk stravy nejen pro prasata, ale také například pro drůbež či králíky (Jiménez et al. 2013). Později však bylo zjištěno, že kmeny *B. toyonensis* nesou geny *tetM* a *cat*, zodpovědné za rezistenci proti antibiotikům tetracyklinu a chloramfenikolu (Casanovas-Massana et al. 2014), což u Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) vzbudilo obavy z možného šíření antibiotické rezistence v intestinální mikrobiotě zvířat. Kromě toho byly v genomu *B. toyonensis* identifikovány také geny kódující enterotoxiny (EFSA FEEDAP Panel 2014). Tato zjištění vedla ke zrušení a zamítnutí povolení používat přípravky s obsahem *B. toyonensis* jako doplňky ve výživě zvířat v rámci Evropské Unie (Prováděcí nařízení Komise (EU) 2015/1399). Zdá se však, že i když *B. toyonensis* enterotoxinové geny nese, nedochází k jejich expresi (Cui et al. 2019).

## 3.4 Patogenita a faktory virulence

### 3.4.1 Alimentární onemocnění

Jak již bylo zmíněno, bakterie skupiny *B. cereus* mohou být příčinou některých onemocnění, zejména alimentárních otrav. Tyto otravy mají obvykle mírný průběh a brzy pomíjejí (Griffiths a Schraft 2017), nicméně již bylo hlášeno i několik případů úmrtí v souvislosti s nimi (Lund et al. 2000). Onemocnění je možné rozdělit do dvou různých syndromů – emetického a průjmového. Emetický syndrom se vyznačuje kratší inkubační dobou. Symptomy se objevují za 0,5–5 hodin po požití kontaminovaného pokrmu a odeznívají zhruba za 6–24 hodin. Typickým projevem je nevolnost a zvracení, ale může se objevit i průjem. Syndrom obvykle bývá spojen se škrobnatými potravinami, jako je rýže nebo těstoviny. Někdy je označován jako syndrom čínské restaurace, jelikož v těchto restauracích bývá dopředu uvařeno větší množství rýže, které je následně několik hodin ponecháno při pokojové teplotě, než se společně s dalšími ingrediencemi znovu tepelně upraví a servíruje. Během této doby snadno dochází k pomnožení bakterií a produkci emetického toxinu, který je zodpovědný za projevy syndromu. Tento toxin je termostabilní a odolává proteolytickým enzymům trávicího traktu. Dokáže tedy přežít tepelnou úpravu potravin i průchod zažívacím traktem. To znamená, že pokud je v pokrmu obsažen, může dojít k alimentární otravě bez ohledu na to, zda jsou v pokrmu stále přítomny živé bakterie. V případě průjmového syndromu činí inkubační doba 8–16 hodin a příznaky přetrvávají obvykle 12–24 hodin, ale i déle. Běžně se objevují bolesti břicha a průjem, občas se může vyskytnout i nevolnost. K vyvolání projevů dochází po pozření buněk či spor bakterií v počtu asi  $10^5$ – $10^7$  a mezi běžné potraviny a pokrmy, jejichž kontaminace k tomuto syndromu vede, patří masné výrobky, mléko a mléčné výrobky, polévky, omáčky či zelenina (Griffiths a Schraft 2017). S průjmovým syndromem jsou spojovány zejména následující enterotoxiny – hemolyzin BL (Hbl), nehemolytický enterotoxin (Nhe) a cytotoxin K (CytK) (Ceuppens et al. 2011; Griffiths a Schraft 2017). Mohou být produkovány při teplotách v rozmezí 10–43 °C, jsou termolabilní a nejsou odolné nízkému pH ani proteolytickým enzymům (Griffiths a Schraft 2017). Na rozdíl od emetického syndromu jsou za projevy průjmového syndromu zodpovědné bakteriální buňky, které toxiny produkují přímo ve střevě, a nikoli toxiny již obsažené ve zkonsumované potravíně či pokrmu (Ceuppens et al. 2012; Griffiths a Schraft 2017). Rizikové potraviny běžně obsahují spory bakterií, k jejichž vyklíčení může docházet během skladování nebo přípravy pokrmu (Ceuppens et al. 2011).

### 3.4.2 Další onemocnění

Kromě alimentárních onemocnění mohou bakterie skupiny *B. cereus* způsobovat také infekce systémového či lokálního charakteru. Častěji jsou jimi postiženi imunokompromitovaní pacienti, ale mohou se vyskytnout i u osob bez oslabené funkce imunitního systému. Mezi nejnáchylnější jedince patří novorozenci, pacienti s operačními ranami, zraněními či se zavedeným katétrem a uživatelé injekčních drog. Jedním

z onemocnění, která mohou být *B. cereus sensu lato* vyvolána, je endoftalmitida, tedy zrak ohrožující oční infekce. Dále se mohou rozvíjet infekce dýchacího traktu, centrální nervové soustavy, kůže, srdce, kostní dřeň či močového ústrojí (Bottone 2010). Jak bylo již zmíněno, významným patogenem je *B. anthracis* způsobující onemocnění zvané antrax, které postihuje kůži, trávicí trakt či plíce v závislosti na cestě vstupu do těla (Brook 2002). I když se jím může nakazit i člověk, primárně se jedná o patogen býložravců. Onemocnění u živočichů mohou způsobovat i další druhy skupiny. Konkrétně *B. thuringiensis* je známým hmyzím patogenem (Logan a De Vos 2009) a *B. mycoides* byl spojen s onemocněním ryb (Goodwin et al. 1994).

### 3.4.3 Faktory virulence

Na patogenezi se podílí celá řada faktorů, mezi něž patří například schopnost kolonizovat hostitele, pronikat do tkání (Ramarao a Lereclus 2006) či obcházet imunitní systém (Ramarao a Lereclus 2005). Důležitou roli hraje bičík, který zajišťuje pohyblivost bakterií a jejich adhezi k epiteliálním buňkám (Ramarao a Lereclus 2006), na níž se podílí též bakteriální S-vrstva, jež může být na jejich povrchu přítomna (Kotiranta et al. 2000). Jak již bylo zmíněno, snáze kolonizovat hostitelský organismus mohou buňky, které jsou schopné tzv. plazivého pohybu (Senesi et al. 2010). V porovnání s běžnými buňkami mají tyto bakterie více bičíků (Ghelardi et al. 2007). Bičík je dále také potřebný pro sekreci některých toxinů (Senesi a Ghelardi 2010). Další vlastností přispívající k patogenitě je schopnost tvořit biofilm (Tran et al. 2010), který činí bakterie odolnějšími a může tak být příčinou perzistujících infekcí (Costerton et al. 1999). Bylo také zjištěno, že bakterie mohou odolávat imunitnímu systému hostitele, i když mechanismy, které jim to umožňují, nejsou ještě zcela objasněny. Známa je však již role metaloproteáz InhA1 a NprA, které zprostředkovávají únik fagocytovaných spor z makrofágů a navozují smrt těchto buněk (Haydar et al. 2018). Za hlavní faktory virulence vyvolávající alimentární onemocnění jsou považovány bakteriální toxiny (Ceuppens et al. 2013), které jsou vylučovány z buňky do okolí (Senesi a Ghelardi 2010). Co se týče uložení toxinových genů, na plazmidech jsou kódovány geny pro insekticidní toxiny *B. thuringiensis*, geny pro hlavní faktory virulence *B. anthracis* a klastr genů pro emetický toxin. Enterotoxinové geny *B. cereus* pak najdeme na chromozomech (Ehling-Schulz et al. 2006).

#### 3.4.3.1 Cereulid

Emetický toxin, zvaný cereulid, je hydrofobní cyklický dodekadepsi-peptid o molekulové hmotnosti 1,2 kDa s následující skladbou aminokyselin/oxykyselin: [D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val]<sub>3</sub> (Agata et al. 1994; Griffiths a Schraft 2017). Je charakteristický svou značnou odolností vůči vysokým teplotám (90 min při 126 °C), nízkému i vysokému pH a proteolytickým enzymům trávicího traktu (Griffiths a Schraft 2017). Jeho tvorba probíhá neribozomálně pomocí enzymového komplexu, zvaného cereulid syntetáza. Tento komplex je kódován klastrem genů (*ces*) o délce 24 kb umístěném na megaplazmidu, který se podobá plazmidu

pXOI *B. anthracis*. Klastř *ces* se skládá ze sedmi kódujících sekvencí: *cesH*, *cesP*, *cesT*, *cesA*, *cesB*, *cesC* a *cesD*, přičemž strukturálními geny pro cereulid syntetázu jsou *cesA* (10 kb) a *cesB* (8 kb) (Ehling-Schulz et al. 2006). Kmeny schopné produkce cereulidu nebývají izolovány často a tato vlastnost je poměrně vzácná (Hoton et al. 2009). Na rozdíl od genů kódujících enterotoxiny nebývá *ces* nacházen napříč celou skupinou (EFSA 2016). Vyskytuje se u *B. cereus sensu stricto* (Hoton et al. 2009), ale také u některých kmenů *B. mycoides*, dříve *B. weihenstephanensis* (Carroll et al. 2020). Syntéza emetického toxinu probíhá ve stacionární fázi růstu při teplotě v rozmezí 12–37 °C s optimem mezi 12–15 °C a nemá souvislost se sporulací (Griffiths a Schraft 2017). Míra produkce cereulidu se liší mezi různými produkčními kmeny (Stark et al. 2013) a mají na ni vliv také různé faktory, jako je matrice, v níž se bakterie pomnoží. Neplatí přitom, že vyšší rychlost růstu automaticky znamená vyšší rychlost produkce toxinu. Ellouze et al. (2021) studovali tuto problematiku v několika matricích a vyzorovali, že i když produkční kmen nejpomaleji roste v matrici na bázi obilovin, produkce toxinu v ní měla nejvyšší rychlost. Nejrychlejší růst a střední rychlost tvorby pak byly zaznamenány v matrici na bázi mléka a v bujónu mozko-srdcové infúze. V masových a zeleninových médiích byl pozorován mírný růst s nejnižším tempem produkce toxinu.

Emetický toxin se strukturálně podobá antibiotiku valinomycinu (Agata et al. 1995a) a stejně jako on je draselným ionoforem, který působí toxicky na mitochondrie tím (Ehling-Schulz et al. 2006), že rozrušuje jejich membránový potenciál. Cereulid je také schopen inhibice lidských NK buněk, které jsou součástí imunitního systému (Griffiths a Schraft 2017). V těle se toxin váže na 5-HT<sub>3</sub> receptory a prostřednictvím aferentního bloudivého nervu stimuluje v mozku centrum zvracení (Agata et al. 1995a; Griffiths a Schraft 2017). Jääskeläinen et al. (2003) uvádějí, že toxická dávka, která způsobí zvracení u člověka, se pohybuje okolo 8 µg/kg tělesné hmotnosti nebo méně. Předpokládají také, že i nízká dávka, jež zvracení nevyvolá, může poškozovat mitochondrie v exponovaných buňkách. Studie provedené na myších prokázaly, že chronická expozice nízkým dávkám cereulidu, nevyvolávajícím zvracení, vede k zánětlivým změnám střevní sliznice a ovlivňuje složení střevní mikrobioty. Zaznamenán byl například úbytek laktobacilů. Dále bylo pozorováno zvýšené odbourávání L-tryptofanu a inhibice jeho biosyntézy vlivem změněné mikrobioty a v důsledku toho také snížená hladina serotoninu (5-hydroxytryptaminu) (Lin et al. 2021). V *in vitro* studiích bylo vyzorováno též toxické působení nízkých dávek cereulidu na beta buňky pankreatu, v jehož důsledku docházelo k narušení inzulinové sekrece i smrti postižených buněk (Vangoitsenhoven et al. 2015).

*B. cereus* může produkovat nejméně 18 strukturálních homologů cereulidu. U 7 z nich již byla určena chemická struktura a byly označeny jako isocereulidy A–G. Vykazují různou míru biologické aktivity a s tím také různou míru toxicity, přičemž jako vysoce toxický pro eukaryotické buňky se jeví isocereulid A. Dalo by se tedy uvažovat o tom, že různá závažnost vyvolaných zdravotních obtíží by mohla souviset i s různou koncentrací isocereulidů (Marxen et al. 2015).



### 3.4.3.2 Hemolyzin BL

Hemolyzin BL (Hbl) je termolabilní toxin skládající se ze tří proteinů označovaných jako B, L<sub>1</sub> a L<sub>2</sub>, jejichž molekulová hmotnost činí 41, 38,2 a 43,5 kDa (Beecher a MacMillan 1991). Tyto proteiny jsou kódovány geny *hblA* (B), *hblC* (L<sub>2</sub>) a *hblD* (L<sub>1</sub>) a v pořadí *hblC*, *hblD*, *hblA* (Ryan et al. 1997) jsou umístěny na chromozomu (Griffiths a Schraft 2017). Hbl je jedním z enterotoxinů zodpovědných za průjemové onemocnění u člověka (Griffiths a Schraft 2017). Je hemolytický, způsobuje hromadění tekutiny v králičím tenkém střevě, má vliv na cévní permeabilitu, působí cytotoxicky a dermonekroticky (Beecher et al. 1995). Po navázání na buňku v ní vytváří póry a následně dochází k jejímu rozkladu koloidně osmotickým mechanismem (Beecher a Wong 1997). Jednotlivé složky Hbl se navazují postupně a pro toxické působení je vyžadováno jejich určité pořadí, konkrétně B–L<sub>1</sub>–L<sub>2</sub> (Jessberger et al. 2019a). Některé kmeny *B. cereus* produkují pouze jeden nebo dva z komponentů (Schoeni et al. 1999), ale jak bylo prokázáno, pro tvorbu pórů i cytotoxickou aktivitu jsou nezbytné všechny tři. V obou případech hraje roli i poměrné zastoupení jednotlivých složek. V experimentálních podmínkách vedl poměr L<sub>2</sub> : L<sub>1</sub> : B = 1 : 1 : 10 k nejrychlejší tvorbě pórů a poměr 1 : 2 : 2 k největší cytotoxické aktivitě (Jessberger et al. 2019a). Kombinace všech tří komponentů je potřebná i pro dosažení plné hemolytické aktivity. Jednotlivé složky samostatně hemolyticky nepůsobí a u kombinace složek B a L<sub>2</sub> byla pozorována pouze mírnější hemolytická aktivita (Beecher a MacMillan 1991).

### 3.4.3.3 Nehemolytický enterotoxin

Nehemolytický enterotoxin (Nhe) je podobně jako hemolyzin BL tříložkový termolabilní toxin proteinové povahy (Lund a Granum 1996). Sekvence jeho proteinů se podobají sekvencím hemolyzinu BL (Granum et al. 1999) a zároveň lze pozorovat také podobnost s cytolysinem A, přítomným například u bakterií *Escherichia coli* (Fagerlund et al. 2008). Složky nehemolytického enterotoxinu jsou označovány jako NheA, NheB a NheC a jejich molekulová hmotnost činí 41, 39,8 a 36,5 kDa. Kódující geny jednotlivých složek, *nheA*, *nheB* a *nheC* (Granum et al. 1999), jsou umístěny na chromozomu (Griffiths a Schraft 2017). Toxin byl prvně izolován z kmene *B. cereus* spojeného s propuknutím průjemového onemocnění v Norsku v roce 1995 a při jeho zkoumání nebyla pozorována žádná hemolytická aktivita, proto se o něm hovoří jako o nehemolytickém (Lund a Granum 1996). Později se ukázalo, že hemolyticky působí, nicméně jeho název zůstal zachován. Nehemolytický enterotoxin je, podobně jako hemolyzin BL, schopen vytvářet póry v plazmatické membráně a způsobit koloidně osmotickou lýzu buňky (Fagerlund et al. 2008). K dosažení maximální cytotoxické aktivity jsou zapotřebí všechny tři komponenty v určitém poměru. V experimentálních podmínkách byl nejúčinnější poměr NheA : NheB : NheC = 10 : 10 : 1 a bylo vypořádáno, že NheC v koncentraci vyšší než 10 % z koncentrace NheA a NheB inhibuje toxické působení (Lindbäck 2004). Pro cytotoxicitu je vyžadováno též určité pořadí, v jakém se složky na buňku navážou. Jako první se navazují NheC a NheB. Tyto dva komponenty spolu mohou vytvářet komplex ještě před vazbou na buňku nebo se může



nejprve navázat NheC a až pak NheB. Při opačném pořadí složek však funkční komplex nevzniká (Heilkenbrinker et al. 2013). Zatímco úlohou těchto dvou proteinů je vazba na membránu a vytvoření komplexu, NheA slouží ke spuštění toxicity (Lindbäck et al. 2010).

#### 3.4.3.4 Cytotoxin K

Cytotoxin K (CytK) je jednosložkový termolabilní toxin proteinové povahy o molekulové hmotnosti 34 kDa. Strukturálně se podobá beta-toxinu *Clostridium perfringens*, vyvolávajícímu nekrotickou enteritidu (Lund et al. 2000). Vyskytuje se ve dvou variantách, CytK-1 a CytK2 a stejně tak existují i dvě varianty kódujícího genu (*cytK*), a to *cytK-1* a *cytK-2* (Fagerlund et al. 2004). Gen je umístěn na chromozomu (Griffiths a Schraft 2017).

Toxin byl poprvé izolován z typového kmene *B. cytotoxicus*, spojeného s alimentárním onemocněním, jež vedlo ke třem případům úmrtí (Lund et al. 2000; Guinebretière et al. 2013). Když později došlo k objevení jeho druhé, méně toxické, varianty, byl původní toxin označen jako CytK-1 a nový jako CytK-2. CytK-2 je mezi bakteriemi skupiny *B. cereus* rozšířenější (Guinebretière et al. 2006; Guinebretière et al. 2010) a vyskytuje se u kmenů s různou mírou toxické aktivity, tudíž se nehodí jej považovat za její marker (Jessberger et al. 2019b). Cytotoxin K je hemolytický, dokáže vytvářet póry v lipidové dvojvrstvě a působí toxicky na lidské střevní buňky. (Fagerlund et al. 2004).

Nezávisle na kolektivu Lund et al. (2000), byl tento toxin objeven také u kmene *B. cereus*, spojeného s endoftalmitidou, a označen jako hemolyzin IV (Beecher et al. 2000; Dietrich et al. 2021).

#### 3.4.3.5 Hemolyzin I (Cereolysin O)

Cereolysin O (Clo) je jednosložkový protein (Cowell a Bernheimer 1978) o molekulové hmotnosti kolem 50 kDa (Bernheimer a Grushoff 1967), který je kódován genem *clo*, umístěným na chromozomu (Brillard a Lereclus 2007). Je termolabilní, citlivý na působení trypsinu, vysokého i nízkého pH a k jeho inhibici dochází také v přítomnosti lidského séra (Coolbaugh a Williams 1978). Společně s dalšími toxiny, jako je například perfringolysin O, produkovaný bakteriemi *Clostridium perfringens*, nebo streptolysin O, tvořený některými druhy rodu *Streptococcus*, patří do rodiny cholesterol-vázajících cytolyzinů (Palmer 2001). Mezi ně je zahrnut také anthrolyzin O, což je produkt *B. anthracis*, který se Clo podobá z 98 % (Shannon et al. 2003). Cereolysin O je cytolytický, letální pro myši a má výraznou hemolytickou aktivitu (Bernheimer a Grushoff 1967). V buněčné membráně se váže na cholesterol, který je pro jeho cytolytickou aktivitu potřebný (Cowell a Bernheimer 1978). Na membráně s navázaným Clo je možné pozorovat kroužky a obloukovité útvary (Cowell et al. 1978). Dochází tam ke tvorbě oligomerů toxinu a vznikají velké oligomerní póry (Bhakdi et al. 1985; Palmer 2001). Volný cholesterol naopak inhibuje hemolytickou aktivitu toxinu, a to už v nízkých koncentracích. Podobně je tomu i u streptolysinu O (Bernheimer a Grushoff 1967).

Minnaard et al. (2001) testovali vliv exocelulárních faktorů vylučovaných *B. cereus* na epitelové buňky střeva za použití Caco-2 buněk a došli k závěru, že na pozorovaných změnách se cereolysin O zřejmě nepodílí.

#### 3.4.3.6 Hemolyzin II

Hemolyzin II (HlyII) je jednosložkový protein o molekulové hmotnosti přibližně 42,3 kDa, který vykazuje určitou podobnost s alfa-toxinem *Staphylococcus aureus* (Baida et al. 1999) a také s cytotoxinem K (Fagerlund et al. 2004). Hemolyzin II je kódován genem *hlyII* a jeho transkripce je regulována, ve smyslu potlačení, regulátorem HlyIIR, kódovaným genem *hlyIIR*. Tím se liší oproti většině ostatních toxinových genů, jejichž hlavním regulátorem exprese je PlcR (Budarina et al. 2004). HlyII je citlivý na působení trypsinu a působením nízkého i vysokého pH (2 a 12) dochází k jeho inaktivaci. Na rozdíl od cereolysinu O ale není inhibován cholesterolem. Pokud jde o vliv vysoké teploty, byl u něj pozorován tzv. Arrheniův efekt. To znamená, že za vyšší teploty je jeho aktivita alespoň do určité míry zachována, i když při nižší teplotě dochází k jeho inaktivaci (Coolbaugh a Williams 1978). Coolbaugh a Williams (1978) pozorovali, že neúčinněji na něj působila teplota 60 °C. Když jí byl vystaven po dobu 5 minut, jeho aktivita zcela vymizela. Při 70 °C byl však inaktivován pouze z 90 % a při 100 °C ze 75 %.

HlyII je hemolytický. Pevně se váže na buněčnou membránu a vytváří v ní heptamerní póry. Navazovat se zřejmě může jako monomer i jako menší oligomer a poté následuje další oligomerace a tvorba póru (Andreeva et al. 2007). Díky tvorbě pórů je HlyII schopen navodit apoptózu makrofágů či lidských monocytů (Tran et al. 2011). Červené krvinky jsou k jeho působení různě citlivé. Nejvyšší citlivost byla pozorována u králíčích a pak u lidských erytrocytů. V experimentu HlyII o koncentraci 2,5 ng/ml způsobil rozklad 50 % lidských erytrocytů během 30 minut (Andreeva et al. 2006). Jak však zjistili Andreeva et al. (2007), hemolýza nejrychleji probíhá při 25 °C, nikoli při teplotě lidského těla.

HlyII pravděpodobně nepatří k toxinům podílejícím se na gastrointestinálních onemocněních (Ramarao a Sanchis 2013), bývá však přítomen u patogenních kmenů, včetně těch vyvolávajících onemocnění z potravin (Cadot et al. 2010). Jedná se také o prokázaný faktor virulence pro savce i pro hmyz, konkrétně bource morušového (Tran et al. 2011).

#### 3.4.3.7 Hemolyzin III

Hemolyzin III (HlyIII) je termolabilní jednosložkový protein, který je z hemolytických toxinů skupiny *B. cereus* nejméně popsán a zatím nebyla ani prozkoumána jeho účast na virulenci v *in vivo* podmínkách (Ramarao a Sanchis 2013). Je kódován genem *hlyIII* (Baida a Kuzmin 1996) a primární produkt translace tohoto genu má molekulovou hmotnost 24,4 kDa (Baida a Kuzmin 1995). Jak již bylo naznačeno, hemolyzin III je hemolytický (Baida a Kuzmin 1995). Pravděpodobně v membránách erytrocytů vytváří oligomerní póry a hemolýza se skládá nejméně ze tří kroků. Nejprve dochází k navázání toxinu na buňku, což závisí na teplotě. Pokud je teplota optimální, vazba se vytváří během několika sekund. Při teplotě 4 °C

se toxin nenavazuje, zatímco 37 °C se zdá vyhovujících. Po vazbě následuje vytvoření léze a nakonec dochází k lýze buňky. Bylo pozorováno, že hemolýza je inhibována osmotickými protektanty. Účinné v zabránění rozkladu byly například nenabitě polysacharidy v extracelulární tekutině (Baida a Kuzmin 1996). Na rozdíl od hemolyzinu I není HlyIII inhibován nízkými koncentracemi cholesterolu (Baida a Kuzmin 1995).

#### 3.4.3.8 Fosfolipázy

Fosfolipázy jsou enzymy, které se nachází prakticky ve všech živých organismech a jsou součástí jejich signálních drah. Katalyzují hydrolýzu fosfolipidů biologických membrán a na základě toho, jakou esterovou nebo diesterovou vazbu štěpí, jsou rozděleny do různých tříd (Hergenrother a Martin 2000).

##### 3.4.3.8.1 Fosfatidylinositol-specifická fosfolipáza C (PI-PLC)

Fosfatidylinositol-specifická fosfolipáza C (PI-PLC), také známá jako lecitináza, je enzym o molekulové hmotnosti asi 34,5 kDa (Bhunias 2008), který je kódován genem *pipIc* (Hendriksen et al. 2006). Je rozpustný ve vodě (Griffith a Ryan 1999). Hydrolyzuje fosfatidylinositol (PI) a některé další důležité komponenty membrán. Produkuje jej nejen *B. cereus*, ale i některé další bakterie, a dokonce i eukaryotické organismy jako například krysy (Kuppe et al. 1989). Enzymy z různých organismů se od sebe však odlišují (Griffith a Ryan 1999). Je také rozdíl mezi bakteriálními a savčími isoenzymy a to konkrétně ten, že savčí PI-PLC potřebují ke své funkci vápenatý kation, zatímco bakteriální nikoliv (Heinz et al. 1995). Společně s fosfatidylcholin-specifickou fosfolipázou C může PI-PLC hrát roli u respiračních onemocnění, při nichž dochází až ke krvácení a odumírání tkání (Bhunias 2008).

##### 3.4.3.8.2 Fosfatidylcholin-specifická/preferující fosfolipáza C (PC-PLC)

Fosfatidylcholin-specifická/preferující fosfolipáza C (PC-PLC) je enzym o molekulové hmotnosti 29,9 kDa (Bhunias et al. 2008), který je kódován genem označovaným jako *pcpl* (Hendriksen et al. 2006) nebo *cerA*. Hydrolyzuje zejména fosfatidylcholin (Gilmore et al. 1989). Ve svém aktivním místě má tři atomy zinku, které jsou velmi důležité, jelikož bez nich dochází k narušení konformace a fosfolipáza se pak nemůže vázat na membránu (Beecher a Wong 2000). Jsou tedy zásadní nejen pro strukturu, ale i pro katalytickou funkci enzymu (Bhunias et al. 2008).

##### 3.4.3.8.3 Sfingomyelináza (SPH)

Sfingomyelináza je enzym o molekulové hmotnosti 34,2 kDa, který hydrolyzuje primárně sfingomyelin a jehož aktivní místo obsahuje dva atomy hořčíku (Bhunias 2008). Gen pro SPH (*cerB*) je uložen na chromozomu v tandemovém uspořádání s genem pro PC-PLC (*cerA*) a tyto dva enzymy společně vytváří biologicky aktivní jednotku, která se také někdy označuje jako cereolysin AB (Gilmore et al. 1989; Beecher a Wong 2000). Společně pak mohou působit rozklad některých erytrocytů. Kromě toho mají schopnost umocňovat hemolýzu navozenou hemolyzinem BL. Zejména u sfingomyelinázy s Hbl byla pozorována

výrazná synergie. PC-PLC zvýraznil hemolýzu jen u krvinek s obsahem značného množství fosfatidylcholinu v membráně, tedy prasečích a lidských, přičemž u lidských pouze velmi mírně (Beecher a Wong 2000).

#### 3.4.3.9 Enterotoxin T

Enterotoxin T (BcET) byl popsán jako protein o molekulové hmotnosti asi 41 kDa. Jeho kódující gen, *bceT*, byl objeven u kmene *B. cereus*, izolovaného z případu alimentárního onemocnění. Tento gen byl naklonován a exprimován v bakterii *Escherichia coli* a následně byly testovány jeho vlastnosti. Vykazoval cytotoxicitu a pozitivní reakci vaskulární permeability. Způsoboval také hromadění tekutiny v podvázané myši střevní kliče a při injekčním podáním byl pro myši smrtelný. Na základě těchto výsledků bylo usuzováno, že se jedná o průjmový toxin (Agata et al. 1995b). Později však u BcET žádná biologická aktivita prokázána nebyla (Choma a Granum 2002) a po důkladné analýze vyšlo najevo, že původní toxin vznikl uměle při procesu klonování, a nejedná se tedy o faktor virulence (Hansen et al. 2003).

#### 3.4.3.10 Enterotoxin FM

Enterotoxin FM (EntFM) byl popsán jako jednosložkový protein o molekulové hmotnosti 45 kDa, který je snadno inaktivován vyšší teplotou, trypsinem a nízkým i vysokým pH (3 a 11). Jeho kódující gen, *entFM*, leží na chromozomu (Shinagawa et al. 1991; Asano et al. 1997) a je mezi členy skupiny *B. cereus* značně rozšířen (Hsieh et al. 1999; Ngamwongsatit et al. 2008; Proroga et al. 2019). Když bylo zjištěno, že EntFM patří mezi peptidázy buněčných stěn (cell wall peptidases), byl přejmenován na CwpFM a jeho gen na *cwpFM* (Tran et al. 2010). CwpFM působí cytotoxicky, zvyšuje vaskulární permeabilitu, způsobuje hromadění tekutin v myši střevní kliče a je pro myši smrtelný. Nevykazuje však hemolytickou aktivitu (Shinagawa et al. 1991). Podílí se na motilitě a tvaru bakterie, na adhezi bakterie k epiteliálním buňkám a na tvorbě biofilmu (Tran et al. 2010), čímž přispívá k virulenci. Vzhledem ke značné rozšířenosti jeho kódujícího genu mezi patogenními i nepatogenními kmeny není však příliš vypovídajícím ukazatelem patogenity a jeho přesná role u patogenních × nepatogenních kmenů je předmětem budoucích studií (Tran et al. 2020).

#### 3.4.3.11 Immune inhibitor A

Immune inhibitor A (InhA1) je zinek-vázající metaloproteáza o molekulové hmotnosti asi 87 kDa. Vyskytuje se ve 3 variantách, InhA1, InhA2 a InhA3, které jsou kódovány geny *inhA1*, *inhA2* a *inhA3*. Tyto geny se vzájemně shodují z více než 66 %. InhA je typický pro *B. anthracis*, ale může se vyskytovat i u dalších druhů skupiny *B. cereus*. Při *in silico* analýze byla odhalena přítomnost alespoň jednoho z kódujících genů v genomu některých kmenů *B. cereus sensu stricto*, *B. mycoides* a *B. thuringiensis*, přičemž v referenčním kmeni *B. cereus*

ATCC 14579 a kmeni *B. thuringiensis* 407 byly nalezeny všechny tři geny. *InhA3* se vyskytoval nejméně často (Ramarao a Lereclus 2005; Guillemet et al. 2010).

*InhA1* je schopen chránit bakterie před imunitním systémem hostitele. Jak zjistili Ramarao a Lereclus (2005), jedná se o hlavní složku exosporia spor, která je syntetizována na začátku sporulace. Když dojde k fagocytóze spor makrofágy, *InhA1* sporám umožňuje odolávat jejich vnitřnímu prostředí, a dokonce z nich i uniknout. Bez této metaloproteázy spory zůstávají uvnitř makrofágu a mohou v něm vyklíčit. Schopnost úniku i navození smrti fagocytů je tedy způsob, kterým bakterie dokážou obejít imunitní systém. Snáze pak mohou kolonizovat tkáň a vyvolat onemocnění (Ramarao a Lereclus 2005). Kromě toho se *InhA* podílí také na destrukci tkání (Chung et al. 2006) či na rozrušení hemato-encefalické bariéry (Mukherjee et al. 2011). U *B. thuringiensis* pak byla též popsána schopnost *InhA1* interferovat s humorální ochranou kukel hmyzu *Hyalophora cecropia* tím, že degraduje jejich antibakteriální proteiny (Edlund et al. 1976; Dalhammar a Steiner 1984).

### 3.5 Quorum sensing, quorum quenching a AHL-laktonáza

Quorum sensing (QS) je pojem označující mezibuněčnou komunikaci bakterií, která se uskutečňuje pomocí extracelulárních signálních molekul. Výsledkem této komunikace pak mohou být změny genové exprese ve prospěch skupiny bakterií. Ovlivněna může být například produkce faktorů virulence, tvorba biofilmu, sporulace nebo produkce antibiotik. Quorum sensing gram pozitivních a gram negativních bakterií se mezi sebou liší. Jedním z typů molekul QS využívaných gram negativními bakteriemi jsou acyl-homoserinové laktony (AHL) (Rutheford a Bassler 2012).

Některé bakterie jsou schopny QS narušovat. Tento případ se označuje jako quorum quenching (QQ) (Rehman a Leiknes 2018). K narušení může docházet více způsoby, a to buď bráněním produkci signální molekuly, její degradací, anebo zablokováním jejího receptoru (Natrah et al. 2011).

U bakterií skupiny *B. cereus* se lze setkat s produkcí enzymu AHL-laktonázy (*AiiA*), která inaktivuje právě zmiňované acyl-homoserinové laktony tím (Dong et al. 2002), že hydrolyzuje jejich laktonový kruh. Je kódována genem *aiiA*, který mohou nést i další bakterie rodu *Bacillus* (Dong et al. 2001). Kromě toho se s produkcí různých AHL-laktonáz lze setkat i u zástupců z jiných rodů, například *Rhodococcus* (Ryu et al. 2020), *Enterobacter* (Rajesh a Rai 2015) či *Microbacterium* (Wang et al. 2012).

AHL-laktonáza by se potenciálně mohla uplatnit v prevenci či léčbě některých infekcí. V *in vitro* podmínkách byla schopna snížit cytotoxickou aktivitu a tvorbu biofilmu u patogenní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (Raafat et al. 2019). Stejného účinku bylo dosaženo i vlivem působení endofytického kmene *B. thuringiensis* produkujícího tento enzym (Anandan a Vittal 2019).

### 3.6 Regulátory a faktory ovlivňující expresi faktorů virulence

Transkripce genů pro faktory virulence je u *B. cereus sensu lato* řízena komplexními regulačními proteiny, označovanými jako CodY a AbrB, a dále proteiny NprR a PlcR, které spolu se svými signálními peptidy tvoří dva různé systémy quorum sensing (Ehling-Schulz et al. 2019). CodY ovlivňuje expresi některých faktorů virulence v závislosti na dostupnosti živin. Pokud se bakterie nachází v optimálních podmínkách, CodY nepřímo aktivuje expresi faktorů virulence podléhajících řízení PlcR (viz níže) tím, že aktivuje transkripci jeho kódujícího genu. Přímo naopak potlačuje expresi *ces* genu (Frenzel et al. 2012). Protein AbrB pak ovlivňuje expresi faktorů virulence ve vztahu k růstové fázi buňky. Kupříkladu potlačuje produkci cereulidu v rané exponenciální fázi (Lücking et al. 2009).

Dalším z regulátorů je NprR, jehož aktivita je závislá na signálním peptidu NprX, přičemž právě tento peptid slouží k mezibuněčné komunikaci. Bylo zjištěno, že tento systém je kmenově specifický (Perchat et al. 2011). NprR reguluje expresi 41 genů, mezi něž patří například geny kódující některé proteázy, lipázy, chitinázy nebo proteiny schopné vázat organické materiály (Dubois et al. 2016). NprR i NprX jsou bakteriemi produkovány v první fázi sporulace. Mezi geny aktivované pomocí NprR patří *nprA*, který kóduje proteázu NprA. K masivní produkci této proteázy dochází během sporulace za účelem zajištění dostatku živin na to, aby alespoň část bakteriální populace mohla ještě setrvat ve vegetativním stavu a oddálit tak nutnost tvorby spor (Perchat et al. 2011). Kromě toho se tato látka podílí na schopnosti spor obcházet imunitní systém (Haydar et al. 2018). Dalším regulátorem je PlcR, jehož aktivace závisí na peptidu označovaném jako PapR. I tento systém je kmenově specifický (Slamti a Lereclus 2002). PlcR aktivuje transkripci 45 genů, mezi něž patří řada genů pro faktory virulence. Konkrétně ovlivňuje produkci nehemolytického enterotoxinu, hemolyzinu BL, cereolyzinu O, cytotoxinu K, fosfolipáz C, sfingomyelinázy a dále také například některých proteáz, peptidů s antimikrobiální aktivitou nebo i složek buněčné stěny (Gohar et al. 2008). Gen pro PlcR se nachází i u *B. anthracis*, v důsledku mutace však není funkční (Agaisse et al. 1999; Mignot et al. 2001). Důležitým regulátorem genové exprese u *B. anthracis* je AtxA. Bylo vypořádáno, že pokud byl do bakterie vložen funkční gen pro PlcR, docházelo k interferenci tohoto proteinu s AtxA, což mělo za následek zabránění sporulaci. Tvorba spor je však u *B. anthracis* velmi zásadní pro jeho infekční cyklus, jelikož právě spora funguje jako infekční částice. Je tedy možné, že PlcR je u tohoto druhu neaktivní kvůli jeho zmíněnému nepříznivému působení (Mignot et al. 2001).

Na expresi toxinů *B. cereus* se podílejí i vnější faktory jako je teplota, složení atmosféry, pH či dostupnost živin. Například produkce emetického toxinu může být inhibována omezením koncentrace kyslíku v prostředí. Balení potravin v modifikované atmosféře s výrazně sníženým množstvím kyslíku tak může pomoci v prevenci rozvoje emetického syndromu. Tyto podmínky však naopak mohou být příznivé pro tvorbu enterotoxinů. K vyšší akumulaci cereulidu dochází v potravinách, které nejsou kyselé a mají vyšší obsah škrobu a vody. Jedním z preventivních kroků může tedy být okyselování potravin (Ceuppens et al. 2011). Kontaminovaná potravina i její množství ovlivňuje také průchod patogenů trávicím

traktem, a to zejména žaludkem, kde může chránit buňky či jejich spory před nízkým pH i trávicími enzymy. Rozvoj onemocnění závisí též na střevní mikrobiotě (Jessberger et al. 2020).

### 3.7 Detekce toxinů a toxinových genů

Tradiční metody detekce toxinů spočívaly ve využití pokusných zvířat. Příkladem je sledování akumulace tekutin v podvázané králičí střevní kličce pro důkaz enterotoxinů nebo krmení zvířat kontaminovaným krmivem. V současné době je však k dispozici celá řada metod, které umožňují toxiny detekovat bez nutnosti účasti živých zvířat (Griffiths a Schraft 2017). K detekci enterotoxinů lze využít komerční soupravy BCET-RPLA (Oxoid) či Duopath® Cereus Enterotoxins (Merck). K dispozici bývala také souprava BDE-VIA (Tecra), ale ta už na trhu zřejmě není (Dietrich et al. 2021). Souprava BCET-RPLA (*Bacillus cereus* enterotoxin – reverse passive latex agglutination) slouží k detekci L<sub>2</sub> složky hemolyzinu BL. Princip metody spočívá ve využití latexových částic, které byly senzibilizovány protilátkami proti této složce. Pokud je L<sub>2</sub> ve vzorku přítomna, dochází k aglutinaci, což je možné pozorovat na mikrotitrační destičce, kam se vzorky a reakční činidla nanáší (ThermoFisher Scientific b. r.). Souprava Duopath® Cereus Enterotoxins umožňuje detekovat hemolyzin BL a nehemolytický enterotoxin. Jedná se o imunochromatografický test, který využívá zlatem označené protilátky proti těmto toxinům. Vzorek je aplikován na chromatografický papír a postupně jím vzlíná. V papíru jsou obsaženy zmíněné protilátky, a jsou-li ve vzorku přítomny toxiny, dochází k vytvoření jejich komplexů s protilátkami. Tyto komplexy jsou následně zachyceny v detekční zóně pro daný toxin a vytváří se červená linie, která ukazuje na pozitivitu vzorku (Merck b. r.). Obdobné testy pro detekci cytotoxinu K na trhu v současné době nejsou (Dietrich et al. 2021).

Toxicitu lze prokázat také prostřednictvím testů cytotoxicity na různých buněčných liniích. Mimoto je možné využít i další metody, jako je například hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS) nebo polymerázová řetězová reakce, která slouží k detekci genů pro bakteriální toxiny. Obě zmíněné metody lze použít i pro detekci genů pro bakteriální toxiny (Dietrich et al. 2021).

#### 3.7.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda, která umožňuje zmnožení požadovaného úseku DNA v *in vitro* podmínkách (Staněk 2013). Vyvinuta byla v roce 1983 a jejím autorem je Kary Mullis, který pro své zásluhy obdržel Nobelovu cenu za chemii (Bartlett a Stirling 2003). Metoda spočívá v enzymatické syntéze, díky níž je možné amplifikovat různé oblasti DNA, včetně konkrétních genů, pokud jsou známy jejich okrajové sekvence. Počet vytvořených kopií se může pohybovat v řádech milionů, tudíž je možné pracovat i s malým vstupním množstvím genetického materiálu (Staněk 2013). Aby mohla reakce proběhnout, je potřeba připravit reakční směs, která bude obsahovat templátovou DNA, tedy molekulu DNA, jejíž část chceme amplifikovat. Dále je nutné přidat DNA polymerázu, což je enzym,

který katalyzuje syntézu nových vláken. K dispozici je vícero možností, pro rutinní diagnostiku se však obvykle využívá termostabilní Taq polymeráza (Green a Sambrook 2019), která byla původně izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Termostabilita polymerázy je důležitá vzhledem k vysokým teplotám v průběhu reakčních cyklů (Waters a Shapter 2014). Další nezbytnou složkou jsou tzv. primery. Jedná se o syntetické oligonukleotidové sekvence o délce asi 20–25 nukleotidů, které nasedají na templát (Green a Sambrook 2019) a ohraničují úsek DNA, který má být zmnožen (Staněk 2013). Primery jsou navrhovány na základě znalosti sekvence DNA templátu, k níž jsou komplementární, a jejich vhodný návrh je velmi důležitý pro dosažení požadovaných výsledků (Green a Sambrook 2019). K reakci jsou potřebné také nukleotidy, které slouží jako stavební kameny pro syntetizovanou molekulu DNA (Waters a Shapter 2014) a pro zajištění vyhovujících reakčních podmínek se přidává také pufr a kationty (Green a Sambrook 2019).

Celý proces se skládá ze 3 cyklicky se opakujících kroků, které probíhají v zařízení označovaném jako termocykler. Na termocykleru se před zahájením procesu nastaví požadované podmínky reakce a přístroj se poté podle zvoleného programu řídí (Staněk 2013). Kroky, z nichž reakce sestává, jsou následující:

- 1) Denaturace (denaturation): Dochází k zahřívání reakční směsi na teplotu asi 94–96 °C (Waters a Shapter 2014), což vede k rozvolňování dvoušroubovice DNA a vznikají jednovláknové úseky. To je velmi důležité pro správný průběh následujícího kroku (Staněk 2013).
- 2) Nasedání primerů (annealing): Teplota se oproti prvnímu kroku snižuje na zhruba 30–65 °C a díky tomu mohou primery nasedat na komplementární místa templátu. Tím se vytváří dvouvláknové úseky, na které se ve třetím kroku naváže DNA polymeráza (Staněk 2013; Green a Sambrook 2019).
- 3) Syntéza DNA (extension): Dochází k nasedání nukleotidů na primery a tvorbě vlákna komplementárního k templátu. Reakce je katalyzována DNA polymerázou (Staněk 2013; Waters a Shapter 2014) a teplota závisí na konkrétním použitém enzymu. Například běžně používaná Taq polymeráza je aktivní při 65–75 °C (Staněk 2013).

Tyto 3 kroky se cyklicky opakují a celkový počet cyklů bývá mezi 25–35 (Green a Sambrook 2019). Jako detekční metoda pro ověření, zda došlo k amplifikaci požadovaného fragmentu, se nejčastěji využívá gelová elektroforéza. Jedná se o separační metodu spočívající v odlišné pohyblivosti nabitých molekul ve stejnosměrném elektrickém poli v závislosti na jejich náboji a molekulové hmotnosti, na intenzitě elektrického proudu a na porositě gelu. Používá se gel agarózový či polyakrylamidový. Díky přidání vizualizačního činidla je následně možné produkt zobrazit v UV světle jako signál, též označovaný jako band (Staněk 2013).

Jedním z možných využití metody PCR je stanovení přítomnosti genů pro faktory virulence, například právě u bakterií skupiny *B. cereus*. Pouze tímto způsobem však není



možné zcela spolehlivě zhodnotit skutečný patogenní potenciál konkrétního kmene, jelikož přítomnost genu nemusí nutně znamenat, že dochází i k jeho expresi (Bhunia 2008).

## 4 Metodika

V praktické části této diplomové práce byl stanovován patogenní profil bakterií skupiny *Bacillus cereus* izolovaných z potravin, krmiv a životního prostředí. Detekovány byly geny pro cereulid, hemolyzin BL, nehemolytický enterotoxin, cytotoxin K, cereolyzin O, hemolyzin II, hemolyzin III, immune inhibitor A, fosfatidylinositol-specifickou fosfolipázu C, fosfatidylcholin-preferující fosfolipázu C a sfingomyelinázu. Dále byl detekován také gen pro enzym AHL-laktonázu, zodpovědnou za quorum quenching.

### 4.1 Testované kmeny

Celkem bylo testováno 105 kmenů bakterií skupiny *B. cereus*, které byly v rámci předchozích experimentů izolovány a identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS). Jejich podrobný seznam je uveden v Příloze č. 1. Jednalo se o izoláty z jedlého hmyzu odchovaného na Katedře zoologie a rybářství České zemědělské univerzity (KZR ČZU, 40 kmenů), z komerčních výrobků s obsahem jedlého hmyzu (11 kmenů) a z ostatních potravin (5 kmenů), dále pak z krmiva pro psy (19 kmenů), ze škeblí (20 kmenů) a z ostatních prostředí, která nespádala do žádné z výše uvedených kategorií (10 kmenů), viz Tabulka č. 1. Pro kontrolu byl analyzován také sbírkový kmen *B. cereus* CCM 2010 z České sbírky mikroorganismů, u něhož jsou dostupné sekvence celého genomu.

Testované kultury byly kultivovány v trypton-sójovém bujónu (TSB) za aerobních podmínek při 30 °C přes noc. Jejich čistota byla ověřena mikroskopicky (Nikon ECLIPSE E200).

**Tabulka č. 1:** Přehled původu testovaných izolátů.

Prostředí		Počet izolátů	Celkem izolátů
Jedlý hmyz	cvrčci z chovu KRZ ČZU	-	40
Krmivo pro psy	psí granule	12	19
	sušené kuřecí pařáty	3	
	sušený losos	4	
Ostatní	kontaminace jiných bakteriálních kultur	3	10
	řasy	1	
	senáž	1	
	trávicí trakt včely medonosné	3	
	voda z chovu škeblí	2	
Ostatní potraviny	kakaové boby	2	5
	pasterovaný med	1	
	ricotta	2	
Škeble asijská	-	-	20

**Tabulka č. 1 (pokračování)**

	Prostředí	Počet izolátů	Celkem izolátů
Výrobky z jedlého hmyzu	proteinová cvrččí mouka	1	11
	tyčinky s cvrččím proteinem (příchuť hořká čokoláda s pomerančem)	3	
	tyčinky s cvrččím proteinem (příchuť ananas s kokosem)	7	
CELKEM		-	105

## 4.2 Příprava buněčného lyzátu

Do sterilní mikrozkuřavky o objemu 1,5 ml (Eppendorf) byl odebrán 1 ml čerstvě narostlé axenické kultury. Odebraná kultura byla následně odstředěna při 14 500 ot/min po dobu 2 minut a supernatant slit. K buněčnému peletu bylo přidáno 100  $\mu$ l PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems). Směs byla promíchána na vortexu, následně zahřívána na termobloku při 100 °C po dobu 10 minut a ponechána 2 minuty při pokojové teplotě zchladnout. Poté byla opět odstředěna při 14 500 ot/min po 2 minuty. Do nové sterilní mikrozkuřavky o objemu 1,5 ml (Eppendorf) bylo přeneseno 60  $\mu$ l supernatantu. Takto vzniklý buněčný lyzát byl uchováván v mrazničce a použit pro PCR analýzu.

## 4.3 Amplifikace genů pro faktory virulence a AHL-laktonázu

Amplifikace byla provedena metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Pro každou reakci byla připravena směs o celkovém objemu 25  $\mu$ l, která obsahovala 12,5  $\mu$ l DreamTaq Green PCR Master Mixu (Thermo Scientific), 8,5  $\mu$ l PCR vody (nuclease-free, Thermo Scientific), 1  $\mu$ l forward (10  $\mu$ M) a 1  $\mu$ l reverse (10  $\mu$ M) primeru pro konkrétní gen a 2  $\mu$ l DNA. Amplifikace pak probíhala v termocyklerech C1000 Touch (Bio Rad) a T1000 (Bio Rad). Seznam testovaných genů a použitých PCR programů je uveden v Tabulce č. 2. Tabulka č. 3 pak obsahuje teplotní podmínky daných programů.

**Tabulka č. 2:** Přehled testovaných genů, použitých primerů a jejich sekvencí, velikostí PCR produktů a použitých PCR programů.

Toxin/produkt	Gen	Primery	Sekvence 5' – 3'	Velikost produktu (bp)	PCR program
Cereulid	<i>ces</i>	CesF1	GGTGACACATTATCATATAAGGTG	1271	PCR 1a
		CesR2	GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA		
Hemolyzin BL	<i>hbl</i>	HD2F	GTA AAT TAI GAT GAI CAA TTTC	1091	PCR 1
		HA4R	AGA ATA GGC ATT CAT AGA TT		
Nehemolytický enterotoxin	<i>nhe</i>	NA2F	AAG CIG CTC TTC GIA TTC	766	PCR 1
		NB1R	ITI GTT GAA ATA AGC TGT GG		
Cytotoxin K	<i>cytK</i>	CKF2	ACAGATATCGGICAAAATGC	421	PCR 1
		CKR5	CAAGTIACTTGACCIGTTGC		
Cereolyzin O	<i>clo</i>	CerOf	GTATCTACTTGGAAATSAAAAG	659	PCR 6a
		CerOr	TAATCTGTATTGTTATGAAC		
Hemolyzin II	<i>hly II</i>	BcHlyII-S	AGAAGGAGTGGCTGTCTGTA	535	PCR 3
		BcHlyII-A	TTCTTTCCAAGCAAAGCTAC		
Hemolyzin III	<i>hly III</i>	BCHEM1	AATGACACGAATGACACAAT	444	PCR 3
		BCHEM3	ACGATTATGAGCCATCCCAT		
Immune inhibitor A	<i>inhA2</i>	InhA2.1	CGCGGATCCCACCGATTTATCTG	3087	PCR 6b
		InhA2.2	CCGGAATTCCTTTCCCCACATAATTTG		
Fosfatidylinositol-specifická fosfolipáza C (Lecitináza C, piplc)	<i>piplc</i>	phosC1	CGCTATCAAATGGACCATGG	569	PCR 3a
		phosC2	GGACTATCCATGCTGTACC		
Fosfatidylcholin-preferující fosfolipáza C (Cereolysin A, pcpl)	<i>cerA</i>	CERA 1	ACTGAGTTAGAGAACGGTAT	536	PCR 3a
		CERA 2	CGCTTACCTGTCATTGGTGT		
Sfingomyelináza (Cereolysin B, Sph)	<i>cerB</i>	CERB 1	TCGTAGTAGTGAAGCGAAT	457	PCR 3a
		CERB 2	AGTCGCTGTATGTCCAGTAT		
AHL laktonáza	<i>iiA</i>	AIF	TAAATGTAAAGGTGGATACATAATGACAGT	750	PCR 6c
		AIR	AGCTCATGACTTTTTGCACTATATATA		
Hemolyzin BL – složka B	<i>hblA</i>	FHblA	GCAAAATCTATGAATGCCTA	884	PCR 5
		RHblA	GCATCTGTTCGTAATGTTTT		

**Tabulka č. 2 (pokračování)**

Toxin/produkt	Gen	Primery	Sekvence 5' – 3'	Velikost produktu (bp)	PCR program
Hemolysin BL – složka L <sub>2</sub>	<i>hblC</i>	FHbIC	CCTATCAATACTCTCGCAA	695	PCR 5
		RHbIC	TTTCCTTTGTTATACGCTGC		
Hemolysin BL – složka L <sub>1</sub>	<i>hblD</i>	FHD	GAAACAGGGTCTCATATTCT	1018	PCR 5
		RHD2	CTGCATCTTTATGAATATCA		

**Tabulka č. 3: Přehled programů použitých pro PCR.**

Program	Fáze	Teplota (°C)	Čas trvání	Počet opakování	Reference
PCR 1	Počáteční denaturace	95	3 min	1	Upraveno podle Ehling-Schulz et al. (2006)
	Denaturace	95	30 s	30	
	Hybridizace	49	30 s		
	Elongace	72	90 s		
	Konečná elongace	72	5 min	1	
PCR 1a	Počáteční denaturace	95	3 min	1	Ehling-Schulz et al. (2006)
	Denaturace	95	30 s	30	
	Hybridizace	49	30 s		
	Elongace	72	90 s		
	Konečná elongace	72	7 min	1	
PCR 3	Počáteční denaturace	95	3 min	1	Hendriksen et al. (2006)
	Denaturace	94	15 s	30	
	Hybridizace	55	45 s		
	Elongace	72	2 min		
	Konečná elongace	72	2 min	1	
PCR 3a	Počáteční denaturace	95	3 min	1	Hendriksen et al. (2006)
	Denaturace	94	30 s	30	
	Hybridizace	55	30 s		
	Elongace	72	45 s		
	Konečná elongace	72	2 min	1	
PCR 6a	Počáteční denaturace	95	3 min	1	Raddadi et al. (2009)
	Denaturace	94	30 s	30	
	Hybridizace	52	30 s		
	Elongace	72	45 s		
	Konečná elongace	72	5 min	1	
PCR 6b	Počáteční denaturace	95	3 min	1	Raddadi et al. (2009)
	Denaturace	94	30 s	30	
	Hybridizace	55	45 s		
	Elongace	72	1 min		
	Konečná elongace	72	5 min	1	
PCR 6c	Počáteční denaturace	95	3 min	1	Raddadi et al. (2009)
	Denaturace	94	30 s	30	
	Hybridizace	50	30 s		
	Elongace	72	2 min		
	Konečná elongace	72	7 min	1	

**Tabulka č. 3 (pokračování)**

Program	Fáze	Teplota (°C)	Čas trvání	Počet opakování	Reference
PCR 5	Počáteční denaturace	95	5 min	1	Ngamwongsatit et al. (2008)
	Denaturace	94	45 s	30	
	Hybridizace	54	1 min		
	Elongace	72	2 min		
	Konečná elongace	72	5 min	1	

#### 4.4 Separace a vizualizace PCR produktů

PCR produkty byly separovány pomocí gelové elektroforézy. Pro přípravu gelu bylo smícháno 100 ml 0,75x TAE puftru (Tris-acetát-EDTA, Serva) a 1 g agarózy (Serva). Tato směs byla promíchána a zahřívána v mikrovlnné troubě po dobu cca 2,5–3 minut do úplného rozpuštění. Poté byl gel chvíli ponechán při pokojové teplotě několik minut zchladnout a následně bylo přidáno 5 µl barviva GelRed (Biotinum). Promíchaná směs byla poté nalita do formy s předem vloženými hřebeny pro vytvoření jamek a gel byl ponechán 20–30 minut zatuhnout. Následně byla forma přenesena do elektroforetické vany s 0,75x koncentrovaných TAE pufrem (Serva) a hřebeny byly vyjmuty. Do jamek bylo napipetováno 5 µl PCR produktu. Pro stanovení velikosti PCR produktů bylo do první jamky v řadě pipetováno 5 µl velikostního standardu. Podle předpokládané délky amplikonu byl využit buď 50bp DNA Ladder (Invitrogen by ThermoFisher Scientific) pro kratší produkty (pod 1000 bp), nebo GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) pro produkty nad 1000 bp. Separace probíhala při konstantním napětí 100 V po dobu 50–60 minut (elektroforéza BioRad a VWR).

Po skončení separace byl gel vyjmut a přenesen do UV transiluminátoru (BioRad), kde byly pomocí programu Quantity One fragmenty DNA vizualizovány a pořízeny digitální snímky. Velikost PCR produktů byla posuzována na základě porovnání bandů se standardem.

#### 4.5 Sekvenování

##### 4.5.1 Purifikace

Pro ověření, zda se skutečně podařilo amplifikovat cílové geny, byly od každého z pozitivně testovaných genů vybrány a osekvenovány 2 pozitivní PCR produkty. Sekvenovány byly také 2 z nespecifických produktů vzniklých při amplifikaci genu pro hemolysin BL. PCR produkty byly purifikovány pomocí E.Z.N.A. Cycle Pure Kit (Omega Bio Tek). Dvacet µl produktu bylo smícháno se 100 µl CP puftru a přeneseno do kolonky vložené ve sběrné 2ml mikrozkuhavce. Směs byla následně odstředěna při 14 500 ot/min po dobu 60 sekund a filtrát byl odstraněn. Poté bylo přidáno 700 µl promývacího puftru zředěného 100% etanolem. Následovalo odstředění při 14 500 ot/min po 60 sekund a slití filtrátu. Tento krok byl proveden dvakrát po sobě. Následně byla kolonka bez přídavku puftru odstředěna při

14 500 ot/min, tentokrát po dobu 2 minut, aby došlo k proschnutí kolonky. Ta byla poté přenesena do nové mikrokumavky (objem 1,5 ml) a bylo do ní napipetováno 30  $\mu$ l elučního pufru. Po odstátí při pokojové teplotě po dobu 2 minut byly vzorky opět odstředěny při 14 500 ot/min po dobu 60 sekund. Přečištěný produkt v mikrokumavce byl skladován při teplotě -20 °C až do další analýzy.

#### 4.5.2 Příprava k sekvenování a zpracování sekvencí

Z přečištěného PCR produktu bylo odebráno 5  $\mu$ l a smícháno s 5  $\mu$ l forward primeru o koncentraci 5  $\mu$ M. Sekvenování bylo provedeno společností Eurofins Genomics a jednalo se o Sangerovu metodu. Sekvence byly následně zpracovány v programech Chromas Lite a BioEdit, a porovnány se sekvencemi dostupnými v databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information) pomocí programu BLAST.

### 4.6 Statistické vyhodnocení

Závěrem bylo posuzováno, zda existují statisticky významné rozdíly ve výskytu sledovaných genů mezi různými prostředími a mezi různými druhy. Pro posouzení rozdílů mezi prostředími byly izoláty rozděleny do 6 skupin dle původu (viz Tabulka č. 1 v kapitole 4.1). Pro hodnocení rozdílů mezi druhy byly kmeny rozřazeny do 2 skupin. První z nich byla tvořena izoláty identifikovanými jako *B. cereus sensu stricto* a druhá všemi ostatními kmeny, včetně těch, které se nepodařilo identifikovat jednoznačně a byly jim přiřazeny 2 možné druhové názvy (viz Tabulka č. 4 v kapitole 5). Souhrnná skupina ostatních druhů byla vytvořena proto, že druhy, které nebyly identifikovány jako *B. cereus sensu stricto*, se vyskytovaly pouze ve velmi malých počtech, což by mohlo negativně ovlivnit statistické vyhodnocení.

Pro statistickou analýzu byl použit program Statistica 12 (TIBCO Software Inc.). Nejprve byla otestována normalita dat pomocí Shapiro-Wilkova a Kolmogorov-Smirnovova testu, a jelikož data nepocházela z normálního rozložení, byly k analýze využity neparametrické metody, konkrétně Kruskal-Wallisův test pro hodnocení rozdílů mezi více než dvěma skupinami a Mann-Whitneyův U test pro testování rozdílů mezi dvěma skupinami. Testování probíhalo na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 5 Výsledky

V diplomové práci byla stanovována přítomnost genů pro faktory virulence a AHL-laktonázu u 105 kmenů izolovaných z různých prostředí, viz Tabulka č. 1 v kapitole 4.1. Všechny izoláty byly identifikovány pomocí MALDI-TOF MS. Převážnou většinu vzorků tvořil druh *B. cereus sensu stricto* a dále se vyskytl také *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. thuringiensis* a *B. weihenstephanensis*. Přehled identifikovaných druhů je uveden v Tabulce č. 4. Některé izoláty nebylo možné jednoznačně přiřadit pouze k jednomu druhu, proto jsou pro ně v tabulce uvedeny 2 možné druhové názvy.

**Tabulka č. 4:** Druhovú příslušnost testovaných izolátů na základě MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

Identifikované druhy	Počet izolátů	*Ostatní druhy skupiny <i>B. cereus</i>	Počet izolátů
<i>B. cereus sensu stricto</i> <sup>1</sup>	86	<i>B. cereus/mycooides</i>	7
Ostatní druhy skupiny <i>B. cereus</i> *	19	<i>B. mycooides</i>	4
		<i>B. mycooides/thuringiensis</i>	2
		<i>B. pseudomycooides</i>	1
		<i>B. thuringiensis</i>	3
		<i>B. weihenstephanensis</i> <sup>2</sup>	2

<sup>1</sup> Včetně druhů, které pomocí MALDI-TOF MS nelze od *B. cereus sensu stricto* odlišit.

<sup>2</sup> Psychrofilní kmen *B. mycooides*.

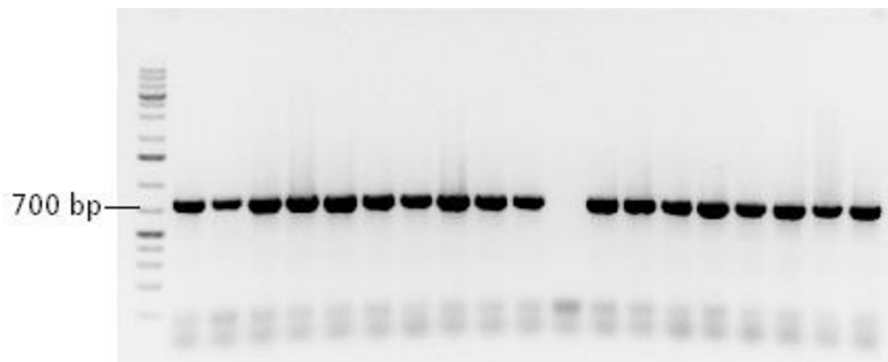
### 5.1 Přítomnost stanovovaných genů

V Tabulce č. 5a a 5b jsou uvedeny počty izolátů z jednotlivých prostředí, které byly pozitivní na testované geny. U žádného z testovaných kmenů nebyly detekovány geny pro cereulid a hemolyzin BL. Z detekovaných genů měl nejnižší prevalenci *inhA2*, kódující immune inhibitor A (3 %). Nejčastěji se naopak vyskytoval gen pro hemolyzin III (99 %). Obrázek č. 4 zobrazuje výsledky detekce genu pro AHL-laktonázu (*aiiA*), jejíž celková prevalence činila 68 %.

Pro ověření, zda skutečně došlo k amplifikaci požadovaných genů, byly pro každý z nich osekvenovány 2 vybrané pozitivní PCR produkty. U všech testovaných sekvencí bylo potvrzeno, že se jedná o námi požadované geny. Výjimkou byl gen pro immune inhibitor A, jehož sekvence nebyly čitelné. Specifita primerů byla vysoká u všech testovaných genů s výjimkou genu pro hemolyzin BL (*hbl*), u něhož často vznikaly nespecifické produkty. Osekvenováním 2 vybraných vzorků bylo zjištěno, že došlo k amplifikaci genu pro kolagen adhezivní protein. Výsledky PCR analýzy u sbírkového kmene *B. cereus* CCM 2010 byly v souladu s výsledky celogenomového sekvenování.



**Obrázek č. 4:** Výsledky detekce genu pro AHL-laktonázu (*aihA*) o velikosti fragmentů 750 bp.



**Tabulka č. 5a:** Prevalence genů pro faktory virulence a AHL-laktonázu u vzorků izolovaných z různého prostředí. Vyjádřeno jako počet pozitivních vzorků (procentuální zastoupení pozitivních vzorků v dané kategorii).

Prostředí	Počet	<i>ces</i>	<i>hbl</i>	<i>nhe</i>	<i>cytK</i>	<i>clo</i>	<i>hlyII</i>
Jedlý hmyz	40	0 (0 %)	0 (0 %)	37 (93 %)	40 (100 %)	38 (95 %)	5 (13 %)
Krmivo pro psy	19	0 (0 %)	0 (0 %)	19 (100 %)	0 (0 %)	19 (100 %)	0 (0 %)
Ostatní	10	0 (0 %)	0 (0 %)	10 (100 %)	5 (50 %)	8 (80 %)	4 (40 %)
Ostatní potraviny	5	0 (0 %)	0 (0 %)	5 (100 %)	1 (20 %)	5 (100 %)	2 (40 %)
Škeble asijská	20	0 (0 %)	0 (0 %)	14 (70 %)	1 (5 %)	20 (100 %)	1 (5 %)
Výrobky z jedlého hmyzu	11	0 (0 %)	0 (0 %)	11 (100 %)	9 (82 %)	11 (100 %)	5 (45 %)
CELKEM	105	0 (0 %)	0 (0 %)	96 (91 %)	56 (53 %)	101 (96 %)	17 (16 %)

**Tabulka č. 5b** (pokračování)

Prostředí	Počet	<i>hlyIII</i>	<i>inhA2</i>	<i>piplc</i>	<i>cerA</i>	<i>cerB</i>	<i>aiiA</i>
Jedlý hmyz	40	40 (100 %)	0 (0 %)	39 (98 %)	40 (100 %)	39 (98 %)	39 (98 %)
Krmivo pro psy	19	19 (100 %)	0 (0 %)	19 (100 %)	19 (100 %)	19 (100 %)	0 (0 %)
Ostatní	10	9 (90 %)	1 (10 %)	9 (90 %)	10 (100 %)	10 (100 %)	7 (70 %)
Ostatní potraviny	5	5 (100 %)	0 (0 %)	5 (100 %)	5 (100 %)	4 (80 %)	3 (60 %)
Škeble	20	20 (100 %)	1 (5 %)	12 (60 %)	14 (70 %)	14 (70 %)	12 (60 %)
Výrobky z jedlého hmyzu	11	11 (100 %)	1 (9 %)	11 (100 %)	11 (100 %)	8 (73 %)	10 (91 %)
CELKEM	105	104 (99 %)	3 (3 %)	95 (90 %)	99 (94 %)	94 (90 %)	71 (68 %)

Pro ověření funkčnosti primerů pro hemolyzin BL, na který nebyl žádný ze vzorků pozitivní, byly u 19 kmenů testovány také primery specifické pro jednotlivé složky toxinu. Žádný z testovaných kmenů nenesl gen pro složku B (*hblA*). Geny pro složku L<sub>1</sub> (*hblD*) a L<sub>2</sub> (*hblC*) pak byly zjištěny u 14 kmenů (74 %). Výsledky testování jsou podrobněji rozepsány v Tabulce č. 6.

**Tabulka č. 6:** Přítomnost genů pro složky hemolyzinu BL v genomu vybraných vzorků.

Číslo vzorku	Označení izolátu	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>
1	11a	-	+	+
2	11KRYSTAL	-	+	+
3	13b O2	-	+	+
4	14a	-	+	+
5	1CP	-	-	-
6	1vzM1	-	-	-
7	2/1 bac	-	+	+
8	2/2D	-	-	-
9	6/1 bac	-	+	+
10	6/2 bc	-	+	+
11	6CP	-	-	-
12	8a	-	+	+
13	A72b HEM	-	-	-
14	BC1/3 B1	-	+	+
15	BMS 4/3	-	+	+
16	CS17	-	+	+
17	CS3	-	+	+
18	S2	-	+	+

**Tabulka č. 6** (pokračování)

Číslo vzorku	Označení izolátu	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>
19	S6	-	+	+

- Gen nepřítomen. + Gen přítomen.

Dále bylo posuzováno, zda existuje statisticky významný rozdíl v prevalenci jednotlivých genů u kmenů pocházejících z různého prostředí. Rozdíly v četnosti výskytu *clo*, *hlyIII* a *inhA2* prokázány nebyly. Statisticky významně se ovšem lišila četnost pro *cytK* a *aiiA*. V obou případech byly nalezeny celkem 4 rozdíly mezi dvojicemi prostředí, viz Tabulka č. 7. Oba geny se vyskytovaly zejména u jedlého hmyzu a výrobků z hmyzu. Kruskal-Wallisův test prokázal statisticky významné rozdíly také v četnosti výskytu *pipIc*, *cerA*, *cerB*, *nhe* a *hlyII*, nicméně podrobnější vyhodnocení nebylo dostatečně citlivé, aby ukázalo, která konkrétní prostředí se mezi sebou liší. Proto byly pomocí Mann-Whitneyova U testu dále porovnány jednotlivé dvojice pro každý z těchto genů. Prevalence *pipIc* se mezi prostředími statisticky významně lišila ve dvou případech a *hlyII* v jednom případě, jak je opět znázorněno v Tabulce č. 7. *PipIc* se vyskytoval nejvíce u izolátů z krmiva pro psy, výrobků z jedlého hmyzu a ostatních potravin. Prevalence *hlyII* byla nejvyšší u výrobků z jedlého hmyzu. U zbylých genů pak žádné rozdíly již nalezeny nebyly. Izoláty z jedlého hmyzu chovaného na ČZU a z komerčních hmyzích produktů se mezi sebou statisticky významně nelišily v žádném z případů.

**Tabulka č. 7:** Statisticky významné rozdíly v zastoupení genu pro cytotoxin K (*cytK*), AHL-laktonázu (*aiiA*), fosfolipázu C (*pipIc*) a hemolyzin II (*hlyII*) u izolátů z různého prostředí (n = 105). Vyjádřeno jako procentuální zastoupení pozitivních vzorků z daného prostředí (počet pozitivních izolátů).

Původ	<i>cytK</i>	<i>aiiA</i>	<i>pipIc</i>	<i>hlyII</i>
Jedlý hmyz	100 % (40) <sup>a</sup>	98 % (39) <sup>a</sup>	98 % (39) <sup>a</sup>	13 % (5) <sup>ab</sup>
Krmivo pro psy	0 % (0) <sup>b</sup>	0 % (0) <sup>b</sup>	100 % (19) <sup>a</sup>	0 % (0) <sup>a</sup>
Ostatní	50 % (5) <sup>ab</sup>	70 % (7) <sup>a</sup>	90 % (9) <sup>ab</sup>	40 % (4) <sup>ab</sup>
Ostatní potraviny	20 % (1) <sup>ab</sup>	60 % (3) <sup>ab</sup>	100 % (5) <sup>ab</sup>	40 % (2) <sup>ab</sup>
Škeble	5 % (1) <sup>b</sup>	60 % (12) <sup>a</sup>	60 % (12) <sup>b</sup>	5 % (1) <sup>ab</sup>
Výrobky z hmyzu	82 % (9) <sup>a</sup>	91 % (10) <sup>a</sup>	100 % (11) <sup>ab</sup>	45 % (5) <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Hodnoty ve sloupcích označené alespoň jedním shodným písmenem se statisticky významně neliší (p > 0,05).

## 5.2 Rozdělení kmenů do skupin na základě patotypu

Na základě přítomnosti genů kódujících jednotlivé faktory virulence v genomu lze kmeny rozdělit do 19 patotypových skupin znázorněných v Tabulce č. 8. Nejmenší počet genů detekovaných u vzorků byl 2 a největší naopak 9. Všech 11 genů nenesl žádný z izolátů. Nejvíce byly mezi vzorky zastoupeny kmeny ze skupiny č. 6, které nesly geny *nhe*, *cytK*, *clo*,

*hlyIII*, *piplc*, *cerA* a *cerB*. Hned po ní následovala skupina č. 8 a větší počet kmenů sdružovala také skupina č. 2 a 19. Do skupiny č. 5 se řadily 3 izoláty, do skupiny č. 11 2 izoláty a ostatní skupiny byly zastoupeny pouze jedním kmenem.

**Tabulka č. 8:** Patotypové skupiny.

Skupina	Počet	<i>ces</i>	<i>hbl</i>	<i>nhe</i>	<i>cytK</i>	<i>clo</i>	<i>hlyII</i>	<i>hlyIII</i>	<i>inhA2</i>	<i>piplc</i>	<i>cerA</i>	<i>cerB</i>
1	1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	10	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
3	1	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
4	1	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
5	3	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
6	37	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
7	1	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
8	35	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
9	1	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
10	1	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
11	2	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-
12	1	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+
13	1	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
14	1	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
15	1	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
16	1	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
17	1	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
18	1	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
19	5	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-

- Negativní. + Pozitivní.

U skupin zahrnujících alespoň 5 kmenů (skupina č. 2, 6, 8 a 19) bylo dále posouzeno, zda existují statisticky významné rozdíly v jejich výskytu mezi sledovanými prostředími. Zatímco u skupiny č. 2 (10 kmenů), která výrazně nepřevažovala v žádném z prostředí, rozdíly nalezeny nebyly, u ostatních ano. Výskyt skupiny č. 6 (37 kmenů), jež byla nejvíce zastoupena mezi izoláty z jedlého hmyzu, se prokazatelně lišil ve 4 případech. Skupina č. 8 (35 kmenů) zahrnovala všechny kmeny izolované z krmiva pro psy (19) a naopak žádný kmen z jedlého hmyzu nebo z výrobků z hmyzu. Statisticky významně se od sebe lišily také izoláty z jedlého hmyzu a škeblí, kde byla skupina č. 8 četnější. U skupiny č. 19 (5 kmenů), která byla zastoupena pouze ve škeblích, pak byly pomocí Kruskal-Wallisova testu taktéž prokázány rozdíly, nicméně podrobnější vyhodnocení nebylo dostatečně citlivé, aby ukázalo, která konkrétní prostředí se mezi sebou liší. Při porovnání jednotlivých dvojic prostředí pomocí Mann-Whitneyova U testu žádné statisticky významné rozdíly prokázány nebyly. Výskyt posuzovaných patotypových skupin dle původu kmenů a statisticky významné rozdíly v prevalenci jsou znázorněny v Tabulce č. 9.

**Tabulka č. 9:** Výskyt patotypových skupin čítajících  $\geq 5$  izolátů v různých prostředích. Vyjádřeno jako procentuální zastoupení kmenů skupiny z celkového počtu izolátů z daného prostředí (počet kmenů skupiny v daném prostředí).

Prostředí	Skupina č. 2	Skupina č. 6	Skupina č. 8	Skupina č. 19
Jedlý hmyz	13 % (5) <sup>a</sup>	80 % (32) <sup>a</sup>	0 % (0) <sup>a</sup>	0 % (0) <sup>*</sup>
Krmivo pro psy	0 % (0) <sup>a</sup>	0 % (0) <sup>b</sup>	100 % (19) <sup>b</sup>	0 % (0) <sup>*</sup>
Ostatní	20 % (2) <sup>a</sup>	10 % (1) <sup>b</sup>	40 % (4) <sup>ab</sup>	0 % (0) <sup>*</sup>
Ostatní potraviny	0 % (0) <sup>a</sup>	20 % (1) <sup>ab</sup>	20 % (1) <sup>ab</sup>	0 % (0) <sup>*</sup>
Škeble asijská	0 % (0) <sup>a</sup>	0 % (0) <sup>b</sup>	55 % (11) <sup>bc</sup>	25 % (5) <sup>*</sup>
Výrobky z hmyzu	27 % (3) <sup>a</sup>	27 % (3) <sup>b</sup>	0 % (0) <sup>ac</sup>	0 % (0) <sup>*</sup>

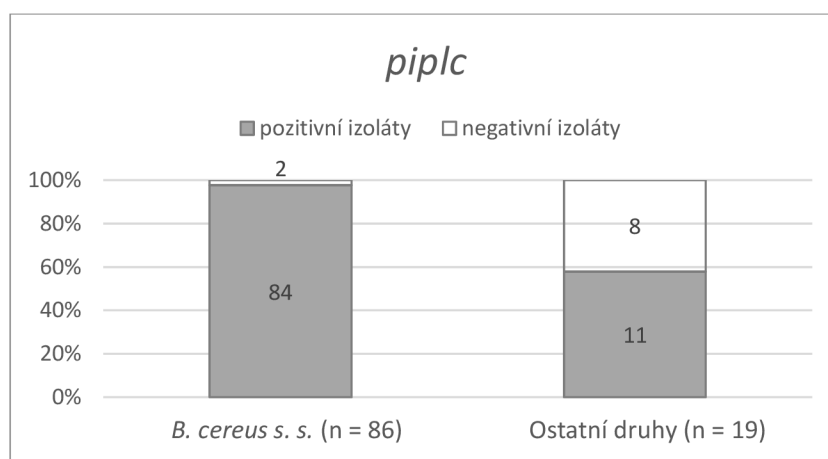
<sup>a, b, c</sup> Hodnoty ve sloupcích označené alespoň jedním shodným písmenem se statisticky významně neliší ( $p > 0,05$ ).

<sup>\*</sup> Nejednoznačné statistické vyhodnocení.

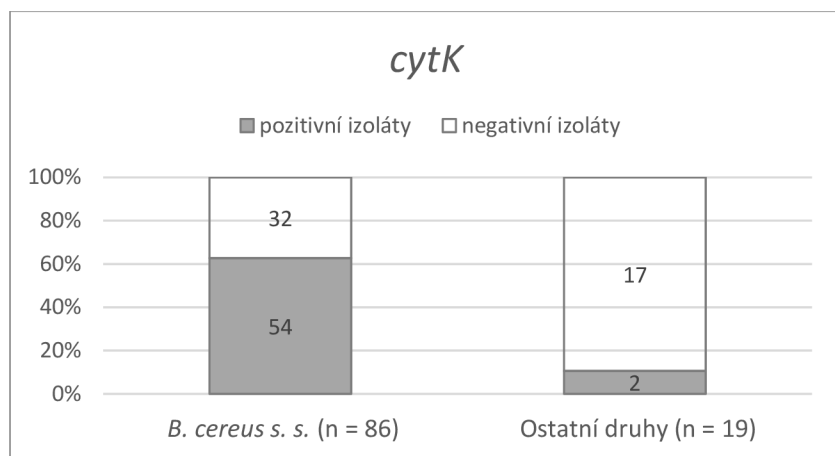
### 5.3 Přítomnost sledovaných genů v závislosti na druhu bakterie

Posuzováno bylo též zastoupení genů ve vztahu k bakteriálnímu druhu. Jelikož nad ostatními druhy, které byly zastoupeny jen v malých počtech, výrazně převažoval *B. cereus sensu stricto*, byly posuzovány rozdíly mezi ním a souhrnnou skupinou všech ostatních identifikovaných druhů. Statisticky významné rozdíly byly zjištěny pouze ve výskytu genů pro fosfolipázu C (*piplc*) a cytotoxin K (*cytK*), které dominovaly u *B. cereus sensu stricto*. Zastoupení těchto dvou genů v obou porovnávaných skupinách je znázorněno v Grafech č. 1 a 2.

**Graf č. 1:** Zastoupení genu pro fosfolipázu C (*piplc*) u *B. cereus sensu stricto* a ostatních druhů (čísla ve sloupcích vyjadřují počty kmenů) (n = 105).



**Graf č. 2:** Zastoupení genu pro cytotoxin K (*cytK*) u *B. cereus sensu stricto* a ostatních druhů (čísla ve sloupcích vyjadřují počty kmenů) (n = 105).



## 6 Diskuze

*B. cereus sensu lato* jsou velice zajímavou skupinou bakterií pro své různorodé pozitivní i negativní vlastnosti. Její zástupci mohou například podporovat růst rostlin, podílet se na koloběhu dusíku v půdě, působit probioticky či narušovat quorum sensing jiných bakterií. Na druhou stranu je však známo také jejich patogenní působení, na kterém se významně podílejí jejich toxiny. V souvislosti s potravinami představují *B. cereus sensu lato* riziko alimentárního onemocnění, s nímž je spojován zejména cereulid, hemolyzin BL, nehemolytický enterotoxin a cytotoxin K. Též se mohou podílet na jejich kažení, což je přisuzováno činnosti bakteriálních enzymů. Bakterie této skupiny jsou široce rozšířeny v prostředí a kontaminují celou řadu různých potravin, mezi které patří i jedlý hmyz, z něhož pochází velká část izolátů zkoumaných v této diplomové práci. Popularita jedlého hmyzu v posledních letech roste, ale jak upozorňují někteří autoři, ještě je třeba lépe porozumět tomu, jaká mikrobiologická rizika jsou s ním spojena. Nicméně je již známo, že bakterie skupiny *B. cereus* jedním z těchto rizik jsou (Grabowski a Klein 2017; Fasolato et al. 2018; Fernandez-Cassi et al. 2020). V této diplomové práci byly hodnoceny rozdíly v zastoupení zkoumaných genů mezi izoláty z různého prostředí, přičemž zvláštní pozornost byla věnována porovnání kmenů izolovaných ze cvrčků chovaných v prostředí univerzity a z komerčních výrobků s obsahem cvrččího proteinu.

Stejně jako ve studiích autorů Aragon-Alegro et al. (2008), Ankolekar et al. (2009), Kim et al. (2011) či Fasolato et al. (2018) u žádného z testovaných vzorků nebyl detekován gen pro cereulid. Jedná se totiž o nepříliš častou vlastnost. Například Hoton et al. (2009) zjistili, že u náhodně vybíraných vzorků se prevalence pohybuje jen kolem 1,5 %. K podobnému výsledku došli také Berthold-Pluta et al. (2019). Naproti tomu Forghani et al. (2014) uvádějí prevalenci asi 14 % a Hoton et al. (2009) dokonce 32,8 %, a to u vzorků, které měly souvislost s alimentárním onemocněním. V porovnání s emetickými kmeny se ve skupině *B. cereus* častěji vyskytují kmeny nesoucí genetické determinanty pro enterotoxiny (Jessberger et al. 2020). Geny kódující všechny 3 složky hemolyzinu BL (*B*, *L*<sub>1</sub> a *L*<sub>2</sub>) byly detekovány u 26,6 % izolátů z jedlého hmyzu (Fasolato et al. 2018), 31,9–62,5 % kmenů z různých pokrmů a potravin (Bonerba et al. 2010; Samapundo et al. 2011; Sánchez-Chica et al. 2021) či u 90 % izolátů z potravin a klinických vzorků (Kim et al. 2011). V této diplomové práci nebyl na kompletní *hbl* pozitivní žádný ze vzorků. V genomu některých kmenů však může být přítomna jen část z genů potřebných pro vznik kompletního a funkčního Hbl (Sánchez-Chica et al. 2021). Testování přítomnosti genů pro jednotlivé složky toxinu u 19 náhodně vybraných kmenů ukázalo, že žádný z izolátů nenesl *hblA*, jenž kóduje vazebnou složku Hbl (Jessberger et al. 2019a). *HblC* a *hblD* byly detekovány u 74 % vzorků. U žádného z testovaných kmenů tedy nebyly nalezeny předpoklady pro produkci funkčního hemolyzinu BL (Jessberger et al. 2019a). Toto zjištění odpovídá výsledkům testování pomocí první sady primerů, navržené pro detekci kompletního toxinového genu. Je na místě zmínit, že se *hbl*, podobně jako *nhe*, vyznačuje vyšším stupněm polymorfismu (Guinebretière et al. 2002), což někdy může vést k tomu, že se nepodaří přítomnost genu odhalit, i když se v genomu nachází

(Aragon-Alegro et al. 2008). Stejně jako hemolyzin BL, také nehemolytický enterotoxin se skládá ze tří složek, které jsou zapotřebí pro jeho aktivitu (Lindbäck 2004). Genetické předpoklady pro tvorbu Nhe jsou mezi bakteriemi skupiny velmi rozšířeny. Prevalence zjištěná v různých studiích se pohybuje od 70–100 % (Ngamwongsatit et al. 2008; Bonerba et al. 2010; Kim et al. 2011; Samapundo et al. 2011; Sánchez-Chica et al. 2021), s čímž se shodují i výsledky této práce, v níž celková prevalence činila 91 %. Nejnižší byla u izolátů ze škeblí (70 %), následoval jedlý hmyz (93 %) a pak izoláty ze zbylých prostředí (100 %). Podobně často bývá nacházen také gen pro enterotoxin FM (*cwpFM*), který se vyskytuje asi u 60–100 % kmenů testovaných v různých studiích. Prevalence genu *cytK* se pak pohybuje přibližně v rozmezí 40–89 % (Ngamwongsatit et al. 2008; Kim et al. 2011; Rather et al. 2012; Tewari et al. 2015; Sánchez-Chica et al. 2021), kam zapadá i celková prevalence zjištěná v této práci (53 %). Podobně jako ve studii autorů Forghani et al. (2014) i zde byly mezi izoláty různého původu prokázány statisticky významné rozdíly. Vysoký výskyt byl zaznamenán u izolátů z jedlého hmyzu (100 %) a výrobků z něj (82 %), naproti tomu u kmenů získaných ze škeblí byl velmi nízký (5 %) a u izolátů z krmiva pro psy nebyl *cytK* detekován vůbec. Cytotoxin K může být produkován ve 2 variantách, CytK-1, spojované s druhem *B. cytotoxicus* (Fagerlund et al. 2004), a CytK-2, která je rozšířenější a má v porovnání s CytK-1 nižší toxicitu (Guinebretière et al. 2006; Guinebretière et al. 2010). Jelikož *B. cytotoxicus* není součástí databáze použité pro identifikaci kmenů v této práci, nelze vyloučit, že některý z nich je schopen produkce toxičtější varianty. Z genů kódujících hemolytické proteiny byl dále zaznamenán vysoký výskyt *clo* (96 %) a *hlyIII* (99 %), přičemž zde nebyly shledány žádné statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými prostředími. Málo se naopak vyskytoval *hlyII*, jehož celková prevalence byla 16 %. K podobným výsledkům (19 % a 21 %) došli také Cadot et al. (2010) a Fagerlund (2004). V případě *hlyII* je možné pozorovat odlišnosti mezi prostředími, Největším dílem byl gen zastoupen u izolátů z jedlého hmyzu (45 %), ostatních potravin (40 %) a kategorie ostatní (40 %) a naopak se vůbec nevyskytoval u kmenů z krmiva pro psy.

U 3 z testovaných izolátů byl detekován gen *inhA2* kódující metaloproteázu immune inhibitor A, která je typická pro *B. anthracis*, ale může se vyskytovat i u jiných druhů, včetně *B. cereus sensu stricto* (Guillemet et al. 2010). Tato metaloproteáza pomáhá bakterie chránit před imunitním systémem hostitele, čímž se významně podílí na virulenci. Patogen pak může snáze kolonizovat tkáň a vyvolat alimentární či jiné onemocnění (Ramarao a Lereclus 2005). Mimoto se InhA podílí na destrukci tkání (Chung et al. 2006), a jak bylo zjištěno v souvislosti s *B. anthracis*, také na rozrušení hemato-encefalické bariéry, což je spojeno s rozvojem život ohrožující meningitidy (Mukherjee et al. 2011). Kmeny nesoucí geny pro InhA by se tedy měly považovat za velmi rizikové pro lidské zdraví, nicméně je třeba připomenout, že i když u pozitivních vzorků vznikl PCR produkt o odpovídající délce, pomocí sekvenování se nepodařilo ověřit, že se skutečně jedná sledovaný gen. Důvodem byla špatná čitelnost sekvence, což mohlo být zapříčiněno degradací primeru použitého při přípravě vzorků k sekvenování.



Celková prevalence genů *pipIc*, *cerA* a *cerB* byla u testovaných izolátů vysoká (90–94 %). Fosfolipázy se mohou podílet na kažení potravin (Meer et al. 1991), ale i na patogenitě bakterií. Sfingomyelináza společně s fosfatidylcholin-specifickou fosfolipázou C působí hemolyticky a mohou též umocňovat hemolýzu navozenou hemolyzinem BL (Beecher a Wong 2000). Toho by se však v případě zde testovaných kmenů nemělo být třeba obávat, jelikož u nich nebyly nalezeny předpoklady pro produkci funkčního Hbl. Sfingomyelináza by dále mohla být zajímavá jako jeden z možných faktorů pro hodnocení míry toxicity bakterie, jelikož Jessberger et al. (2019b) vyzorovali korelaci mezi mírou enteropatogenity a expresí Sph a NheB společně s vyšší proteázovou aktivitou. Fosfolipázy C pak také mohou hrát roli u respiračních onemocnění (Bhunja 2008) a za zmínku zde stojí též jeden z hlavních faktorů virulence produkovaných bakteriemi *Clostridium perfringens*, tzv. alfa-toxin, který mezi fosfolipázy C také patří a může zapříčinit rozvoj plynaté gangrény (Urbina et al. 2009).

Posledním testovaným genem byl *aiiA*, kódující AHL-laktonázu zodpovědnou za narušování quorum sensing jiných bakterií (Dong et al. 2002). Tento enzym je příznivý a mohl by najít uplatnění v prevenci či léčbě některých infekcí (Raafat et al. 2019). Bylo by však žádoucí, aby produkční kmeny nebyly patogenní. *AiiA* byl detekován u 68 % testovaných izolátů a každý pozitivní kmen zároveň nesl také alespoň jeden enterotoxinový gen a několik dalších virulečních genů.

Hypotézou bylo, že izolované kmeny budou produkovat odlišné typy toxinů v závislosti na jejich původu. To se podařilo prokázat jen z části. Tvrzení neplatilo zdaleka pro všechny sledované toxiny. Také je třeba zdůraznit, že ve výskytu žádného z genů nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi všemi typy prostředí. Statisticky významné rozdíly mezi izoláty různého původu byly jednoznačně prokázány ve výskytu *cytK*, *phosC* a *hlyII*. *CytK* se nejčastěji vyskytoval u izolátů z jedlého hmyzu (100 %) a výrobků z hmyzu (82 %), *phosC* u kmenů z krmiva pro psy (100 %), výrobků z hmyzu (100 %), ostatních potravin (100 %) a jedlého hmyzu (98 %) a *hlyII* u izolátů z výrobků z hmyzu (45 %), ostatních potravin (40 %) a kategorie ostatní (40 %). Problematičtější bylo vyhodnocení statistické analýzy pro *cerA*, *cerB* a *nhe*, u nichž bylo dosaženo sporných výsledků. Důvodem zřejmě byly rozdíly nedostatečně výrazné na to, aby bylo možné jednoznačně prokázat jejich statistickou významnost. Pokud jde o porovnání izolátů z jedlého hmyzu z chovu na univerzitě a z komerčních hmyzích výrobků, v zastoupení jednotlivých genů se od sebe statisticky významně nelišily. Vandeweyer et al. (2020) uvádí, že hmyz chovaný v různých podmínkách může mít odlišné mikrobiologické charakteristiky, což by se mohlo vztahovat i na předpoklady k produkci toxinů v rámci stejného druhu. To zde u jednotlivých genů pozorováno nebylo, ale lišilo se zastoupení patotypové skupiny č. 6. Tato skupina tvořila převážnou část izolátů z jedlého hmyzu z univerzitního chovu (80 %), zatímco u komerčních produktů se vyskytovala méně (27 %). Takto výrazný podíl kmenů ze shodné patotypové skupiny u univerzitních cvrčků lze přisuzovat tomu, že hmyz byl chován ve stejném prostředí a pravděpodobně osídlen obdobnou mikrobiotou. Bakterie skupiny *B. cereus* si v prostředí trávicího traktu snadno mohou vzájemně předávat plasmidy i některé chromozomální geny. Napomáhá tomu vyšší hustota bakteriálního osídlení v porovnání s některými jinými prostředími, jako je například

půda. Předávání genů pak může vést k tomu, že kmeny různých druhů rostoucí ve stejném prostředí mohou mít shodný patogenní profil (Thomas et al. 2000; Böhm et al. 2015). Patotypová skupina č. 6 byla tvořena převážně kmeny identifikovanými jako *B. cereus sensu stricto*, který celkově mezi izoláty v této práci převládal. Byl zde však zastoupen také jeden kmen *B. thuringiensis* a jeden kmen identifikovaný nejednoznačně jako *B. cereus s. s.* nebo *B. mycooides*. U komerčních výrobků z hmyzu, na rozdíl od jedlého hmyzu z univerzity, nebyla pozorována žádná patotypová skupina, která by u nich převládala. Jinak tomu bylo v případě krmiva pro psy, které se zde hodí vyzdvihnout, jelikož všechny izoláty z něj spadaly do stejné patotypové skupiny (č. 8). Není známo, zda všechny vzorky krmiva pocházely ze stejné výroby, nicméně na základě zde prezentovaných výsledků lze usuzovat, že je to poměrně pravděpodobné. Opět se jednalo převážně o kmeny druhu *B. cereus s. s.* a mezi nimi byl jeden kmen *B. thuringiensis*.

Navzdory tomu, že je v souvislosti s alimentárními onemocněními obvykle zmiňován *B. cereus sensu stricto*, geny pro faktory virulence, s výjimkou *ces*, jsou mezi druhy skupiny široce rozšířeny. Bakterie skupiny *B. cereus* jsou totiž běžně stanovovány na MYP agaru a tímto způsobem není obvykle možné je od *B. cereus s. s.* rozeznat (EFSA 2016). V této práci byly mezi *B. cereus s. s.* a ostatními druhy statisticky významné rozdíly prokázány pouze v prevalenci *cytK* a *pipIc*, přičemž u obou genů byl pozorován vyšší výskyt u *B. cereus s. s.* Forghani et al. (2014) naopak zaznamenali vyšší prevalenci *cytK* u *B. thuringiensis*. Nebylo však blíže specifikováno, oproti jakým konkrétním druhům byl porovnáván, pouze že se jednalo o ostatní druhy skupiny. Zastoupení zbylých testovaných genů se v této diplomové práci statisticky významně nelišilo. Není tedy tolik důležité, o jaký konkrétní druh se jedná, ale spíše jaké toxinové geny nese. Jak již bylo zmíněno, u žádného z testovaných kmenů nebyly shledány předpoklady pro produkci cereulidu a hemolyzinu BL. Naopak valná většina izolátů nesla geny pro nehemolytický enterotoxin a velká část také pro cytotoxin K. Z toho je patrné, že od nich neplyne riziko emetického syndromu, ale mohly by zapříčinit průjmový syndrom, ke kterému dochází v důsledku produkce enterotoxinů bakteriemi ve střevě (Griffiths a Schraft 2017). O něco vyšší potenciál k vyvolání průjmů měly kmeny izolované z jedlého hmyzu a výrobků z hmyzu, protože se u nich v porovnání s ostatními častěji vyskytoval *cytK*. Mezi izoláty byly dále hojně rozšířeny geny pro fosfolipázy a hemolyziny, což umocňuje jejich patogenní potenciál. Pozornost by pak měla být věnována kmenům, u nichž byl detekován gen pro immune inhibitor A, jelikož by mohly představovat vážnou zdravotní hrozbu. Bylo by u nich tedy vhodné zopakovat sekvenování amplifikovaného PCR produktu, aby bylo možné ověřit, zda se skutečně jedná o sledovaný gen. Přítomnost genu v genomu sice nemusí znamenat, že dochází k jeho expresi (Bhunja 2008), nicméně je dobrou známkou potenciálního rizika (Aragon-Alegro et al. 2008).

## 7 Závěr

Geny pro faktory virulence byly mezi testovanými kmeny hojně rozšířeny. Každý izolát nesl minimálně dva z nich. Zatímco k produkci cereulidu a hemolyzinu BL neměl předpoklady žádný z kmenů, u valné většiny byl zjištěn potenciál ke tvorbě nehemolytického enterotoxinu, fosfolipáz a hemolyzinů, kromě hemolyzinu II. Častý byl také výskyt genu pro cytotoxin K. Pokud by bakterie byly pozřeny a exprimovaly zmíněné toxiny, mohly by u člověka vyvolat průjemové onemocnění. K tomu měly v porovnání s ostatními o něco vyšší potenciál izoláty z jedlého hmyzu a výrobků z hmyzu. Jelikož jsou však k vyvolání onemocnění zapotřebí vyšší počty bakterií, rozvoji onemocnění je možné předcházet vhodným nakládáním s potravinami, které zabrání jejich pomnožení.

Předpoklad, že zkoumané kmeny se mezi sebou budou lišit v závislosti na původu, byl splněn pouze v případě 3 toxinových genů (*cytK*, *hlyII* a *pipIc*) a genu pro AHL-laktonázu (*aiiA*). *CytK* výrazně převažoval u izolátů z jedlého hmyzu a výrobků z hmyzu, *hlyII* dominoval u kmenů z výrobků z hmyzu, ostatních potravin a kategorie ostatní a *pipIc* byl nejčastější u izolátů z krmiva pro psy, jedlého hmyzu, výrobků z hmyzu a z ostatních potravin. *AiiA* převládá u kmenů z jedlého hmyzu a výrobků z hmyzu. V četnosti výskytu ostatních genů významné rozdíly zjištěny nebyly.

Prevalence většiny toxinových genů se nelišila mezi *B. cereus sensu stricto* a ostatními druhy skupiny. Lze tedy dojít k závěru, že potenciálním zdravotním rizikem je nejen *B. cereus s. s.*, ale i ostatní druhy skupiny *B. cereus*. Tato skutečnost by měla být zohledněna, a proto by bylo užitečné do budoucna vyvinout snadný, časově nenáročný a levný nástroj pro spolehlivé posouzení toxicity kontaminujícího kmene, který by bylo možné běžně využívat v potravinářských provozech.

## 8 Literatura

ABEE, T., M. N. GROOT, M. TEMPELAARS, M. ZWIETERING, R. MOEZELAAR a M. V. D. VOORT, 2011. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: Diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiology* [online]. **28**(2), 199-208 [cit. 2021-11-17]. ISSN 0740-0020. Dostupné z: doi: 10.1016/j.fm.2010.03.015

ABRAMOVA, F. A., L. M. GRINBERG, O. V. YAMPOLSKAYA a D. H. WALKER, 1993. Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverdlovsk outbreak of 1979. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **90**(6), 2291-2294 [cit. 2021-11-22]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi: 10.1073/pnas.90.6.2291

ADAME-GÓMEZ, R., I.-M. CRUZ-FACUNDO, L.-L. GARCÍA-DÍAZ, Y. RAMÍREZ-SANDOVAL, A. PÉREZ-VALDESPINO, C. ORTUÑO-PINEDA, M.-C. SANTIAGO-DIONISIO a A. RAMÍREZ-PERALTA, 2020. Biofilm Production by Enterotoxigenic Strains of *Bacillus cereus* in Different Materials and under Different Environmental Conditions. *Microorganisms* [online]. **8**(7) [cit. 2022-02-20]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi: 10.3390/microorganisms8071071

AGAISSE, H., M. GOMINET, O. A. OKSTAD, A.-B. KOLSTO a D. LERECLUS, 1999. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology* [online]. **32**(5), 1043-1053 [cit. 2022-02-17]. ISSN 0950-382X. Dostupné z: doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01419.x

AGATA, N., M. MORI, M. OHTA, S. SUWAN, I. OHTANI a M. ISOBE, 1994. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **121**(1), 31-34 [cit. 2022-01-30]. ISSN 0378-1097. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07071.x

AGATA, N., M. OHTA, M. MORI a K. SHIBAYAMA, 1999. Growth Conditions of and Emetic Toxin Production by *Bacillus cereus* in a Defined Medium with Amino Acids. *Microbiology and Immunology* [online]. **43**(1), 15-18 [cit. 2022-03-12]. ISSN 0385-5600. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1348-0421.1999.tb02367.x

AGATA, N., M. OHTA, M. MORI a M. ISOBE, 1995a. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **129**(1), 17-19 [cit. 2022-01-30]. ISSN 0378-1097. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07550.x

AGATA, N., M. OHTA, Y. ARAKAWA a M. MORI, 1995b. The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. *Microbiology* [online]. **141**(4), 983-988 [cit. 2022-02-11]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi: 10.1099/13500872-141-4-983

AMBROSINI, A., F. H. SANT'ANNA, R. DE SOUZA, M. TADRA-SFEIR, H. FAORO, S. M. ALVARENGA, F. O. PEDROSA, E. M. SOUZA, L. M. P. PASSAGLIA, 2015. Genome Sequence of *Bacillus mycoides* B38V, a Growth-Promoting Bacterium of Sunflower. *Genome Announcements* [online]. **3**(2) [cit. 2021-11-20]. ISSN 2169-8287. Dostupné z: doi: 10.1128/genomeA.00245-15

ANANDAN, K. a R. R. VITTAL, 2019. Quorum quenching activity of AiiA lactonase KMM117 from endophytic *Bacillus thuringiensis* KMCL07 on AHL- mediated pathogenic

phenotype in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis* [online]. **132**, 230-242 [cit. 2022-02-17]. ISSN 0882-4010. Dostupné z: doi: 10.1016/j.micpath.2019.05.015

ANDREEVA, Z. I., V. F. NESTERENKO, I. S. YURKOV, Z. I. BUDARINA, E. V. SINEVA a A. S. SOLONIN, 2006. Purification and cytotoxic properties of *Bacillus cereus* hemolysin II. *Protein Expression and Purification* [online]. **47**(1), 186-193 [cit. 2022-02-06]. ISSN 1046-5928. Dostupné z: doi: 10.1016/j.pep.2005.10.030

ANDREEVA, Z. I., V. F. NESTERENKO, M. G. FOMKINA, V. I. TERNOVSKY, N. E. SUZINA, A. Y. BAKULINA, A. S. SOLONIN a E. V. SINEVA, 2007. The properties of *Bacillus cereus* hemolysin II pores depend on environmental conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. **1768**(2), 253-263 [cit. 2022-02-06]. ISSN 0005-2736. Dostupné z: doi: 10.1016/j.bbamem.2006.11.004

ANKOLEKAR, C., T. RAHMATI a R. G. LABBÉ, 2009. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **128**(3), 460-466 [cit. 2022-02-24]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.006

ARAGON-ALEGRO, L. C., G. PALCICH, G. V. LOPES, V. B. RIBEIRO, M. LANDGRAF a M. T. DESTRO, 2008. Enterotoxigenic and Genetic Profiles of *Bacillus cereus* Strains of Food Origin in Brazil. *Journal of Food Protection* [online]. **71**(10), 2115-2118 [cit. 2022-04-03]. ISSN 0362-028X. Dostupné z: doi: 10.4315/0362-028X-71.10.2115

ASANO, S. I., Y. NUKUMIZU, H. BANDO, T. IIZUKA a T. YAMAMOTO, 1997. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **63**(3), 1054-1057 [cit. 2022-02-13]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi: 10.1128/aem.63.3.1054-1057.1997

BAIDA, G. E. a N. P. KUZMIN, 1995. Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* [online]. **1264**(2), 151-154 [cit. 2022-02-09]. ISSN 0167-4781. Dostupné z: doi: 10.1016/0167-4781(95)00150-F

BAIDA, G. E. a N. P. KUZMIN, 1996. Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. **1284**(2), 122-124 [cit. 2022-02-09]. ISSN 0005-2736. Dostupné z: doi: 10.1016/S0005-2736(96)00168-X

BAIDA, G., Z. I. BUDARINA, N. P. KUZMIN a A. S. SOLONIN, 1999. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **180**(1), 7-14 [cit. 2022-02-06]. ISSN 0378-1097. Dostupné z: doi: 10.1016/S0378-1097(99)00455-3

BALDWIN, V. M., 2020. You Can't *B. cereus* – A Review of *Bacillus cereus* Strains That Cause Anthrax-Like Disease. *Frontiers in Microbiology* [online]. **11**, 1731 [cit. 2021-10-14]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi: 10.3389/fmicb.2020.01731

BARTLETT, J. M. S. a D. STIRLING, 2003. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *PCR Protocols. Methods in Molecular Biology* [online]. **226**. New Jersey: Humana Press, s. 3-6 [cit. 2022-03-18]. ISBN 978-1-59259-384-2. Dostupné z: doi: 10.1385/1-59259-384-4:3

BAZINET, A. L., 2017. Pan-genome and phylogeny of *Bacillus cereus sensu lato*. *BMC Evolutionary Biology* [online]. **17**(1) [cit. 2021-11-14]. ISSN 1471-2148. Dostupné z: doi: 10.1186/s12862-017-1020-1

BEEGLE, C. C. a T. YAMAMOTO, 1992. Invitation paper (C. P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *The Canadian Entomologist* [online]. **124**(4), 587-616 [cit. 2021-11-21]. ISSN 0008-347X. Dostupné z: doi: 10.4039/Ent124587-4

BEECHER, D. J. a A. C. L. WONG, 1997. Tripartite Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **272**(1), 233-239 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi: 10.1074/jbc.272.1.233

BEECHER, D. J. a A. C. L. WONG, 2000. Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *Microbiology* [online]. **146**(12), 3033-3039 [cit. 2022-02-09]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi: 10.1099/00221287-146-12-3033

BEECHER, D. J. a J. D. MACMILLAN, 1991. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity* [online]. **59**(5), 1778-1784 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi: 10.1128/iai.59.5.1778-1784.1991

BEECHER, D. J., J. L. SCHOENI a A. C. WONG, 1995. Enterotoxigenic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity* [online]. **63**(11), 4423-4428 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi: 10.1128/iai.63.11.4423-4428.1995

BEECHER, D. J., T. W. OLSEN, E. B. SOMERS a A. C. L. WONG, 2000. Evidence for Contribution of Tripartite Hemolysin BL, Phosphatidylcholine-Preferring Phospholipase C, and Collagenase to Virulence of *Bacillus cereus* Endophthalmitis. *Infection and Immunity* [online]. **68**(9), 5269-5276 [cit. 2022-02-05]. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi: 10.1128/IAI.68.9.5269-5276.2000

BERNHEIMER, A. W. a P. GRUSHOFF, 1967. Cereolysin: Production, Purification and Partial Characterization. *Journal of General Microbiology* [online]. **46**(1), 143-150 [cit. 2022-02-08]. ISSN 0022-1287. Dostupné z: doi: 10.1099/00221287-46-1-143

BERTHOLD-PLUTA, A., A. PLUTA, M. GARBOWSKA a I. STEFAŃSKA, 2019. Prevalence and toxicity characterization of *Bacillus cereus* in food products from Poland. *Foods* [online]. **8**(7) [cit. 2022-03-17]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi: 10.3390/foods8070269

BHAKDI, S., J. TRANUM-JENSEN a A. SZIEGOLEIT, 1985. Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infection and Immunity* [online]. **47**(1), 52-60 [cit. 2022-02-08]. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi: 10.1128/iai.47.1.52-60.1985

BHUNIA, A. K., 2008. *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. *Foodborne Microbial Pathogens* [online]. New York: Springer, s. 135-148 [cit. 2022-02-09]. ISBN 978-0-387-74537-4. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74537-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74537-4_7)

BÖHM, M.-E., C. HUPTAS, V. M. KREY a S. SCHERER, 2015. Massive horizontal gene transfer, strictly vertical inheritance and ancient duplications differentially shape the evolution of *Bacillus cereus* enterotoxin operons *hbl*, *cytK* and *nhe*. *BMC Evolutionary*

*Biology* [online]. **15**(1) [cit. 2022-04-13]. ISSN 1471-2148. Dostupné z: doi: 10.1186/s12862-015-0529-4

BONERBA, E., A. DI PINTO, L. NOVELLO, F. MONTEMURRO, V. TERIO, V. COLAO, G. CICCARESE a G. TANTILLO, 2010. Detection of potentially enterotoxigenic food-related *Bacillus cereus* by PCR analysis. *The International Journal of Food Science & Technology* [online]. **45**(6), 1310-1315 [cit. 2022-02-23]. ISSN 0950-5423. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1365-2621.2010.02257.x

BORIN, D. B., K. CASTREJÓN-ARROYO, A. CRUZ-NOLASCO, M. PEÑA-RICO, M. R. SAGRILLO, R. C. V. SANTOS, L. S. BACO, L. PÉREZ-PICASO, L. CAMACHO, A. K. NAVARRO-MTZ, 2021. Parasporin A13-2 of *Bacillus thuringiensis* Isolates from the Papaloapan Region (Mexico) Induce a Cytotoxic Effect by Late Apoptosis against Breast Cancer Cells. *Toxins* [online]. **13**(7) [cit. 2021-11-21]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi: 10.3390/toxins13070476

BOTTONE, E. J., 2010. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **23**(2), 382-398 [cit. 2021-11-21]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi: 10.1128/CMR.00073-09

BRILLARD, J. a D. LERECLUS, 2007. Characterization of a small PlcR-regulated gene co-expressed with cereolysin O. *BMC Microbiology* [online]. **7**(1) [cit. 2022-04-09]. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi: 10.1186/1471-2180-7-52

BROOK, I., 2002. The prophylaxis and treatment of anthrax. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. **20**(5), 320-325 [cit. 2021-11-21]. ISSN 0924-8579. Dostupné z: doi: 10.1016/S0924-8579(02)00200-5

BUDARINA, Z. I., D. V. NIKITIN, N. ZENKIN, M. ZAKHAROVA, E. SEMENOVA, M. G. SHLYAPNIKOV, E. A. RODIKOVA, S. MASYUKOVA, O. OGARKOV, G. E. BAIDA, A. S. SOLONIN a K. SEVERINOV, 2004. A new *Bacillus cereus* DNA-binding protein, HlyIIr, negatively regulates expression of *B. cereus* haemolysin II. *Microbiology* [online]. **150**(11), 3691-3701 [cit. 2022-02-06]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi: 10.1099/mic.0.27142-0

CADOT, C., S.-L. TRAN, M.-L. VIGNAUD, M. L. DE BUYSER, A.-B. KOLSTØ, A. BRISABOIS, C. NGUYEN-THÉ, D. LERECLUS, M.-H. GUINEBRETIERE a N. RAMARAO, 2010. InhA1, NprA, and HlyII as Candidates for Markers To Differentiate Pathogenic from Nonpathogenic *Bacillus cereus* Strains. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **48**(4), 1358-1365 [cit. 2022-04-03]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi: 10.1128/JCM.02123-09

CAIRO, J., I. GHERMAN, A. DAY a P. E. COOK, 2022. *Bacillus cytotoxicus* – A potentially virulent food-associated microbe. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **132**(1), 31-40 [cit. 2022-04-09]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi: 10.1111/jam.15214

CARRERA, M., R.O. ZANDOMENI, J. FITZGIBBON a J.-L. SAGRIPANTI, 2007. Difference between the spore sizes of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **102**(2), 303-312 [cit. 2022-01-30]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03111.x

CARROLL, L. M., M. WIEDMANN, J. KOVAC a M. S. TURNER, 2020. Proposal of a Taxonomic Nomenclature for the *Bacillus cereus* Group Which Reconciles Genomic

Definitions of Bacterial Species with Clinical and Industrial Phenotypes. *MBio* [online]. **11**(1) [cit. 2021-11-17]. ISSN 2161-2129. Dostupné z: doi: 10.1128/mBio.00034-20

CARROLL, L. M., R. A. CHENG, M. WIEDMANN a J. KOVAC, 2021. Keeping up with the *Bacillus cereus* group: taxonomy through the genomics era and beyond. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 1-26 [cit. 2022-03-12]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi: 10.1080/10408398.2021.1916735

CASANOVAS-MASSANA, A., L. SALA-COMORERA a A. R. BLANCH, 2014. Quantification of tetracycline and chloramphenicol resistance in digestive tracts of bulls and piglets fed with Toyocerin®, a feed additive containing *Bacillus toyonensis* spores. *Veterinary Microbiology* [online]. **173**(1-2), 59-65 [cit. 2021-11-21]. ISSN 0378-1135. Dostupné z: doi: 10.1016/j.vetmic.2014.07.005

CEUPPENS, S., A. RAJKOVIC, M. HEYNDRIKX, V. TSILIA, T. VAN DE WIELE, N. BOON a M. UYTENDAELE, 2011. Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. **37**(3), 188-213 [cit. 2022-01-29]. ISSN 1040-841X. Dostupné z: doi: 10.3109/1040841X.2011.558832

CEUPPENS, S., A. RAJKOVIC, S. HAMELINK, T. VAN DE WIELE, N. BOON a M. UYTENDAELE, 2012. Enterotoxin Production by *Bacillus cereus* Under Gastrointestinal Conditions and Their Immunological Detection by Commercially Available Kits. *Foodborne Pathogens and Disease* [online]. **9**(12), 1130-1136 [cit. 2022-01-29]. ISSN 1535-3141. Dostupné z: doi: 10.1089/fpd.2012.1230

CEUPPENS, S., N. BOON a M. UYTENDAELE, 2013. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. **84**(3), 433-450 [cit. 2022-01-28]. ISSN 01686496. Dostupné z: doi: 10.1111/1574-6941.12110

COOLBAUGH, J. C. a R. P. WILLIAMS, 1978. Production and characterization of two hemolysins of *Bacillus cereus*. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. **24**(11), 1289-1295 [cit. 2022-02-06]. ISSN 0008-4166. Dostupné z: doi: 10.1139/m78-209

COSTERTON, J. W., P. S. STEWART a E. P. GREENBERG, 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* [online]. **284**(5418), 1318-1322 [cit. 2022-02-20]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi: 10.1126/science.284.5418.1318

COWELL, J. L. a A. W. BERNHEIMER, 1978. Role of cholesterol in the action of cereolysin on membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **190**(2), 603-610 [cit. 2022-02-08]. ISSN 0003-9861. Dostupné z: doi: 10.1016/0003-9861(78)90316-8

COWELL, J. L., K.-S. KIM a A. W. BERNHEIMER, 1978. Alteration by cereolysin of the structure of cholesterol-containing membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. **507**(2), 230-241 [cit. 2022-02-08]. ISSN 0005-2736. Dostupné z: doi: 10.1016/0005-2736(78)90419-4

COX, W. A., 1975. Subject: Bitty cream and related problems. *International Journal of Dairy Technology* [online]. **28**(2), 59-68 [cit. 2022-03-20]. ISSN 1364-727X. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1471-0307.1975.tb00682.x



CUI, Y., E. MÄRTLBAUER, R. DIETRICH, H. LUO, S. DING a K. ZHU, 2019. Multifaceted toxin profile, an approach toward a better understanding of probiotic *Bacillus cereus*. *Critical Reviews in Toxicology* [online]. **49**(4), 342-356 [cit. 2022-04-13]. ISSN 1040-8444. Dostupné z: doi: 10.1080/10408444.2019.1609410

DALHAMMAR, G. a H. STEINER, 1984. Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *European Journal of Biochemistry* [online]. **139**(2), 247-252 [cit. 2022-02-13]. ISSN 0014-2956. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1432-1033.1984.tb08000.x

DENG, C., Q. PENG, F. SONG a D. LERECLUS, 2014. Regulation of cry Gene Expression in *Bacillus thuringiensis*. *Toxins* [online]. **6**(7), 2194-2209 [cit. 2021-11-21]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi: 10.3390/toxins6072194

DI FRANCO, C., E. BECCARI, T. SANTINI, G. PISANESCHI a G. TECCE, 2002. Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*. *BMC Microbiology* [online]. **2**(1) [cit. 2022-03-11]. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi: 10.1186/1471-2180-2-33

DIETRICH, R., N. JESSBERGER, M. EHLING-SCHULZ, E. MÄRTLBAUER a P. E. GRANUM, 2021. The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins* [online]. **13**(2) [cit. 2022-02-05]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi: 10.3390/toxins13020098

DONG, Y.-H., A. R. GUSTI, Q. ZHANG, J.-L. XU a L.-H. ZHANG, 2002. Identification of Quorum-Quenching N -Acyl Homoserine Lactonases from *Bacillus* Species. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **68**(4), 1754-1759 [cit. 2022-02-16]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi: 10.1128/AEM.68.4.1754-1759.2002

DONG, Y.-H., L.-H. WANG, J.-L. XU, H.-B. ZHANG, X.-F. ZHANG a L.-H. ZHANG, 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* [online]. **411**(6839), 813-817 [cit. 2022-02-16]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi: 10.1038/35081101

DUBOIS, T., K. FAEGRI, S. GÉLIS-JEANVOINE, S. PERCHAT, C. LEMY, C. BUISSON, C. NIELSEN-LEROUX, M. GOHAR, P. JACQUES, N. RAMARAO, L. SLAMTI, A.-B. KOLSTØ a D. LERECLUS, 2016. Correction: Necrotrophism Is a Quorum-Sensing-Regulated Lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLOS Pathogens* [online]. **12**(11) [cit. 2022-02-17]. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.ppat.1006049

EDLUND, T., I. SIDÉN a H. G. BOMAN, 1976. Evidence for two immune inhibitors from *Bacillus thuringiensis* interfering with the humoral defense system of saturniid pupae. *Infection and Immunity* [online]. **14**(4), 934-941 [cit. 2022-02-13]. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi: 10.1128/iai.14.4.934-941.1976

EFSA FEEDAP PANEL, 2014. Scientific Opinion on the safety and efficacy of Toyocerin® (*Bacillus toyonensis*) as a feed additive for chickens for fattening, weaned piglets, pigs for fattening, sows for reproduction, cattle for fattening and calves for rearing and for rabbits for fat. *EFSA Journal* [online]. **12**(7), 17 [cit. 2021-11-21]. ISSN 18314732. Dostupné z: doi: 10.2903/j.efsa.2014.3766

EFSA, 2016. Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal* [online]. **14**(7) [cit. 2022-03-07]. ISSN 18314732. Dostupné z: doi: 10.2903/j.efsa.2016.4524

EHLING-SCHULZ, M., D. LERECLUS, T. M. KOEHLER, V. A. FISCHETTI, R. P. NOVICK, J. J. FERRETTI, D. A. PORTNOY, M. BRAUNSTEIN a J. I. ROOD, 2019. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum* [online]. **7**(3) [cit. 2022-02-17]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018

EHLING-SCHULZ, M., M. FRICKER, H. GRALLERT, P. RIECK, M. WAGNER a S. SCHERER, 2006. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: Structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiology* [online]. **6**(1) [cit. 2022-01-30]. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi: 10.1186/1471-2180-6-20

ELLOUZE, M., N. BUSS DA SILVA, K. ROUZEAU-SZYNALSKI, L. COISNE, F. CANTERGIANI a J. BARANYI, 2021. Modeling *Bacillus cereus* Growth and Cereulide Formation in Cereal-, Dairy-, Meat-, Vegetable-Based Food and Culture Medium. *Frontiers in Microbiology* [online]. **12** [cit. 2022-01-31]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi: 10.3389/fmicb.2021.639546

FAGERLUND, A., O. WEEN, T. LUND, S. P. HARDY a P. E. GRANUM, 2004. Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology* [online]. **150**(8), 2689-2697 [cit. 2021-11-17]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi: 10.1099/mic.0.26975-0

FAGERLUND, A., T. LINDBÄCK, A. K. STORSET, P. E. GRANUM a S. P. HARDY, 2008. *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology* [online]. **154**(3), 693-704 [cit. 2022-02-04]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi: 10.1099/mic.0.2007/014134-0

FAILLE, C., G. TAUVERON, C. LE GENTIL-LELIÈVRE a C. SLOMIANNY, 2007. Occurrence of *Bacillus cereus* Spores with a Damaged Exosporium: Consequences on the Spore Adhesion on Surfaces of Food Processing Lines. *Journal of Food Protection* [online]. **70**(10), 2346-2353 [cit. 2022-03-11]. ISSN 0362-028X. Dostupné z: doi: 10.4315/0362-028X-70.10.2346

FASOLATO, L., B. CARDAZZO, L. CARRARO, F. FONTANA, E. NOVELLI a S. BALZAN, 2018. Edible processed insects from e-commerce: Food safety with a focus on the *Bacillus cereus* group. *Food Microbiology* [online]. **76**, 296-303 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0740-0020. Dostupné z: doi: 10.1016/j.fm.2018.06.008

FDA, 2018. Anthrax. *U. S. Food & Drug Administration* [online]. USA: FDA [cit. 2022-03-22]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/anthrax>

FERNANDEZ-CASSI, X., K. SÖDERQVIST, A. BAKEEVA, M. VAGA, J. DICKSVED, I. VAGSHOLM, A. JANSSON a S. BOQVIST, 2020. Microbial communities and food safety aspects of crickets (*Acheta domesticus*) reared under controlled conditions. *Journal of Insects as Food and Feed* [online]. **6**(4), 429-440 [cit. 2022-03-17]. ISSN 2352-4588. Dostupné z: doi: 10.3920/JIFF2019.0048

FERNÁNDEZ-CHAPA, D., J. RAMÍREZ-VILLALOBOS a L. GALÁN-WONG, 2019. Toxic Potential of *Bacillus thuringiensis*: An Overview. JIA, Y., ed. *Protecting Rice Grains in the Post-Genomic Era*. Londýn: IntechOpen, s. 182-185. ISBN 978-1-78984-387-3. Dostupné z: doi: 10.5772/intechopen.85756

FLETCHER, P. a N. A. LOGAN, 2002. Improved cytotoxicity assay for *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. *Letters in Applied Microbiology* [online]. **28**(5), 394-400 [cit. 2022-03-11]. ISSN 0266-8254. Dostupné z: doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00542.x

FORGHANI, F., J.-B. KIM a D.-H. OH, 2014. Enterotoxigenic Profiling of Emetic Toxin- and Enterotoxin-Producing *Bacillus cereus*, Isolated from Food, Environmental, and Clinical Samples by Multiplex PCR. *Journal of Food Science* [online]. **79**(11), M2288-M2293 [cit. 2022-02-23]. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi: 10.1111/1750-3841.12666

FRANKLAND, G. C. a P. F. FRANKLAND, 1887. Studies on Some New Micro-Organisms Obtained from Air. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* [online]. **178**, 257-287 [cit. 2021-11-22]. ISSN 0264-3839. Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/91702>

FRENZEL, E., V. DOLL, M. PAUTHNER, G. LÜCKING, S. SCHERER a M. EHLING-SCHULZ, 2012. CodY orchestrates the expression of virulence determinants in emetic *Bacillus cereus* by impacting key regulatory circuits. *Molecular Microbiology* [online]. **85**(1), 67-88 [cit. 2022-03-24]. ISSN 0950-382X. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08090.x

GHELARDI, E., F. CELANDRONI, S. SALVETTI, M. CERAGIOLI, D. J. BEECHER, S. SENESI a A. C. L. WONG, 2007. Swarming Behavior of and Hemolysin BL Secretion by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **73**(12), 4089-4093 [cit. 2022-03-10]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi: 10.1128/AEM.02345-06

GILMORE, M. S., A. L. CRUZ-RODZ, M. LEIMEISTER-WÄCHTER, J. KREFT a W. GOEBEL, 1989. A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage. *Journal of Bacteriology* [online]. **171**(2), 744-753 [cit. 2022-02-11]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi: 10.1128/jb.171.2.744-753.1989

GOHAR, M., K. FAEGRI, S. PERCHAT, S. RAVNUM, O. A. ØKSTAD, M. GOMINET, A.-B. KOLSTØ, D. LERECLUS a C.-H. YANG, 2008. The PlcR Virulence Regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE* [online]. **3**(7) [cit. 2022-02-17]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.pone.0002793

GOODWIN, A. E., J. S. ROY, J. M. GRIZZLE a M. T. GOLDSBY, 1994. *Bacillus mycoides* a bacterial pathogen of channel catfish. *Diseases of Aquatic Organisms* [online]. **18**(3), 173-179 [cit. 2021-11-20]. ISSN 0177-5103. Dostupné z: doi: 10.3354/dao018173

GORDON, R. E., W. C. HAYNES a C. H.-N. PANG, 1973. *The Genus Bacillus*. Agriculture Handbook No. 427. Washington D. C.: United States Department of Agriculture. Dostupné také z: <https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=uiug.30112019255089&view=1up&seq=35>

GRABOWSKI, N. T. a G. KLEIN, 2017. Microbiology of processed edible insect products – Results of a preliminary survey. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **243**, 103-107 [cit. 2022-03-17]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.005

GRANUM, P. E., K. O'SULLIVAN a T. LUND, 1999. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **177**(2), 225-229 [cit. 2022-02-04]. ISSN 0378-1097. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13736.x

GREEN, M. R. a J. SAMBROOK, 2019. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. **2019**(6), 436-456 [cit. 2022-03-18]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi: 10.1101/pdb.top095109

GRIFFITH, O. H. a M. RYAN, 1999. Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: structure, function, and interaction with lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. **1441**(2-3), 237-254 [cit. 2022-02-09]. ISSN 1388-1981. Dostupné z: doi: 10.1016/S1388-1981(99)00153-5

GRIFFITHS, M. W. a H. SCHRAFT, 2017. Chapter 20 – *Bacillus cereus* Food Poisoning. DODD, Christine E. R., Tim ALDSWORTH, Richard A. STEIN, Dean O. CLIVER a Hans P. RIEMANN. *Foodborne Diseases* [online]. Third Edition. Academic Press, s. 395-405 [cit. 2022-01-29]. ISBN 9780123850072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00020-6>

GUILLEMET, E., C. CADOT, S.-L. TRAN, M.-H. GUINEBRETIERE, D. LERECLUS a N. RAMARAO, 2010. The InhA Metalloproteases of *Bacillus cereus* Contribute Concomitantly to Virulence. *Journal of Bacteriology* [online]. **192**(1), 286-294 [cit. 2022-02-13]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi: 10.1128/JB.00264-09

GUINEBRETIERE, M.-H., A. FAGERLUND, P. E. GRANUM a C. NGUYEN-THE, 2006. Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **259**(1), 74-80 [cit. 2022-02-05]. ISSN 0378-1097. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00247.x

GUINEBRETIERE, M.-H., P. VELGE, O. COUVERT, F. CARLIN, M.-L. DEBUYSER a C. NGUYEN-THE, 2010. Ability of *Bacillus cereus* Group Strains To Cause Food Poisoning Varies According to Phylogenetic Affiliation (Groups I to VII) Rather than Species Affiliation. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **48**(9), 3388-3391 [cit. 2022-02-05]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi: 10.1128/JCM.00921-10

GUINEBRETIERE, M.-H., S. AUGER, N. GALLERON, M. CONTZEN, B. DE SARRAU, M. DE BUYSER, G. LAMBERET, A. FAGERLUND, P. E. GRANUM, D. LERECLUS, P. DE VOS, C. NGUYEN-THE a A. SOROKIN, 2013. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **63**(Pt\_1), 31-40 [cit. 2021-11-14]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi: 10.1099/ijs.0.030627-0

GUINEBRETIERE, M.-H., V. BROUSSOLLE a C. NGUYEN-THE, 2002. Enterotoxigenic Profiles of Food-Poisoning and Food-Borne *Bacillus cereus* Strains. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **40**(8), 3053-3056 [cit. 2022-04-03]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi: 10.1128/JCM.40.8.3053-3056.2002

HANSEN, B. M., P. E. HØIBY, G. B. JENSEN a N. B. HENDRIKSEN, 2003. The *Bacillus cereus bceT* enterotoxin sequence reappraised. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **223**(1), 21-24 [cit. 2022-02-11]. ISSN 0378-1097. Dostupné z: doi: 10.1016/S0378-1097(03)00249-0

HARADA, A. M. M. a M. S. NASCIMENTO, 2021. Effect of dry sanitizing methods on *Bacillus cereus* biofilm. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. **52**(2), 919-926 [cit. 2022-02-20]. ISSN 1517-8382. Dostupné z: doi: 10.1007/s42770-021-00451-0

HAYDAR, A., S.-L. TRAN, E. GUILLEMET, C. DARRIGO, S. PERCHAT, D. LERECLUS, L. COQUET, T. JOUENNE a N. RAMARAO, 2018. InhA1-Mediated Cleavage of the Metalloprotease NprA Allows *Bacillus cereus* to Escape From Macrophages. *Frontiers in Microbiology* [online]. **9** [cit. 2022-03-23]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi: 10.3389/fmicb.2018.01063

HAYRAPETYAN, H., L. MULLER, M. TEMPELAARS, T. ABEE a M. NIEROP GROOT, 2015. Comparative analysis of biofilm formation by *Bacillus cereus* reference strains and undomesticated food isolates and the effect of free iron. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **200**, 72-79 [cit. 2022-02-20]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.005

HEIDT, J., N. PAPALOUKAS a C. P. TIMMERMAN, 2019. A rare bloodstream infection: *Bacillus mycoides*. *The Netherlands Journal of Medicine*. **77**(6), 227-230.

HEILKENBRINKER, U., R. DIETRICH, A. DIDIER, K. ZHU, T. LINDBÄCK, P. E. GRANUM, E. MÄRTLBAUER a M. GASSET, 2013. Complex Formation between NheB and NheC Is Necessary to Induce Cytotoxic Activity by the Three-Component *Bacillus cereus* Nhe Enterotoxin. *PLoS ONE* [online]. **8**(4) [cit. 2022-02-04]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.pone.0063104

HEINZ, D. W., M. RYAN, T. L. BULLOCK a O. H. GRIFFITH, 1995. Crystal structure of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus cereus* in complex with myo-inositol. *The EMBO Journal* [online]. **14**(16), 3855-3863 [cit. 2022-02-09]. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00057.x

HENDRIKSEN, N. B., B. M. HANSEN a J. E. JOHANSEN, 2006. Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. **89**(2), 239-249 [cit. 2022-03-29]. ISSN 0003-6072. Dostupné z: doi: 10.1007/s10482-005-9025-y

HERGENROTHER, P. J. a S. F. MARTIN, 2000. Phosphatidylcholine-Preferring Phospholipase C from *B. cereus*. Function, Structure, and Mechanism. WALDMANN, H. *Bioorganic Chemistry of Biological Signal Transduction* [online]. Berlin: Springer, s. 131-167 [cit. 2022-02-09]. ISBN 978-3-540-45035-1. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/3-540-45035-1\\_5](https://doi.org/10.1007/3-540-45035-1_5)

HOTON, F. M., N. FORNELOS, E. N'GUESSAN, X. HU, I. SWIECICKA, K. DIERICK, E. JÄÄSKELÄINEN, M. SALKINOJA-SALONEN a J. MAHILLON, 2009. Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* cereulide-producing strains. *Environmental Microbiology Reports* [online]. **1**(3), 177-183 [cit. 2022-03-25]. ISSN 17582229. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00028.x

HSIEH, Y. M., S. J. SHEU, Y. L. CHEN a H. Y. TSEN, 1999. Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **87**(4), 481-490 [cit. 2022-02-13]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00837.x

CHANDRAMOHAN, M., C. Y. YEE, P. H. KEI BEATRICE, P. PONNAIAH, G. NARENDRAKUMAR a A. V. SAMROT, 2019. Production, characterization and optimization of fibrinolytic protease from *Bacillus pseudomycooides* strain MA02 isolated from poultry slaughter house soils. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [online]. **22** [cit. 2021-11-20]. ISSN 1878-8181. Dostupné z: doi: 10.1016/j.bcab.2019.101371

CHOMA, C. a P. E. GRANUM, 2002. The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **217**(1), 115-119 [cit. 2022-02-11]. ISSN 0378-1097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11464.x

CHUNG, M.-C., T. G. POPOVA, B. A. MILLIS, D. V. MUKHERJEE, W. ZHOU, L. A. LIOTTA, E.F. PETRICOIN, V. CHANDHOKE, C. BAILEY a S. G. POPOV, 2006. Secreted Neutral Metalloproteases of *Bacillus anthracis* as Candidate Pathogenic Factors. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **281**(42), 31408-31418 [cit. 2022-04-05]. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi: 10.1016/S0021-9258(19)84053-X

ISAAA, 2016. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016*. ISAAA Brief No. 52. Ithaca, NY: ISAAA. ISBN 978-1-892456-66-4.

JÄÄSKELÄINEN, E. L., V. TEPLOVA, M. A. ANDERSSON, L. C. ANDERSSON, P. TAMMELA, M. C. ANDERSSON, T. I. PIRHONEN, N.-E. L. SARIS, P. VUORELA a M. S. SALKINOJA-SALONEN, 2003. In vitro assay for human toxicity of cereulide, the emetic mitochondrial toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*. *Toxicology in Vitro* [online]. **17**(5-6), 737-744 [cit. 2022-01-31]. ISSN 0887-2333. Dostupné z: doi: 10.1016/S0887-2333(03)00096-1

JESSBERGER, N., M. KRANZLER, C. DA RIOL, V. SCHWENK, T. BUCHACHER, R. DIETRICH, M. EHLING-SCHULZ a E. MÄRTLBAUER, 2019b. Assessing the toxic potential of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Food Microbiology* [online]. **84** [cit. 2022-02-05]. ISSN 0740-0020. Dostupné z: doi: 10.1016/j.fm.2019.103276

JESSBERGER, N., R. DIETRICH, P. E. GRANUM a E. MÄRTLBAUER, 2020. The *Bacillus cereus* Food Infection as Multifactorial Process. *Toxins* [online]. **12**(11) [cit. 2022-02-22]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi: 10.3390/toxins12110701

JESSBERGER, N., R. DIETRICH, S. SCHWEMMER, F. TAUSCH, V. SCHWENK, A. DIDIER a E. MÄRTLBAUER, 2019a. Binding to The Target Cell Surface Is The Crucial Step in Pore Formation of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Toxins* [online]. **11**(5) [cit. 2022-02-02]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi: 10.3390/toxins11050281

JIMÉNEZ, G., M. URDIAIN, A. CIFUENTES, A. LÓPEZ-LÓPEZ, A. R. BLANCH, J. TAMAMES, P. KÄMPFER, A.-B. KOLSTØ, D. RAMÓN, J. F. MARTÍNEZ, F. M. CODOÑER a R. ROSSELLÓ-MÓRA, 2013. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. **36**(6), 383-391 [cit. 2021-11-14]. ISSN 0723-2020. Dostupné z: doi: 10.1016/j.syapm.2013.04.008

JOUZANI, G. S., E. VALIJANIAN a R. SHARAFI, 2017. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **101**(7), 2691-2711 [cit. 2022-03-23]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi: 10.1007/s00253-017-8175-y

JUNEJA, V. K., T. B. MOHR, M. SILVERMAN a O. P. SNYDER, 2018. Influence of Cooling Rate on Growth of *Bacillus cereus* from Spore Inocula in Cooked Rice, Beans, Pasta, and Combination Products Containing Meat or Poultry. *Journal of Food Protection* [online]. **81**(3), 430-436 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0362-028X. Dostupné z: doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-397

KANEKO, K.-I., H. HAYASHIDANI, Y. OHTOMO, J. KOSUGE, M. KATO, K. TAKAHASHI, Y. SHIRAKI a M. OGAWA, 1999. Bacterial Contamination of Ready-to-Eat Foods and Fresh Products in Retail Shops and Food Factories. *Journal of Food Protection* [online]. **62**(6), 644-649 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0362-028X. Dostupné z: doi: 10.4315/0362-028X-62.6.644

KANTAS, D., V. G. PAPATSIROS, P. D. TASSIS, I. GIAVASIS, P. BOUKI a E. D. TZIKA, 2015. A feed additive containing *Bacillus toyonensis* (Toyocerin®) protects against enteric pathogens in postweaning piglets. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **118**(3), 727-738 [cit. 2021-11-21]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi: 10.1111/jam.12729

KELLEY, P. W., K. E. KESTER, C. A. HAWKES, A. M. FRIEDLANDER, J. PAVLIN, K. T. MCKEE, W. R. BYRNE, C. F. OCKENHOUSE, L. A. PEARSE a C. D. HOOVER, 2005. Chapter 36 Diseases transmitted primarily from animals to humans. DAVIS, L. B., D. A. WISE, B. G. MASTON, A. C. SZUL a K. A. HUYCKE. *Military Preventive Medicine: Mobilization and Deployment*. Volume 2. Washington D. C.: U.S. Army. Office of The Surgeon General. Borden Institute, s. 937-998.

KIM, B., J. BANG, H. KIM, Y. KIM, B.-S. KIM, L. R. BEUCHAT a J.-H. RYU, 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* [online]. **42**, 89-94 [cit. 2022-03-10]. ISSN 0740-0020. Dostupné z: doi: 10.1016/j.fm.2014.02.021

KIM, J.-B., J.-M. KIM, S.-H. CHO, H.-S. OH, N. J. CHOI a D.-H. OH, 2011. Toxin Genes Profiles and Toxin Production Ability of *Bacillus cereus* Isolated from Clinical and Food Samples. *Journal of Food Science* [online]. **76**(1), T25-T29 [cit. 2022-02-24]. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01958.x

KOTIRANTA, A., K. LOUNATMAA a M. HAAPASALO, 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection* [online]. **2**(2), 189-198 [cit. 2022-03-23]. ISSN 1286-4579. Dostupné z: doi: 10.1016/S1286-4579(00)00269-0

KUMAR, P., M. KAMLE, R. BORAH, D. K. MAHATO a B. SHARMA, 2021. *Bacillus thuringiensis* as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* [online]. **31**(1) [cit. 2021-11-21]. ISSN 2536-9342. Dostupné z: doi: 10.1186/s41938-021-00440-3

KUPPE, A., L. M. EVANS, D. A. MCMILLEN a O. H. GRIFFITH, 1989. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus cereus*: cloning, sequencing, and relationship to other phospholipases. *Journal of Bacteriology* [online]. **171**(11), 6077-6083 [cit. 2022-02-09]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi: 10.1128/jb.171.11.6077-6083.1989

KWON, M., M. S. HUSSAIN a D. H. OH, 2017. Biofilm formation of *Bacillus cereus* under food-processing-related conditions. *Food Science and Biotechnology* [online]. **26**(4), 1103-1111 [cit. 2022-02-20]. ISSN 1226-7708. Dostupné z: doi: 10.1007/s10068-017-0129-8

LARSEN, H. D. a K. JØRGENSEN, 1997. The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **34**(2), 179-186 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi: 10.1016/S0168-1605(96)01182-8

LECHNER, S., R. MAYR, K. P. FRANCIS, B. M. PRUSS, T. KAPLAN, E. WIESSNER-GUNKEL, G. S. A. B. STEWART a S. SCHERER, 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. **48**(4), 1373-1382 [cit. 2021-11-14]. ISSN 0020-7713. Dostupné z: doi: 10.1099/00207713-48-4-1373

LI, H., C. AI, X. ZHAO, B. PANG, X. XU, W. WU, G. LIU, C. JIANG, Z. PAN a J. SHI, 2022. The capability of *Bacillus pseudomycooides* from soil to remove Cu(II) in water and prevent it from entering plants. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **132**(3), 1914-1925 [cit. 2021-11-20]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi: 10.1111/jam.15343

LIN, R., D. LI, Y. XU, M. WEI, Q. CHEN, Y. DENG a J. WEN, 2021. Chronic cereulide exposure causes intestinal inflammation and gut microbiota dysbiosis in mice. *Environmental Pollution* [online]. **288** [cit. 2022-01-31]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi: 10.1016/j.envpol.2021.117814

LINDBÄCK, T., 2004. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology* [online]. **150**(12), 3959-3967 [cit. 2022-02-04]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi: 10.1099/mic.0.27359-0

LINDBÄCK, T., S. P. HARDY, R. DIETRICH, M. SØDRING, A. DIDIER, M. MORAVEK, A. FAGERLUND, S. BOCK, C. NIELSEN, M. CASTEEL, P. E. GRANUM, E. MÄRTLBAUER, 2010. Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* Nhe Enterotoxin Requires Specific Binding Order of Its Three Exoprotein Components. *Infection and Immunity* [online]. **78**(9), 3813-3821 [cit. 2022-02-04]. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi: 10.1128/IAI.00247-10

LIU, Y., J. DU, Q. LAI, R. ZENG, D. YE, J. XU a Z. SHAO, 2017. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **67**(8), 2499-2508 [cit. 2022-03-10]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi: 10.1099/ijsem.0.001821

LIU, Y., Q. LAI a Z. SHAO, 2018. Genome analysis-based reclassification of *Bacillus weihenstephanensis* as a later heterotypic synonym of *Bacillus mycooides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **68**(1), 106-112 [cit. 2021-11-20]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi: 10.1099/ijsem.0.002466

LOGAN, N. A. a P. DE VOS, 2009. Genus I. *Bacillus*. DE VOS, P., G. M. GARRITY, D. JONES, N. R. KRIEG, W. LUDWIG, F. A. RAINEY, K.-H. SCHLEIFER a W. WHITMAN. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume Three The Firmicutes. New York: Springer, s. 21-128. ISBN 978-0-387-68489-5.

LÜCKING, G., M. K. DOMMEL, S. SCHERER, A. FOUET a M. EHLING-SCHULZ, 2009. Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator



AbrB, but not by the virulence regulator PlcR. *Microbiology* [online]. **155**(3), 922-931 [cit. 2022-02-17]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi: 10.1099/mic.0.024125-0

LUND, T. a P. E. GRANUM, 1996. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **141**(2-3), 151-156 [cit. 2022-02-04]. ISSN 0378-1097. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08377.x

LUND, T., M.-L. DE BUYSER a P. E. GRANUM, 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology* [online]. **38**(2), 254-261 [cit. 2022-02-05]. ISSN 0950-382X. Dostupné z: doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02147.x

LUO, J.-C., H. LONG, J. ZHANG, Y. ZHAO a L. SUN, 2021. Characterization of a Deep Sea *Bacillus toyonensis* Isolate: Genomic and Pathogenic Features. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. **11** [cit. 2021-11-21]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi: 10.3389/fcimb.2021.629116

MARXEN, S., T. D. STARK, E. FRENZEL, A. RÜTSCHLE, G. LÜCKING, G. PÜRSTINGER, E. E. POHL, S. SCHERER, M. EHLING-SCHULZ a T. HOFMANN, 2015. Chemodiversity of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **407**(9), 2439-2453 [cit. 2022-01-31]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi: 10.1007/s00216-015-8511-y

MCINTYRE, L., K. BERNARD, D. BENIAC, J. L. ISAAC-RENTON a D. C. NASEBY, 2008. Identification of *Bacillus cereus* Group Species Associated with Food Poisoning Outbreaks in British Columbia, Canada. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **74**(23), 7451-7453 [cit. 2022-03-11]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi: 10.1128/AEM.01284-08

MEER, R. R., J. BAKER, F. W. BODYFELT a M. W. GRIFFITHS, 1991. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in Fluid Milk Products: A Review. *Journal of Food Protection* [online]. **54**(12), 969-979 [cit. 2022-03-20]. ISSN 0362-028X. Dostupné z: doi: 10.4315/0362-028X-54.12.969

MERCK, b. r. GLISA Duopath® Cereus Enterotoxins. In: *Merck* [online]. Merck [cit. 2022-04-13]. Dostupné z: <https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/search/104146?SearchTerm=104146&SelectedSearchResult=SFDocumentSearch&SearchContextPageletUUID=&SearchWithinResults=&SearchTermHistory=>

MIGNOT, T., M. MOCK, D. ROBICHON, A. LANDIER, D. LERECLUS a A. FOUET, 2001. The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology* [online]. **42**(5), 1189-1198 [cit. 2022-02-17]. ISSN 0950-382X. Dostupné z: doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02692.x

MILLER, R. A., J. JIAN, S. M. BENO, M. WIEDMANN, J. KOVAC a J. BJÖRKROTH, 2018. Intraclade Variability in Toxin Production and Cytotoxicity of *Bacillus cereus* Group Type Strains and Dairy-Associated Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **84**(6) [cit. 2022-04-13]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi: 10.1128/AEM.02479-17

MILLER, R. A., S. M. BENO, D. J. KENT, L. M. CARROLL, N. H. MARTIN, K. J. BOOR a J. KOVAC, 2016. *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *International Journal of*

*Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **66**(11), 4744-4753 [cit. 2021-11-14]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi: 10.1099/ijsem.0.001421

MINNAARD, J., M. HUMEN a P. F. PÉREZ, 2001. Effect of *Bacillus cereus* Exocellular Factors on Human Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Food Protection* [online]. **64**(10), 1535-1541 [cit. 2022-02-08]. ISSN 0362-028X. Dostupné z: doi: 10.4315/0362-028X-64.10.1535

MOAZAMIAN, E., N. BAHADOR, N. AZARPIRA a M. RASOULI, 2018. Anti-cancer Parasporin Toxins of New *Bacillus thuringiensis* Against Human Colon (HCT-116) and Blood (CCRF-CEM) Cancer Cell Lines. *Current Microbiology* [online]. **75**(8), 1090-1098 [cit. 2021-11-21]. ISSN 0343-8651. Dostupné z: doi: 10.1007/s00284-018-1479-z

MOIR, A., B. M. CORFE a J. BEHRAMAN, 2002. Spore germination. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* [online]. **59**(3), 403-409 [cit. 2021-11-22]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi: 10.1007/s00018-002-8432-8

MUKHERJEE, D. V., J. H. TONRY, K. S. KIM, N. RAMARAO, T. G. POPOVA, C. BAILEY, S. POPOV, M.-C. CHUNG a R. AZIZ, 2011. *Bacillus anthracis* Protease InhA Increases Blood-Brain Barrier Permeability and Contributes to Cerebral Hemorrhages. *PLoS ONE* [online]. **6**(3) [cit. 2022-04-05]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.pone.0017921

MURRAY, D. L., C. A. KAPKE, J. F. EVERMANN a T. K. FULLER, 1999. Infectious disease and the conservation of free-ranging large carnivores. *Animal Conservation* [online]. **2**(4), 241-254 [cit. 2021-11-22]. ISSN 1367-9430. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1469-1795.1999.tb00070.x

NAKAMURA, L. K. a M. A. JACKSON, 1995. Clarification of the Taxonomy of *Bacillus mycoides*. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. **45**(1), 46-49 [cit. 2021-11-21]. ISSN 0020-7713. Dostupné z: doi: 10.1099/00207713-45-1-46

NAKAMURA, L. K., 1998. *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. **48**(3), 1031-1035 [cit. 2021-11-14]. ISSN 0020-7713. Dostupné z: doi: 10.1099/00207713-48-3-1031

NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) 2015/2283 ze dne 25. listopadu 2015 o nových potravinách, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 a o zrušení nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 258/97 a nařízení Komise (ES) č. 1852/2001. Dostupné z: <http://data.europa.eu/eli/reg/2015/2283/2021-03-27>

NATRAH, F. M. I., T. DEFOIRDT, P. SORGELOOS a P. BOSSIER, 2011. Disruption of Bacterial Cell-to-Cell Communication by Marine Organisms and its Relevance to Aquaculture. *Marine Biotechnology* [online]. **13**(2), 109-126 [cit. 2022-02-16]. ISSN 1436-2228. Dostupné z: doi: 10.1007/s10126-010-9346-3

NGAMWONGSATIT, P., W. BUASRI, P. PIANARIYANON, C. PULSRIKARN, M. OHBA, A. ASSAVANIG a W. PANBANGRED, 2008. Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **121**(3), 352-356 [cit. 2022-02-13]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.013

OHBA, M. a K. AIZAWA, 1986. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. **47**(1), 12-20 [cit. 2021-11-21]. ISSN 00222011. Dostupné z: doi: 10.1016/0022-2011(86)90158-8

OHBA, M., E. MIZUKI a A. UEMORI, 2009. Parasporin, a New Anticancer Protein Group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research* [online]. **29**(1), 427-433 [cit. 2021-11-21]. ISSN 1791-7530. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19331182>

OROZOVA, P., I. SIRAKOV, D. A. AUSTIN a B. AUSTIN, 2017. Recovery of *Bacillus mycoides*, *B. pseudomycoides* and *Aeromonas hydrophila* from common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with gill disease. *Journal of Fish Diseases* [online]. **41**(1), 125-129 [cit. 2021-11-20]. ISSN 0140-7775. Dostupné z: doi: 10.1111/jfd.12686

OVERCAST, W. W. a K. ATMARAM, 1974. The role of *Bacillus cereus* in sweet curdling of fluid milk. *Journal of Milk and Food Technology* [online]. **37**(5), 233-236 [cit. 2022-03-20]. ISSN 0022-2747. Dostupné z: doi: 10.4315/0022-2747-37.5.233

PALMER, M., 2001. The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* [online]. **39**(11), 1681-1689 [cit. 2022-02-08]. ISSN 0041-0101. Dostupné z: doi: 10.1016/S0041-0101(01)00155-6

PARIHAR, H. S., 2014. *Bacillus cereus*. WEXLER, P., ed. *Encyclopedia of Toxicology*. Third Edition. USA: Academic Press, s. 353-354. ISBN 978-0-12-386455-0.

PARK, E., M. S. HUSSAIN, S. WEI, M. KWON a D.-H. OH, 2019. Genotypic and phenotypic characteristics of biofilm formation of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains. *Food Control* [online]. **96**, 527-534 [cit. 2022-02-20]. ISSN 0956-7135. Dostupné z: doi: 10.1016/j.foodcont.2018.10.008

PATEL, K. D., S. PURANI a S. S. INGLE, 2013. Distribution and diversity analysis of *Bacillus thuringiensis* cry genes in different soil types and geographical regions of India. *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. **112**(2), 116-121 [cit. 2021-11-21]. ISSN 0022-2011. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jip.2012.10.008

PEI, X., S. YANG, L. ZHAN, J. ZHU, X. SONG, X. HU, G. LIU, G. MA, N. LI a D. YANG, 2018. Prevalence of *Bacillus cereus* in powdered infant and powdered follow-up formula in China. *Food Control* [online]. **93**, 101-105 [cit. 2022-03-15]. ISSN 0956-7135. Dostupné z: doi: 10.1016/j.foodcont.2018.05.049

PERCHAT, S., T. DUBOIS, S. ZOUHIR, M. GOMINET, S. PONCET, C. LEMY, M. AUMONT-NICAISE, J. DEUTSCHER, M. GOHAR, S. NESSLER a D. LERECLUS, 2011. A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Molecular Microbiology* [online]. **82**(3), 619-633 [cit. 2022-02-17]. ISSN 0950-382X. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07839.x

PILLAI, S. K., E. HUANG, J. T. GUARNIZO, J. D. HOYLE, S. KATHARIOS-LANWERMEYER, T. K. TURSKI, W. A. BOWER, K. A. HENDRICKS a D. MEANEY-DELMAN, 2015. Antimicrobial Treatment for Systemic Anthrax: Analysis of Cases from 1945 to 2014 Identified Through a Systematic Literature Review. *Health Security* [online]. **13**(6), 355-364 [cit. 2022-03-22]. ISSN 2326-5094. Dostupné z: doi: 10.1089/hs.2015.0033

PLOTKIN, S. A., P. S. BRACHMAN, M. UTELL, F. H. BUMFORD a M. M. ATCHISON, 1960. An epidemic of inhalation anthrax, the first in the twentieth century. *The American Journal of Medicine* [online]. **29**(6), 992-1001 [cit. 2021-11-21]. ISSN 0002-9343. Dostupné z: doi: 10.1016/0002-9343(60)90079-6

PROROGA, Y. T. R., F. CAPUANO, S. CASTELLANO, A. GIORDANO, A. MANCUSI, E. DELIBATO, S. DUMONTET a V. PASQUALE, 2019. OCCURRENCE AND TOXIN GENE PROFILE OF BACILLUS CEREUS IN DAIRY PRODUCTS. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* [online]. **9**(1), 58-62 [cit. 2022-02-13]. ISSN 1338-5178. Dostupné z: doi: 10.15414/jmbfs.2019.9.1.58-62

PROVÁDĚCÍ NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2015/1399 ze dne 17. srpna 2015 o zamítnutí povolení přípravku *Bacillus toyonensis* (NCIMB 14858T) (dříve *Bacillus cereus* var. *toyoi* NCIMB 40112/CNCM I-1012) jako doplňkové látky pro výkrm skotu, výkrm králíků, výkrm kuřat, selata (odstavená), výkrm prasat, prasnice určené k reprodukci a odchov telat, o zrušení povolení přípravku *Bacillus cereus* var. *toyoi* (NCIMB 40112/CNCM I-1012) jako doplňkové látky pro výkrm krůt a chovné králice, o změně nařízení (ES) č. 256/2002, (ES) č. 1453/2004, (ES) č. 255/2005 a (ES) č. 1200/2005 a o zrušení nařízení (ES) č. 166/2008, (ES) č. 378/2009 a prováděcího nařízení (EU) č. 288/2013. Dostupné z: [http://data.europa.eu/eli/reg\\_impl/2015/1399/oj](http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2015/1399/oj)

PROVÁDĚCÍ NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2017/2470 ze dne 20. prosince 2017, kterým se zřizuje seznam Unie pro nové potraviny v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283 o nových potravinách. Dostupné z: [http://data.europa.eu/eli/reg\\_impl/2017/2470/oj](http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2017/2470/oj)

PROVÁDĚCÍ NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2022/188 ze dne 10. února 2022, kterým se povoluje uvedení zmrazených, sušených a práškových forem *Acheta domesticus* na trh jako nové potraviny podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283 a kterým se mění prováděcí nařízení Komise (EU) 2017/2470. Dostupné z: [http://data.europa.eu/eli/reg\\_impl/2022/188/oj](http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2022/188/oj)

PRÜß, B. M., R. DIETRICH, B. NIBLER, E. MÄRTLBAUER a S. SCHERER, 1999. The Hemolytic Enterotoxin HBL Is Broadly Distributed among Species of the *Bacillus cereus* Group. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **65**(12), 5436-5442 [cit. 2022-03-11]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi: 10.1128/AEM.65.12.5436-5442.1999

QI, J., D. AIUCHI, M. TANI, S. ASANO a M. KOIKE, 2016. Potential of Entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* as Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Biological Control Agents for Tomato *Fusarium* Wilt. *International Journal of Environmental and Agriculture Research* [online]. **2**(6), 55-63 [cit. 2021-11-21]. ISSN 2454-1850. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/304629085\\_Potential\\_of\\_Entomopathogenic\\_Bacillus\\_thuringiensis\\_as\\_Plant\\_Growth\\_Promoting\\_Rhizobacteria\\_and\\_Biological\\_Control\\_Agents\\_for\\_Tomato\\_Fusarium\\_Wilt](https://www.researchgate.net/publication/304629085_Potential_of_Entomopathogenic_Bacillus_thuringiensis_as_Plant_Growth_Promoting_Rhizobacteria_and_Biological_Control_Agents_for_Tomato_Fusarium_Wilt)

QUINTILIANI, R. a R. QUINTILIANI, 2003. Inhalational anthrax and bioterrorism. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* [online]. **9**(3), 221-226 [cit. 2021-11-22]. ISSN 1070-5287. Dostupné z: doi: 10.1097/00063198-200305000-00011

RAAFAT, M., M. ALI-TAMMAM a A. ALI, 2019. Quorum quenching activity of *Bacillus cereus* isolate 30b confers antipathogenic effects in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Drug Resistance* [online]. **12**, 1583-1596 [cit. 2022-02-16]. ISSN 1178-6973. Dostupné z: doi: 10.2147/IDR.S182889

RADDADI, N., A. BELAOUIS, I. TAMAGNINI, B. M. HANSEN, N. B. HENDRIKSEN, A. BOUDABOUS, A. CHERIF a D. DAFFONCHIO, 2009. Characterization of polyvalent and safe *Bacillus thuringiensis* strains with potential use for biocontrol. *Journal of Basic Microbiology* [online]. **49**(3), 293-303 [cit. 2022-03-29]. ISSN 0233-111X. Dostupné z: doi: 10.1002/jobm.200800182

RAJESH, P. S. a V. R. RAI, 2015. Purification and antibiofilm activity of AHL-lactonase from endophytic *Enterobacter aerogenes* VT66. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **81**, 1046-1052 [cit. 2022-02-17]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.048

RAMARAO, N. a D. LERECLUS, 2005. The InhA1 metalloprotease allows spores of the *B. cereus* group to escape macrophages. *Cellular Microbiology* [online]. **7**(9), 1357-1364 [cit. 2022-02-13]. ISSN 1462-5814. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00562.x

RAMARAO, N. a D. LERECLUS, 2006. Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively. *Microbes and Infection* [online]. **8**(6), 1483-1491 [cit. 2022-03-23]. ISSN 1286-4579. Dostupné z: doi: 10.1016/j.micinf.2006.01.005

RAMARAO, N. a V. SANCHIS, 2013. The Pore-Forming Haemolysins of *Bacillus Cereus*: A Review. *Toxins* [online]. **5**(6), 1119-1139 [cit. 2022-02-06]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi: 10.3390/toxins5061119

RATHER, M. A., R. S. AULAKH, J. P. S. GILL a S. GHATAK, 2012. Enterotoxin Gene Profile and Antibiogram of *Bacillus cereus* Strains Isolated from Raw Meats and Meat Products. *Journal of Food Safety* [online]. **32**(1), 22-28 [cit. 2022-03-15]. ISSN 0149-6085. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1745-4565.2011.00340.x

REHMAN, Z. U. a T. LEIKNES, 2018. Quorum-Quenching Bacteria Isolated From Red Sea Sediments Reduce Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology* [online]. **9** [cit. 2022-02-16]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi: 10.3389/fmicb.2018.01354

RUSUL, G. a N. H. YAACOB, 1995. Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **25**(2), 131-139 [cit. 2022-03-10]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi: 10.1016/0168-1605(94)00086-L

RUTHERFORD, S. T. a B. L. BASSLER, 2012. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. **2**(11) [cit. 2022-02-16]. ISSN 2157-1422. Dostupné z: doi: 10.1101/cshperspect.a012427

RYAN, P. A., J. D. MACMILLAN a B. A. ZILINSKAS, 1997. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from

*Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* [online]. **179**(8), 2551-2556 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi: 10.1128/jb.179.8.2551-2556.1997

RYU, D.-H., S.-W. LEE, V. MIKOLAITYTE, Y.-W. KIM, H. Y. JEONG, S. J. LEE, C.-H. LEE a J.-K. LEE, 2020. Identification of a Second Type of AHL-lactonase from *Rhodococcus* sp. BH4, belonging to the  $\alpha/\beta$  Hydrolase Superfamily. *Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. **30**(6), 937-945 [cit. 2022-02-17]. ISSN 1017-7825. Dostupné z: doi: 10.4014/jmb.2001.01006

SALEH-LAKHA, S., C. G. LEON-VELARDE, S. CHEN, S. LEE, K. SHANNON, M. FABRI, G. DOWNING a B. KEOWN, 2017. A Study To Assess the Numbers and Prevalence of *Bacillus cereus* and Its Toxins in Pasteurized Fluid Milk. *Journal of Food Protection* [online]. **80**(7), 1085-1089 [cit. 2022-03-15]. ISSN 0362-028X. Dostupné z: doi: 10.4315/0362-028X.JFP-16-521

SAMAPUNDO, S., M. HEYNDRIX, R. XHAFERI a F. DEVLIEGHIERE, 2011. Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **150**(1), 34-41 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.013

SÁNCHEZ-CHICA, J., M. M. CORREA, A. E. ACEVES-DIEZ a L. M. CASTAÑEDA-SANDOVAL, 2021. Genetic and toxigenic diversity of *Bacillus cereus* group isolated from powdered foods. *Journal of Food Science and Technology* [online]. **58**(5), 1892-1899 [cit. 2022-03-10]. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi: 10.1007/s13197-020-04700-2

SAVRANSKY, V., B. IONIN a J. REECE, 2020. Current Status and Trends in Prophylaxis and Management of Anthrax Disease. *Pathogens* [online]. **9**(5) [cit. 2022-03-22]. ISSN 2076-0817. Dostupné z: doi: 10.3390/pathogens9050370

SENESE, S. a E. GHELARDI, 2010. Production, Secretion and Biological Activity of *Bacillus cereus* Enterotoxins. *Toxins* [online]. **2**(7), 1690-1703 [cit. 2022-03-23]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi: 10.3390/toxins2071690

SENESE, S., S. SALVETTI, F. CELANDRONI a E. GHELARDI, 2010. Features of *Bacillus cereus* swarm cells. *Research in Microbiology* [online]. **161**(9), 743-749 [cit. 2022-01-30]. ISSN 0923-2508. Dostupné z: doi: 10.1016/j.resmic.2010.10.007

SETLOW, P., 2003. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology* [online]. **6**(6), 550-556 [cit. 2021-11-17]. ISSN 1369-5274. Dostupné z: doi: 10.1016/j.mib.2003.10.001

SETLOW, P., 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **101**(3), 514-525 [cit. 2021-11-17]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x

SHANNON, J. G., C. L. ROSS, T. M. KOEHLER a R. F. REST, 2003. Characterization of Anthrolysin O, the *Bacillus anthracis* Cholesterol-Dependent Cytolysin. *Infection and Immunity* [online]. **71**(6), 3183-3189 [cit. 2022-02-08]. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi: 10.1128/IAI.71.6.3183-3189.2003

SHINAGAWA, K., J. SUGIYAMA, T. TERADA, N. MATSUSAKA a S. SUGII, 1991. Improved methods for purification of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology*

*Letters* [online]. **80**(1), 1-6 [cit. 2022-02-13]. ISSN 0378-1097. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1574-6968.1991.tb04626.x

SCHOENI, J. L. a A. C. LEE WONG, 1999. Heterogeneity observed in the components of hemolysin BL, an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **53**(2-3), 159-167 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi: 10.1016/S0168-1605(99)00158-0

SCHWENK, V., J. RIEGG, M. LACROIX, E. MÄRTLBAUER a N. JESSBERGER, 2020. Enteropathogenic Potential of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Soil, Animals, Food and Biopesticides. *Foods* [online]. **9**(10) [cit. 2021-11-21]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi: 10.3390/foods9101484

SLAMTI, L. a D. LERECLUS, 2002. A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *The EMBO Journal* [online]. **21**(17), 4550-4559 [cit. 2022-02-17]. ISSN 1460-2075. Dostupné z: doi: 10.1093/emboj/cdf450

STANĚK, L., 2013. Polymerázová řetězová reakce: princip metody a využití v molekulární patologii. *Česko-slovenská patologie a Soudní lékařství* [online]. **49-58**(3), 119-121 [cit. 2022-03-18]. ISSN 1805-4498. Dostupné z: <https://www.medvik.cz/link/bmc13027118>

STARK, T., S. MARXEN, A. RÜTSCHLE, G. LÜCKING, S. SCHERER, M. EHLING-SCHULZ a T. HOFMANN, 2013. Mass spectrometric profiling of *Bacillus cereus* strains and quantitation of the emetic toxin cereulide by means of stable isotope dilution analysis and HEp-2 bioassay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **405**(1), 191-201 [cit. 2022-01-31]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi: 10.1007/s00216-012-6485-6

STAROSTIN, K. V., E. A. DEMIDOV, A. V. BRYANSKAYA, V. M. EFIMOV, A. S. ROZANOV a S. E. PELTEK, 2015. Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach. *Scientific Reports* [online]. **5**(1) [cit. 2022-03-29]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi: 10.1038/srep16989

STERNBACH, G., 2003. The history of anthrax. *The Journal of Emergency Medicine* [online]. **24**(4), 463-467 [cit. 2022-03-12]. ISSN 0736-4679. Dostupné z: doi: 10.1016/S0736-4679(03)00079-9

SWIECICKA, I., 2008. Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in eukaryotic organisms: a case for symbiosis. *Biocontrol Science and Technology* [online]. **18**(3), 221-239 [cit. 2021-11-22]. ISSN 0958-3157. Dostupné z: doi: 10.1080/09583150801942334

TAUVERON, G., C. SLOMIANNY, C. HENRY a C. FAILLE, 2006. Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **110**(3), 254-262 [cit. 2022-03-11]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.027

TESSIER, J., 2017. Anthrax and Microbiology of *B. anthracis*. *Infectious Disease Advisor* [online]. Haymarket Media [cit. 2022-03-22]. Dostupné z: <https://www.infectiousdiseaseadvisor.com/home/decision-support-in-medicine/infectious-diseases/anthrax-and-microbiology-of-b-anthraxis/>

TEWARI, A., S. P. SINGH a R. SINGH, 2015. Incidence and enterotoxigenic profile of *Bacillus cereus* in meat and meat products of Uttarakhand, India. *Journal of Food Science and Technology* [online]. **52**(3), 1796-1801 [cit. 2022-03-15]. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi: 10.1007/s13197-013-1162-0

THERMOFISHER SCIENTIFIC, b. r. BCET-RPLA TOXIN DETECTION KIT. *ThermoFisher Scientific* [online]. Oxoid Limited [cit. 2022-04-13]. Dostupné z: [http://www.oxoid.com/uk/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=TD0950&org=9&c=uk&lang=EN](http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=TD0950&org=9&c=uk&lang=EN)

THOMAS, D. J. I., J. A. W. MORGAN, J. M. WHIPPS a J. R. SAUNDERS, 2000. Plasmid Transfer between the *Bacillus thuringiensis* Subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in Laboratory Culture and Soil and in Lepidopteran and Coleopteran Larvae. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **66**(1), 118-124 [cit. 2022-04-13]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi: 10.1128/AEM.66.1.118-124.2000

TRAN, S.-L., D. CORMONTAGNE, J. VIDIC, G. ANDRÉ-LEROUX a N. RAMARAO, 2020. Structural Modeling of Cell Wall Peptidase CwpFM (EntFM) Reveals Distinct Intrinsically Disordered Extensions Specific to Pathogenic *Bacillus cereus* Strains. *Toxins* [online]. **12**(9) [cit. 2022-02-13]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi: 10.3390/toxins12090593

TRAN, S.-L., E. GUILLEMET, M. GOHAR, D. LERECLUS a N. RAMARAO, 2010. CwpFM (EntFM) Is a *Bacillus cereus* Potential Cell Wall Peptidase Implicated in Adhesion, Biofilm Formation, and Virulence. *Journal of Bacteriology* [online]. **192**(10), 2638-2642 [cit. 2022-02-13]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi: 10.1128/JB.01315-09

TRAN, S.-L., E. GUILLEMET, M. NGO-CAMUS, C. CLYBOUW, A. PUHAR, A. MORIS, M. GOHAR, D. LERECLUS, N. RAMARAO, 2011. Haemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages. *Cellular Microbiology* [online]. **13**(1), 92-108 [cit. 2022-02-06]. ISSN 1462-5814. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01522.x

URBINA, P., M. FLORES-DÍAZ, A. ALAPE-GIRÓN, A. ALONSO a F. M. GONI, 2009. Phospholipase C and sphingomyelinase activities of the *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -toxin. *Chemistry and Physics of Lipids* [online]. **159**(1), 51-57 [cit. 2022-04-13]. ISSN 0009-3084. Dostupné z: doi: 10.1016/j.chemphyslip.2009.02.007

VANDEWEYER, D., B. LIEVENS a L. VAN CAMPENHOUT, 2020. Identification of bacterial endospores and targeted detection of foodborne viruses in industrially reared insects for food. *Nature Food* [online]. **1**(8), 511-516 [cit. 2022-03-17]. ISSN 2662-1355. Dostupné z: doi: 10.1038/s43016-020-0120-z

VANGOITSENHOVEN, R., M. MARIS, L. OVERBERGH, J. VAN LOCO, C. MATHIEU a B. VAN DER SCHUEREN, 2015. Cereulide food toxin, beta cell function and diabetes: Facts and hypotheses. *Diabetes Research and Clinical Practice* [online]. **109**(1), 1-5 [cit. 2022-02-01]. ISSN 0168-8227. Dostupné z: doi: 10.1016/j.diabres.2015.04.029

WANG, W.-Z., T. MOROHOSHI, N. SOMEYA a T. IKEDA, 2012. Diversity and Distribution of N-Acylhomoserine Lactone (AHL)-Degrading Activity and AHL-Lactonase (AiiM) in Genus *Microbacterium*. *Microbes and Environments* [online]. **27**(3), 330-333 [cit. 2022-02-17]. ISSN 1342-6311. Dostupné z: doi: 10.1264/jsme2.ME11341



WATERS, D. L. E. a F. M. SHAPTER, 2014. The Polymerase Chain Reaction (PCR): General methods: General Methods. HENRY, R. a A. FURTADO, ed. *Cereal Genomics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* [online]. **1099**. Totowa, NJ: Humana Press, s. 65-75 [cit. 2022-03-18]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-62703-714-3. Dostupné z: doi: 10.1007/978-1-62703-715-0\_7

YENGEJEH, R. J., V. POURJAFARIAN, A. AFROUS, A. GHOLAMI, P. MAKTABI a R. SHARIFI, 2017. Studying *Bacillus cereus*'s ability to biodegrade crude oil in hot areas. *Petroleum Science and Technology* [online]. **35**(3), 287-291 [cit. 2021-11-22]. ISSN 1091-6466. Dostupné z: doi: 10.1080/10916466.2014.941068

YI, Y., A. DE JONG, E. FRENZEL a O. P. KUIPERS, 2017. Comparative Transcriptomics of *Bacillus mycoides* Strains in Response to Potato-Root Exudates Reveals Different Genetic Adaptation of Endophytic and Soil Isolates. *Frontiers in Microbiology* [online]. **8** [cit. 2021-11-20]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi: 10.3389/fmicb.2017.01487



## 9 Samostatné přílohy

Příloha č. 1 – Seznam použitých kmenů

Původ	Označení kmene	Druh	Patotypová skupina
Jedlý hmyz	2-1 bac	<i>B. cereus</i>	6
	5-1 bac	<i>B. cereus</i>	6
	6-1 bac	<i>B. cereus</i>	6
	7-1 bac	<i>B. cereus</i>	6
	1-1 bc	<i>B. cereus</i>	6
	1-2 bc	<i>B. cereus</i>	6
	4 bc	<i>B. cereus/mycooides</i>	6
	6 bc	<i>B. cereus</i>	6
	6-2 bc	<i>B. cereus</i>	12
	7-1 bc	<i>B. cereus</i>	18
	7-2 bc	<i>B. cereus</i>	6
	8-1 bac	<i>B. cereus</i>	2
	9-1 bac	<i>B. cereus</i>	6
	14-1 bac	<i>B. cereus</i>	6
	14-2 bac	<i>B. cereus</i>	6
	8 bc	<i>B. cereus</i>	2
	11 bc	<i>B. cereus</i>	6
	12 bc	<i>B. cereus</i>	6
	14 bc	<i>B. cereus</i>	6
	8a	<i>B. cereus</i>	6
	8b	<i>B. cereus</i>	2
	10a	<i>B. cereus</i>	6
	10b	<i>B. cereus</i>	6
	10c	<i>B. cereus</i>	6
	11a	<i>B. cereus</i>	6
	11b	<i>B. cereus</i>	6
	14a	<i>B. cereus</i>	6
	14b	<i>B.cereus</i>	6
	8a O <sub>2</sub>	<i>B.cereus</i>	2
	10b O <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	9
	10c O <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	6
	11a O <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	6
	11b O <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	6
12a O <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	6	
12b O <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	6	
12c O <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	6	
13a O <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	6	
13b O <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	6	
14a O <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	2	
14c O <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	6	
Krmivo pro psy	9CP	<i>B. thuringiensis</i>	8
	9CPO2	<i>B. cereus</i>	8
	10CP	<i>B. cereus</i>	8

Původ	Označení kmene	Druh	Patotypová skupina
Krmivo pro psy	10CPO2	<i>B. cereus</i>	8
	6CP	<i>B. cereus</i>	8
	1CP	<i>B. cereus</i>	8
	1CPO <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	8
	2CP	<i>B. cereus</i>	8
	2CPO <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	8
	3CP	<i>B. cereus</i>	8
	3CPO <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	8
	4CP	<i>B. cereus</i>	8
	4CPO <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	8
	5CP	<i>B. cereus</i>	8
	5CPO2	<i>B. cereus</i>	8
	6CPO2	<i>B. cereus</i>	8
	11CP	<i>B. cereus</i>	8
	12CP	<i>B. cereus</i>	8
12CPO2	<i>B. cereus</i>	8	
Ostatní	A72b HEM	<i>B. cereus</i>	8
	A119K	<i>B. cereus</i>	2
	D39	<i>B. cereus</i>	2
	PBR/6	<i>B. cereus</i>	2
	SeBa 1/3	<i>B. mycoides</i>	15
	11VB	<i>B. cereus</i>	4
	11KRYSTAL	<i>B. cereus</i>	7
	BC1/3 B1	<i>B. thuringiensis</i>	6
	BC1/3 A1	<i>B. cereus</i>	8
	BC1/3 A2	<i>B. cereus</i>	8
Ostatní potraviny	2/2D	<i>B. cereus</i>	8
	1vz M1	<i>B. cereus</i>	13
	MEDP1/1	<i>B. cereus</i>	6
	RM1_1	<i>B. mycoides/ thuringiensis</i>	5
	RM1_2	<i>B. mycoides/ thuringiensis</i>	5
Škeble asijská	TSB 4/4	<i>B. pseudomycoides</i>	19
	S2	<i>B. cereus</i>	8
	S6	<i>B. cereus/mycoides</i>	19
	AN 2/6	<i>B. thuringiensis</i>	8
	AN 3/5	<i>B. weihenstephanensis</i>	8
	AN 4/8	<i>B. cereus/mycoides</i>	17
	2C	<i>B. cereus</i>	1
	BMS 4/3	<i>B. mycoides</i>	8
	BMS 4/2 - 1	<i>B. mycoides</i>	8
	BMS 4/2 - 3	<i>B. weihenstephanensis</i>	8
	BMS 2/2 - 2	<i>B. cereus/mycoides</i>	19
	BMS 2/2 - 1	<i>B. cereus/mycoides</i>	19
	BMS 3/2	<i>B. mycoides</i>	8
	BMS 1/3	<i>B. cereus/mycoides</i>	14
BMS 1/2-1	<i>B. cereus/mycoides</i>	19	

Původ	Označení kmene	Druh	Patotypová skupina
Škeble asijská	BMS 1/2-2	<i>B. cereus</i>	16
	TSB 6/3	<i>B. cereus</i>	8
	WSP 6/1	<i>B. cereus</i>	8
	WSP 6/2	<i>B. cereus</i>	8
	WSP 7/4	<i>B. cereus</i>	8
Výrobky z jedlého hmyzu	CS16	<i>B. cereus</i>	3
	CS6	<i>B. cereus</i>	2
	CS7	<i>B. cereus</i>	2
	CS8	<i>B. cereus</i>	11
	CS17	<i>B. cereus</i>	6
	CS21	<i>B. cereus</i>	6
	CS22	<i>B. cereus</i>	6
	CS23	<i>B. cereus</i>	10
	CS2	<i>B. cereus</i>	5
	CS3	<i>B. cereus</i>	2
	CS5	<i>B. cereus</i>	11