

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Aerobní sporulující bakterie v potravinách**

**Diplomová práce**

**Bc. Andrea Wagnerová**

**Výživa a potraviny**

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

© 2020 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Aerobní sporulující bakterie v potravinách" 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 13.7.2020

\_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Haně Šubrtové Salmonové, Ph.D. za vstřícnost při konzultacích, odborné vedení a cenné rady při psaní této práce. Velký dík za podporu během celého studia patří také mé rodině a přátelům.

# Aerobní sporulující bakterie v potravinách

## Souhrn

Aerobní sporulující bakterie jsou v životním prostředí téměř všudypřítomné, a mají tak mnoho příležitostí kontaminovat potraviny. Tyto bakterie produkují extracelulární enzymy, jejichž působením dochází ke kažení potravin; některé také mohou produkovat toxiny způsobující otravy jídlem. Díky značné odolnosti dokáží jejich spory přežít v potravině i během zpracování. Sledování výskytu těchto bakterií je proto nezbytné jak pro zachování kvality potravin, tak pro prevenci otrav způsobených potravinami.

Cílem práce bylo sledování výskytu aerobních sporulujících bakterií v potravinách rostlinného i živočišného původu. Testováno bylo celkem 24 vzorků potravin z masa, mléčných výrobků, koření, bylinných čajových směsí, kakaa, cereálních směsí a výrobků z ovoce a džusů. Pro stanovení aerobních sporulujících bakterií byla použita kultivační metoda pomocí trypton-sójového agaru (TSA); pro stanovení *Bacillus cereus* byla použita technika roztěru vzorku na *Bacillus cereus* agar base obohacený o polymyxin B a žloutkovou emulzi dle ISO 7932. Kultivace probíhala v obou případech aerobně při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Druhová identifikace byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS), u vybraných kmenů bylo také provedeno sekvenování genu pro 16S rRNA.

Kontaminace sporulujícími bakteriemi byla prokázána v 19 vzorcích, v žádném nebyl detekován *B. cereus*. Celkem bylo identifikováno 15 různých druhů a všechny náležely do rodu *Bacillus*. Na počet různých druhů bakterií bylo nejbohatší koření a bylinné čajové směsi. Žádný druh se nevyskytoval u všech zkoumaných skupin potravin. Nejčastějšími druhy byly *B. pumilus* (28,8 %), *B. subtilis* (24,7 %) a *B. licheniformis* (11,0 %). Ze všech izolátů patřilo 86,30 % do skupiny *B. subtilis*, 5,48 % do skupiny *B. cereus* a 8,22 % nebylo zařazeno do žádné z těchto dvou skupin. Vzhledem k tomu, že v testovaných vzorcích nebyl zjištěn žádný primárně patogenní druh, zdravotní riziko není pravděpodobné.

První část hypotézy byla potvrzena, neboť u testovaných vzorků potravin byla prokázána kontaminace aerobními sporulujícími bakteriemi. Druhá část hypotézy týkající se výskytu a druhového zastoupení bakterií v závislosti na typu potravin a způsobu konzervace nebyla potvrzena, neboť nebyl pozorován žádný trend.

**Klíčová slova:** sporulující bakterie, kažení potravin, alimentární onemocnění, pasterace, *Alicyclobacillus*, *Bacillus*

# Aerobic spore-forming bacteria in food

## Summary

Aerobic spore-forming bacteria are ubiquitous and worldwide distributed in the environment, hence they frequently contaminate food. These bacteria produce extracellular enzymes which cause food spoilage; some can also produce toxins resulting in food poisoning. Thanks to their high resistance, some spores can survive even when food is processed. Therefore, monitoring the occurrence of these bacteria is necessary for both food quality and food safety.

The aim of this work was to monitor the occurrence of aerobic spore-forming bacteria in foodstuffs of plant and animal origin. It was tested 24 samples, namely meat and dairy products, spices, herbal tea blends, cocoa, cereal blends, and fruit products and juices were tested. Aerobic spore-forming bacteria were determined by cultivation method using Tryptone Soya Agar (TSA); the presumptive *Bacillus cereus* were obtained by the spread plate technique using *Bacillus cereus* agar base supplemented with polymyxin B and yolk emulsion according to ISO 7932. In both cases, the cultivation was carried out aerobically at 30 °C for 24 hours. The identification of bacterial isolates was undertaken using Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS); selected strains were identified also by 16S rRNA gene sequence analysis.

Contamination by spore-forming bacteria was detected in 19 samples, none of them was *B. cereus* positive. A total of 15 different species were identified, all belonging to the genus *Bacillus*. Spices and herbal tea blends were contaminated by the largest number of different species. No species was present in all the examined groups of foodstuffs. The most common species were *B. pumilus* (28.8 %), *B. subtilis* (24.7 %) and *B. licheniformis* (11.0 %). Of all isolates tested, 86.30 % belonged to the *B. subtilis* group, 5.48 % to the *B. cereus* group and 8.22 % were not included in any of these groups. With regard to the fact that no primarily pathogenic species was detected in the tested samples, a health risk is unlikely.

The first part of the hypothesis was confirmed, as the tested food samples showed contamination with aerobic spore-forming bacteria. The second part of the hypothesis concerning the occurrence and species representation of bacteria depending on the type of food and method of preservation was not confirmed as no trend was observed.

**Keywords:** spore-forming bacteria, food spoilage, alimentary diseases, pasteurization, *Alicyclobacillus*, *Bacillus*

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>10</b>
Aerobní sporulující bakterie .....	10
3.1.1    Obecná charakteristika aerobních sporulujících bakterií.....	10
3.1.2    Spory jako útvary rezistence .....	10
3.1.3    Tvorba biofilmů .....	12
3.1.4    Eliminace aerobních sporulujících bakterií v potravinách .....	14
3.1.5    Sporulující bakterie jako probiotika .....	15
<i>Bacillus</i> spp.....	16
3.1.6    Obecná charakteristika rodu <i>Bacillus</i> .....	16
3.1.7    Skupina <i>Bacillus cereus</i> .....	18
3.1.7.1 <i>Bacillus cereus</i> .....	19
3.1.8    Skupina <i>Bacillus subtilis</i> .....	21
3.1.9    Výskyt zástupců rodu <i>Bacillus</i> v potravinách.....	22
3.1.9.1    Výskyt v mléce a mléčných výrobcích.....	22
3.1.9.2    Výskyt v dalších chlazených potravinách .....	23
3.1.9.3    Výskyt v chlebu a dalších pekárenských produktech.....	23
3.1.9.4    Výskyt v sušených potravinách.....	23
<i>Alicyclobacillus</i> spp. ....	25
3.1.10    Obecná charakteristika rodu <i>Alicyclobacillus</i> .....	25
3.1.11 <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> .....	26
Další aerobní sporulující bakterie .....	27
3.1.12 <i>Paenibacillus</i> spp. ....	27
3.1.13 <i>Brevibacillus</i> spp. ....	28
3.1.14 <i>Lysinibacillus</i> spp. ....	29
3.1.15 <i>Halobacillus</i> spp.....	29
3.1.16 <i>Sporolactobacillus</i> spp. ....	29
3.1.17 <i>Anoxybacillus</i> spp.....	30
3.1.18 <i>Geobacillus</i> spp. ....	30
Metody stanovení a identifikace .....	32
3.1.19    Klasické kultivační metody .....	32
3.1.20    Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS) .....	34
3.1.21    Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	36
3.1.22    Pulzní gelová elektroforéza .....	37

<b>4 Metodika .....</b>	<b>39</b>
Materiál .....	39
Metody .....	40
4.1.1 Mikrobiologický rozbor .....	40
4.1.2 Izolace čistých kultur .....	40
4.1.3 Identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MŠ) .....	40
4.1.4 Identifikace pomocí sekvenování genu pro 16S rRNA.....	41
4.1.4.1 Příprava buněčného lyzátu pro PCR .....	41
4.1.4.2 Amplifikace genu pro 16S rRNA .....	41
4.1.4.3 Gelová elektroforéza .....	42
4.1.4.4 Purifikace vzorků vybraných pro identifikaci sekvenováním .....	42
4.1.4.5 Sangerovo sekvenování 16S rDNA .....	43
4.1.5 Statistické vyhodnocení.....	43
<b>5 Výsledky .....</b>	<b>44</b>
<b>6 Diskuze .....</b>	<b>49</b>
<b>7 Závěr .....</b>	<b>53</b>
<b>8 Literatura.....</b>	<b>54</b>
<b>9 Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>64</b>
<b>10 Seznam obrázků, tabulek a grafů.....</b>	<b>65</b>

# 1 Úvod

Aerobní sporulující bakterie se taxonomicky řadí do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli* a řádu *Bacillales*. Mezi hlavní představitele řádu *Bacillales*, kteří způsobují kažení potravin, jsou obvykle zahrnovány rody *Bacillus*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Alicyclobacillus* a *Paenibacillus* (Maughan & Van der Auwera 2011; André et al. 2017). Jedná se o tyčinkovité bakterie se širokou oblastí výskytu (Heyndrickx 2011). Kromě kažení potravin mohou mít některé z těchto bakterií též patogenní vlastnosti; nejznámější patogenní zástupci jsou *Bacillus anthracis* a *Bacillus cereus*. Druhý jmenovaný je příčinou gastrointestinálních onemocnění projevujících se průjmem či zvracením. Jeho nepříznivé účinky jsou způsobeny zejména produkcí enterotoxinů a emetického toxinu (Talebi et al. 2018).

Z důvodu značné odolnosti spor těchto bakterií vůči teplu, záření, dezinfekčním prostředkům či vysušení je velmi obtížné je odstranit a stávají se tak častou příčinou kontaminace. Výskyt endospor v nezpracovaných potravinách je relativně běžný (Heyndrickx 2011). Pokud endospory nejsou zcela zničeny při konzervaci a následně vyklíčí ve vegetativní buňky, mohou svou produkcí enzymů způsobovat kažení potravin (Checinska et al. 2015). Kvalita výchozí suroviny a hygienické podmínky při zpracování mají zásadní význam pro snížení rizika výskytu spor ve finálním výrobku (Steyn et al. 2011). Výzkum zaměřený na fyziologické, biochemické a genetické vlastnosti těchto bakterií je zásadní pro pochopení jejich mechanismů rezistence k nepříznivým podmínkám. Velký přínos může také přinést vývoj účinnějších způsobů sterilace a detekce sporulujících bakterií (Checinska et al. 2015).

Na druhou stranu mají aerobní sporulující bakterie díky schopnosti produkovat širokou škálu enzymů, antibiotik a jiných metabolitů často využití v lékařských, farmaceutických, zemědělských a potravinářských procesech. Jejich prospěšný vliv na zdraví lze demonstrovat například při jejich užití jako probiotika (Bader et al. 2012). Z druhů rodu *Bacillus* a *Paenibacillus* se také získávají antibiotika, mezi nejznámější patří bacitracin, polymyxin B a polymyxin E (kolistin) (Ciesiołka et al. 2014; Yu et al. 2018). Některé druhy produkují nutraceutika, jako jsou vitaminy (např. riboflavin, kobalamin), inositol nebo karotenoidy, a mohou tedy být používány pro výrobu doplňků zdravé výživy (Celandroni et al. 2019).



## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: U testovaných druhů potravin bude prokázána kontaminace aerobními sporulujícími bakteriemi. Výskyt a druhové zastoupení bude závislé na typu potraviny a způsobu konzervace.

Cílem diplomové práce byl monitoring výskytu aerobních sporulujících bakterií v různých potravinách, jejich druhová identifikace a zhodnocení možného vlivu na lidské zdraví.

## 3 Literární rešerše

### Aerobní sporulující bakterie

#### 3.1.1 Obecná charakteristika aerobních sporulujících bakterií

Aerobní sporulující bakterie se řadí do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli* a řádu *Bacillales*. Mezi představitele řádu *Bacillales*, kteří kazí potraviny, jsou zpravidla řazeny rody *Bacillus*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Alicyclobacillus* a *Paenibacillus* (Maughan & Van der Auwera 2011; André et al. 2017). Tyto aerobní nebo fakultativně anaerobní grampozitivní bakterie obývají rozmanitá prostředí (Heyndrickx 2011) a jejich typickou vlastností je schopnost tvořit endospory v reakci na nepříznivé podmínky. Původně prakticky všechny aerobní sporulující bakterie spadaly taxonomicky pod rod *Bacillus*, s pokrokem v oblasti molekulární biologie však došlo k jejich reklasifikaci na základě sekvenace genů pro 16S rRNA a rozdělení do nových samostatných rodů (Checinska et al. 2015).

Bacily a jim příbuzné bakterie se vyskytují ve formě spor, vegetativních buněk nebo biofilmů. Zkoumání mechanismů odolnosti vůči nepříznivým vlivům prostředí u všech těchto tří forem je významné pro následný vývoj nových způsobů předcházení jejich škodlivým účinkům (Checinska et al. 2015).

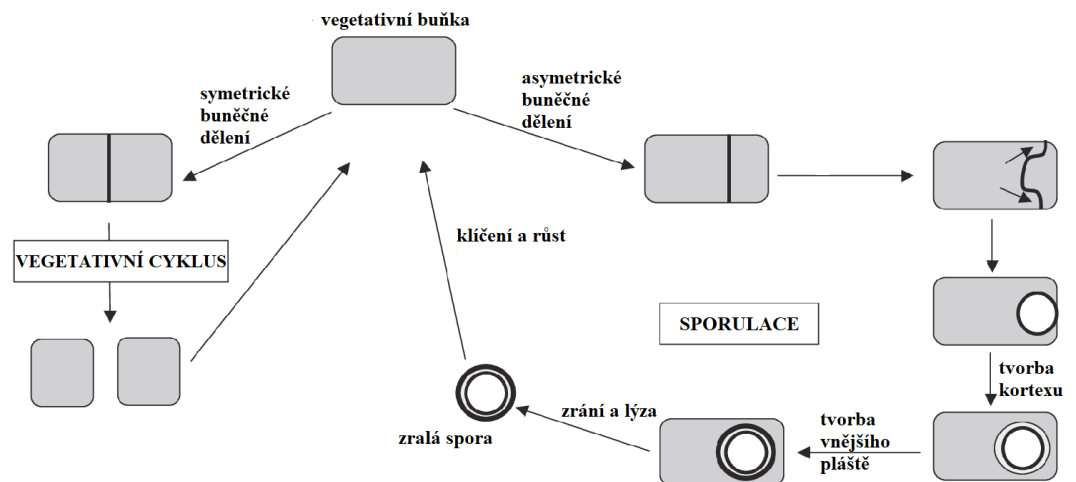
#### 3.1.2 Spory jako útvary rezistence

Spora je z hlediska aktivity metabolismu klidové stádium bakterie. Vyznačuje se, ve srovnání s vegetativní buňkou, zvýšenou odolností vůči vysokým teplotám, vysušení, nedostatku živin, záření, toxickým organickým prostředkům, oxidačním činidlům a hydrolytickým enzymům. Spory tak jsou schopné přežít podmínky, které by pro vegetativní mateřskou buňku byly letální. Bývají tvořeny v reakci na vysokou hustotu buněk nebo nedostatek živin, zejména uhlíku a dusíku. Vzhledem k všudypřítomnosti spor v prostředí je jejich výskyt v potravinách poměrně běžný. Pokud endospory nejsou zničeny v průběhu konzervace potravin, mohou následně vyklíčit a vegetativní buňky produkcí enzymů způsobují kažení potravin (Checinska et al. 2015).

Významnou vlastností spor je schopnost adherovat na zařízení ve výrobě. Bylo zjištěno, že spory některých druhů rodu *Bacillus* se silnými hydrofobními vlastnostmi mají vyšší schopnost adheze (Noma et al. 2018). Při zpracování tak může dojít

ke kontaminaci původně sterilního produktu (Shaheen et al. 2010). Některé spory si rovněž vyvinuly nové mechanismy rezistence vůči běžně používaným sterilizačním technikám. Z tohoto důvodu není sanitace účinná pro všechny sporulující bakterie stejně (Checinska et al. 2015), navíc účinek sterilace může být snížen tím, že nedojde k úplnému odstranění biofilmů z povrchů při zpracování potravin (Heyndrickx 2011). Obecně se předpokládá, že spory termofilních bakterií jsou více odolné vůči teple než spory bakterií mezofilních, které jsou zase tepelně odolnější oproti sporám psychrotrofních bakterií (Sadiq et al. 2018).

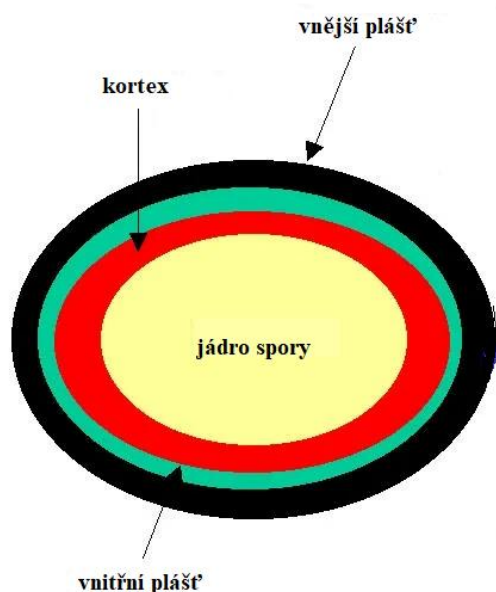
Sporulace, tedy proces tvorby endospor, trvá průměrně okolo 8 hodin a je rozdělena do několika částí (Checinska et al. 2015). Na rozdíl od binárního dělení při vegetativním cyklu spočívá sporulace v organizovaných morfologických změnách (Cutting et al. 2009). Sporulace začíná tím, že vegetativní buňka přijme signál k zahájení syntézy faktoru transkripce, který řídí jednotlivé fáze sporulace. V návaznosti na tento signál je buňka asymetricky rozdělena septem, čímž vzniknou dva kompartmenty různé velikosti – menší, tzv. předspora, a větší mateřská buňka. Mateřská buňka pomáhá malé spoře vyžrát, a ta je v závěrečné části sporulace od mateřské buňky oddělena (Checinska et al. 2015). Proces sporulace je zobrazen na Obrázku 1.



**Obrázek 1:** Životní cyklus sporulující bakterie (upraveno podle Cutting et al. 2009)

Pokud nastanou příznivé podmínky, spory vyklíčí a je zahájen jejich růst do vegetativní formy (Checinska et al. 2015).

Základní části spory, tedy její jádro, kortex, vnitřní a vnější plášť, znázorňuje Obrázek 2.



**Obrázek 2:** Základní části spory (upraveno podle Ricca & Cutting 2003)

### 3.1.3 Tvorba biofilmů

Biofilmy jsou společenstva bakterií zabudovaných do matrice z extracelulárních polymerních látek, kterou samy produkují. Schopnost tvořit biofilm byla popsána u mnoha aerobních sporulujících bakterií, například u rodů *Bacillus* (Ostrov et al. 2019), *Alicyclobacillus* (Prado et al. 2018), *Paenibacillus* (Khan et al. 2011; Fünfhaus et al. 2018) či *Brevibacillus* (Azizbekyan et al. 2015). Významným druhem tvořícím biofilm je *Bacillus cereus*, který je jedním z nejzastoupenějších mikroorganismů ve zpracovaných potravinách mimo jiné právě díky schopnosti tvorby biofilmu, a je významným původcem alimentárních onemocnění (Heyndrickx 2011).

Tvorba biofilmu začíná adharencí volně žijících buněk na povrch pomocí slabých van der Waalsových a elektrostatických sil. Tato fáze je reverzibilní, protože buňky lze od povrchu poměrně snadno oddělit. V další fázi bakterie produkují extracelulární matrix a jejich odstranění již může být značně obtížné (Jindal & Anand 2018). Je třeba zmínit, že buňky v biofilmu bývají v různých fázích životního cyklu a svými fyziologickými vlastnostmi se značně liší od volně žijících (planktonních) buněk (Flemming et al. 2016).

Biofilmy bacilů a blízkce příbuzných organismů se vyznačují komplikovanou stavbou s charakteristickými vzdušnými strukturami obsahujícími spory. Extracelulární polymerní matrix biofilmů se skládá z exopolysacharidů, proteinů a nukleových kyselin. Poskytuje buňkám v ní zanořeným ochranu před mnoha nepříznivými vlivy, mezi které patří například antibiotika a jiné biocidní látky, rozpoznání imunitním systémem hostitele nebo predace (Checinska et al. 2015). Vzájemné interakce buněk vedoucí až v jejich spojení do struktury biofilmu je zprostředkováno amyloidními vlákny, která mají rovněž vliv na adhezi k povrchu (Romero et al. 2010). V neposlední řadě mají na adhezi vliv vlastnosti buněčného povrchu, kdy adheze klesá s jeho nižší hydrofobicitou a vyšším povrchovým nábojem (Jindal & Anand 2018).

Biofilmy se dynamicky mění, a jak již bylo zmíněno výše, jsou složeny z buněk v různých růstových fázích, čímž je zvýšena odolnost vůči antimikrobiálním látkám. Mechanismy rezistence k běžně užívaným antimikrobiálním látkám jsou navíc u biofilmů odlišné než u volných buněk. Změnám v prostředí se buňky biofilmu přizpůsobují například inhibicí penetrace antimikrobiálních látek, expresí genů pro stresovou reakci nebo tím, že přijímají geny rezistence od jiných mikroorganismů. S tím souvisí skutečnost, že vícedruhové biofilmy bývají odolnější než jednodruhové (Checinska et al. 2015). Dynamicky se měnící struktura navíc biofilmu umožňuje účinnější příjem živin, díky čemuž je pro biofilmy snazší přežít nepříznivé podmínky (Branda et al. 2006).

Sporulující bakterie se mohou vzájemně lišit mírou adheze k povrchům. Například Jindal & Anand (2018) ve své studii zkoumali adhezi na nemodifikované a modifikované povrchy z nerezové oceli. Nejvyšší tendenci k adhezi zjistili u vysoce tepelně odolných bakterií *Bacillus sporothermodurans* a *Geobacillus stearothermophilus*, naproti tomu *Bacillus licheniformis* projevil jen minimální adhezi. Jejich výsledky také naznačují vyšší tendenci k adhezi u spor oproti vegetativním buňkám.

Je třeba také zdůraznit, že při nevhodně zvoleném používání antimikrobiálních látek v provozu mohou být poškozovány povrchy výrobních zařízení, čímž je usnadněna adheze vegetativních buněk a rozvoj biofilmu (Checinska et al. 2015). Poškození povrchů způsobuje i samotná přítomnost biofilmu, a to v důsledku metabolické aktivity mikroorganismů přítomných v biofilmu. Tímto dochází například ke korozi kovových zařízení (Gupta & Anand 2018).

Předcházení vzniku biofilmů je vhodné věnovat dostatečnou pozornost, neboť často přinášejí obrovské ekonomické ztráty způsobené kažením potravin i potenciálním

onemocněním z potravin. Bakterie oddělené od biofilmů totiž mohou ve výrobě kontaminovat produkty (Jindal & Anand 2018).

### 3.1.4 Eliminace aerobních sporulujících bakterií v potravinách

Pasterizace a sterilace jsou v boji se sporulujícími bakteriemi účinné jen v omezené míře. Například Grutsch et al. (2018) poukázali na to, že tepelné zpracování může dokonce podněcovat tyto mikroorganismy ke klíčení. Pro zajištění bezpečnosti a kvality produktů je proto žádoucí využít různé způsoby konzervace (Zhao et al. 2015). Ciuffreda et al. (2015) uvádějí například užití éterických olejů, bakteriocinů (zejména nisinu), lysozymu, mastných kyselin, nanočástic stříbra, ozonu, dimethylkarbonátu nebo superkritického oxidu uhličitého. Dále je možné využít fyzikálních metod, jako jsou ultrazvuk, vysoký hydrostatický tlak, mikrofiltrace, vysokotlaká homogenizace, gama záření, UV záření, mikrovlnné záření aj. (Ciuffreda et al. 2015).

Jednotlivé způsoby konzervace je zejména pro eliminaci sporotvorných organismů vhodné kombinovat. Nejčastějšími kombinacemi je tepelné ošetření společně s přidavkem antimikrobiální látky, úpravou pH či osmotického tlaku (Daryaei et al. 2016).

Při eliminaci aerobních sporulujících bakterií mohou být využívány sporicidní a baktericidní účinky rostlinných extraktů. Často používanými jsou například karvon, limonen, myristicin,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, geraniol, terpineol, eugenol, limonen a *p*-cymen (Cho & Chung 2017; Silva et al. 2019).

Slibným, germicidně působícím nástrojem je použití UV záření. Toto záření se tradičně užívá pro dekontaminaci vzduchu, vody a povrchů, narůstá však snaha o jeho rozšíření také na tekuté i pevné potraviny a na nápoje. Jeho výhody spočívají nejen ve skutečnosti, že účinně inaktivuje široké spektrum mikroorganismů patogenních či kazících potravin, ale také v tom, že nedochází k téměř žádným ztrátám nutriční a sensorické kvality potravin ani nevznikají žádné známé toxické vedlejší produkty. Oproti pasterizaci je také potřeba mnohem méně energie. Za nejvíce germicidní rozsah vlnové délky je považováno UV-C záření o vlnové délce 200-280 nm (Gayán et al. 2014). V potravinářském průmyslu se UV-C záření používá zejména k dezinfekci vzduchu a vody při zpracování masa nebo zeleniny, ale také pro dezinfekci čerstvých potravin, jako je kuřecí maso, ryby, vejce, mléko či ovocné šťávy (Albert et al. 2014). UV záření se tedy může využívat pro snížení počtu spor jak na povrchu zařízení, tak i v potravinách. Například Prado et al. (2018) ve svém výzkumu prokázali snížení tvorby biofilmu na površích z nerezové oceli a gumy při ošetření UV-C zářením. Jejich výsledky tak naznačují, že toto záření může být slibnou metodou v boji se sporulujícími bakteriemi

v potravinářské výrobě. Ve studii Zhao et al. (2015) byla zkoumána účinnost kombinace mikrofiltrace a UV záření na redukci *A. acidoterrestris* u pasterovaného jablečného cideru. Mikrofiltrace sloužila k mechanickému odstranění suspendovaných částic a mikroorganismů ze cideru, čímž se zvýšila účinnost UV ošetření.

Dalším antimikrobiálním ošetřením je vysokotlaká homogenizace. Účinná je však především proti vegetativním formám. Spory jsou k vysokotlaké homogenizaci méně citlivé, přičemž citlivost bývá druhově i kmenově specifická. Baktericidní působení vysokotlaké homogenizace je nejspíše způsobeno narušením vnější buněčné membrány bakterií, kterým dochází ke strukturnímu přeskupení proteinů (Ciuffreda et al. 2015). Inaktivace endospor vyžaduje zpravidla kombinaci tlaku a teploty, jejíž účinnost může být zvýšena přítomností nisinu, nízkým pH a dalšími faktory (Margosch et al. 2004).

Pulzní elektrické pole je další antimikrobiálně působící proces, založený na aplikaci krátkých pulsů vysokého napětí do výrobku umístěného mezi dvěma elektrodami. Tím dochází k destabilizaci mikrobiální buněčné membrány, změnám v transportu iontů, a tím i k poškození buněk a jejich smrti (Ciuffreda et al. 2015).

Ultrazvuk rozkládá shluky bakterií a inaktivuje je. Mechanismus inaktivace pravděpodobně spočívá v intracelulární kavitaci, zahřívání a ztenčování buněčných membrán a tvorbě volných radikálů (Ciuffreda et al. 2015).

V neposlední řadě je rovněž důležité použití sanitačních a dezinfekčních prostředků ve výrobním provozu. Jejich koncentrace by však měly zohledňovat specifické mechanismy rezistence pro každou bakterii (Dos Anjos et al. 2013).

### **3.1.5 Sporulující bakterie jako probiotika**

V současné době jsou sporulující bakterie předmětem výzkumu pro potenciální využití jako probiotika. Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které po podání v odpovídajícím množství poskytují hostiteli zdravotní benefity (Hill et al. 2014). Za zdravotní přínos se pokládá zejména zmírnění průjemových onemocnění, laktóзовé intolerance a příznaků podráždění střev, pozitivní vliv na snížení incidence kolorektálního karcinomu, snížení hladiny cholesterolu v krevním séru či léčba úzkosti a deprese (Ragul et al. 2017; Talebi et al. 2018). Probiotika mohou zabránit pronikání patogenů do střevního epitelu stimulací produkce mucinu, snížením propustnosti střevní bariéry, produkcí antimikrobiálních látek nebo modulací imunitního systému (Ragul et al. 2017).

Výhodou sporulujících bakterií oproti nejběžněji používaným probiotickým bakteriím rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* je vyšší životaschopnost spor při průchodu trávicím

traktem a snadnější manipulace při zpracování a skladování. V mnoha potravinách ke klíčení spor nedochází, a tak není ovlivněna jejich kvalita, neboť spory mají neaktivní metabolismus (Bader et al. 2012). Při orálním podání indukují probiotické kmeny rodu *Bacillus* buněčné a humorální složky imunitního systému, čímž přispívají ke zlepšení zdravotního stavu během střevních infekcí (Patrone et al. 2016). Mezi tyto složky imunitního systému s bioterapeutickým potenciálem patří rozmanitá škála antimikrobiálních peptidů a malých extracelulárních molekul (Elshaghabe et al. 2017).

Jako příklad komerčně používaných probiotik z řad sporulujících bakterií lze uvést *B. polyfermenticus* produkující antimikrobiální látku polyfermenticin (Lee et al. 2019) nebo kmen *B. clausii* O/C, který inhibuje například *B. cereus* a *Clostridium difficile* (Ripert et al. 2016). Za další druhy mající potenciálně probiotické účinky jsou považovány například *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. indicus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* (Elshaghabe et al. 2017; Ragul et al. 2017), *B. amyloliquefaciens* (Ragul et al. 2017; Talebi et al. 2018), *B. cereus*, *B. clausii* a *B. pumilus* (Patrone et al. 2016; Celandroni et al. 2019). Talebi et al. (2018) dále uvádí jako potenciální probiotika *B. atrophaeus* a *B. safensis*. Ehling-Schulz et al. (2019) uvádí jako probiotikum v krmivech hospodářských zvířat *B. toyonensis*. Je však třeba zdůraznit, že probiotické vlastnosti jsou kmenově specifické (Lee et al. 2019) a daný kmen musí splňovat přísná kritéria, aby mohl být uveden na trh. Základními kritérii je zdravotní nezávadnost a absence genů kódujících rezistenci vůči komerčně užívaným antibiotikům (Bader et al. 2012).

## **Bacillus spp.**

### **3.1.6 Obecná charakteristika rodu *Bacillus***

Rod *Bacillus* zahrnuje grampozitivní tyčinkovité, aerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie vytvářející endospory. Velikost jednotlivých bakterií se zpravidla pohybuje v rozmezí  $3-5 \times 1 \mu\text{m}$  (Prod'hom & Bille 2017) Vyskytují se jednotlivě, v párech či dlouhých řetězcích. Optimální teplota pro růst bývá v rozmezí 30-45 °C, termofilní druhy rostou optimálně při 65 °C; ideální pH je obvykle 7 (Grutsch et al. 2018). Některé druhy mohou být halofilní (Chhetri et al. 2019) a bývají pohyblivé i nepohyblivé (Prod'hom & Bille 2017; Grutsch et al. 2018).

Obecně jsou zástupci rodu *Bacillus* považováni za typické půdní bakterie. Běžně se ale vyskytují i ve vodě, vzduchu, potravinách či trávicím traktu lidí i zvířat. Přestože



se pravděpodobně nejedná o přirozené střevní bakterie a v trávicím traktu se vyskytují až po konzumaci potravin kontaminovaných sporami, jsou v této nise nacházeny pravidelně a existují studie dokládající schopnost některých druhů trávicí trakt kolonizovat (Elshagabee et al. 2017). Stále nabývá na významu názor, že *B. subtilis* a pravděpodobně i jiné příbuzné druhy se svou schopností tvořit biofilm, sporulovat v anaerobním prostředí a produkovat antimikrobiální látky přizpůsobily životu v gastrointestinálním traktu (GIT) člověka, a měly by být tedy považovány spíše za střevní komenzály, nikoli pouze za půdní mikroorganismy (Hong et al. 2009). Některé kmeny jsou oportunními patogeny zvířat i člověka (Elshagabee et al. 2017).

Z hlediska fenotypových a genotypových znaků se jedná o značně rozmanitou skupinu (Elshagabee et al. 2017). Díky schopnosti produkovat širokou škálu enzymů, antibiotik a jiných metabolitů mají druhy rodu *Bacillus* často využití v lékařských, farmaceutických, zemědělských a potravinářských procesech. Některé druhy produkují nutraceutika, jako jsou vitamíny (např. riboflavin, kobalamin), inositol nebo karotenoidy, a mohou tedy být používány pro výrobu doplňků zdraví (Celandroni et al. 2019). Následující Tabulka 1 uvádí příklady druhů rodu *Bacillus* produkujících některé potravinářsky významné enzymy.

**Tabulka 1:** Druhy rodu *Bacillus* produkující potravinářsky významné enzymy (upraveno podle Elshagabee et al. 2017)

skupina enzymů	příklady enzymů	druhy rodu <i>Bacillus</i>
štěpící sacharidy	$\alpha$ -amyláza, $\beta$ -amyláza, arabináza, celulóza, chitináza, dextranáza, maltáza	<i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. firmus</i> , <i>B. brevis</i> , <i>B. macerans</i> , <i>B. stearothermophilus</i>
proteázy	aminopeptidáza, esteráza	<i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. thermoproteolyticus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. pumilus</i>

**Tabulka 1** – pokračování: Druhy rodu *Bacillus* produkující potravinářsky významné enzymy (upraveno podle Elshaghabee et al. 2017)

skupina enzymů	příklady enzymů	druhy rodu <i>Bacillus</i>
lipázy	fosfolipáza C, thiamináza	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. thiaminolyticus</i>
nukleázy	$\beta$ -laktamáza, endo-N-acetylglucosaminidáza, exo-N-acetylglucosaminidáza, endo-N-acetylmuraminidáza, exo-N-acetylglucosaminidáza	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i>
fosfatázy	alkalická fosfatáza	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i>

### 3.1.7 Skupina *Bacillus cereus*

Skupina *Bacillus cereus* zahrnuje fylogeneticky úzce příbuzné druhy. Obecně jsou genomy druhů této skupiny konzervované a mají i velmi podobné sekvence genu pro 16S rRNA. Mezi nejstudovanější zástupce této skupiny patří *B. cereus*, *B. anthracis* a *B. thuringiensis*. Dále skupina zahrnuje například *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* a *B. toyonensis*. Nedávné genomické analýzy však naznačují, že skupina *B. cereus* může být rozdělena do 5 hlavních větví, které neodpovídají výše popsaným druhům (Ehling-Schulz et al. 2019).

Navzdory fylogenetické příbuznosti zástupců skupiny *B. cereus* se jednotlivé druhy vyznačují značně odlišnými fenotypovými vlastnostmi a patogenním potenciálem. Například vysoce toxický *B. anthracis* způsobuje často smrtelné onemocnění antrax a je tak potenciální biologickou zbraní. *B. thuringiensis* produkuje insekticidní krystalické proteiny a thuringiensin, insekticidní oligosacharid, díky čemuž je komerčně využíván jako biologický pesticid. *B. cereus* je oportunistický patogen, který je častou příčinou otrav jídlem (Helgason et al. 2000). *B. toyonensis* je využíván pro své probiotické vlastnosti (Ehling-Schulz et al. 2019).

Druhy skupiny *B. cereus* se vyskytují v různých prostředích, běžně v půdě, vodě či GIT eukaryotických organismů (Carlin et al. 2010). Jako hlavní rezervoár spor bakterií

skupiny *B. cereus* však slouží především půda a organismy s ní spojené. Bakterie jsou přenášeny na člověka prostřednictvím zemědělských produktů, které se do těla člověka a jiných savců dostávají zejména požitím, inhalací či poraněním kůže (Ehling-Schulz et al. 2019).

#### 3.1.7.1 *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* je grampozitivní bakterie široce rozšířená v půdě a na vegetaci. Může kontaminovat jak syrové, tak i zpracované potraviny (Carlin et al. 2010). Optimální teplota pro růst bývá 30-40 °C a pH 5,0-8,8 s optimem při pH 6,0-7,0; psychrotrofní kmeny mohou růst při teplotách okolo 4 °C (Grutsch et al. 2018).

Patogenní kmeny *B. cereus* mohou u člověka způsobovat lokální i systémové infekce (například různé infekce ran, endoftalmitidu či septikémii), k čemuž nejspíš napomáhá i jejich schopnost adaptace na různé hostitele a prostředí (Carlin et al. 2010). Také mohou být původci otrav jídlem, ačkoli některé kmeny *B. cereus* jsou naopak využívány pro své probiotické vlastnosti. Patogenita je přičítána produkci extracelulárních faktorů, jako jsou fosfolipázy, cereulid (emetický toxin, Ces), hemolytický enterotoxin (hemolysin BL, Hbl), nehemolytický enterotoxin (Nhe), cytotoxin K (CytK) a hemolysiny I-III (Berthold-Pluta et al. 2015).

*B. cereus* může způsobit dva různé typy otravy jídlem, emetický nebo průjmový syndrom. Emetický syndrom je důsledkem intoxikace, tedy požitím potraviny obsahující toxin cereulid. Projevuje se silnými nevolnostmi a zvracením do 5 hodin po konzumaci potraviny kontaminované cereulidem. Cereulid je cyklický peptid, který je díky své struktuře vysoce odolný vůči vysokým teplotám, extrémnímu pH i degradaci proteolytickými enzymy. Není tedy inaktivován ani během zpracování potravin, ani při průchodu GIT (ElZamkan & Mubarak 2017). Ohrožení představují zpravidla potraviny obsahující  $> 10^5$  KTJ *B. cereus*/g (Carlin et al. 2010; Webb et al. 2019).

Průjmový syndrom vzniká po požití *B. cereus* v potravě s následnou produkcí enterotoxinů až v GIT. Infekční dávka způsobující tento typ onemocnění se odhaduje na  $10^5$  až  $10^8$  kolonii tvořících jednotek (KTJ) (Berthold-Pluta et al. 2015). Inkubační doba je 8 až 16 hodin po konzumaci kontaminované potravy a projevuje se bolestí břicha a průjmem. Samotný průběh a doba trvání onemocnění závisí na schopnosti kmene adherovat na enterocyty a na tom, jaké toxiny daný kmen nese ve svém genomu (Jeßberger et al. 2014; ElZamkan & Mubarak 2017). Informace k oběma typům syndromů způsobených *B. cereus* shrnuje Tabulka 2.

**Tabulka 2:** Dva typy otrav jídelm způsobené *B. cereus* (upraveno podle Webb et al. 2019)

	<b>průjmový syndrom</b>	<b>emetický syndrom</b>
toxiny	nehemolytický enterotoxin (Nhe), hemolysin BL (Hbl), cytotoxin K (CytK)	cereulid (Ces)
infekční dávka	$\geq 10^5$ KTJ/g potravin	cca 400 $\mu$ g cereulidu
požadavky pro vznik	konzumace potravin s <i>B. cereus</i> , následná tvorba toxinů v tenkém střevě hostitele	produkce cereulidu v potravinách a následné požití kontaminované potravin (intoxikace)
inkubační doba	8-24 h	0,5-5 h
doba trvání	12-24 h	6-24 h
místo produkce toxinu	v tenkém střevě hostitele	v potravinách
vlastnosti toxinu	termolabilní protein (inaktivován při 56 °C/5 min), inaktivován proteázami a pH < 4,0	termostabilní cyklický peptid (bez ztráty aktivity při 121 °C/90 minut), není inaktivován proteázovými enzymy, stabilní při pH 2-11
rizikové potraviny	maso, ryby, drůbež, masné výrobky, polévky, omáčky, mléčné výrobky, zelenina	škrobnaté – rýže, těstoviny, brambory, pečivo

Vzhledem k tomu, že *B. cereus* patří mezi časté původce onemocnění z potravin, je jeho přítomnost ošetřena legislativně, a to Nařízením Komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny a ČSN 56 9609 (Pravidla správné hygienické a výrobní praxe – mikrobiologická kritéria pro potraviny). Nejvyšší povolené mezní hodnoty pro přítomnost *B. cereus* v potravinách podle Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny jsou uvedeny v Tabulce 3. Přítomnost enterotoxinu *B. cereus* by měla být ve všech potravinách v hmotnosti (objemu) vzorku neprokazatelná.

**Tabulka 3:** Nejvyšší mezní hodnoty *B. cereus* v potravinách

mikroorganismus	kategorie potravin	nejvyšší mezní hodnota na g (ml)
<i>Bacillus cereus</i>	potraviny neurčené k přímé spotřebě	10 <sup>5</sup>
	potraviny určené k přímé spotřebě	10 <sup>4</sup>
	potraviny určené pro kojeneckou a dětskou výživu	10 <sup>2</sup>

### 3.1.8 Skupina *Bacillus subtilis*

Mezi hlavní zástupce skupiny těchto grampozitivních sporulujících bakterií, které se hojně vyskytují v půdě, patří *B. subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. licheniformis*, *B. paralicheniformis*, *B. sonorensis*, *B. pumilus* a *B. safensis* (Harwood et al. 2018; Caulier et al. 2019).

Využití bakterií skupiny *B. subtilis* je rozmanité. *B. subtilis* je modelovým organismem pro zkoumání grampozitivních bakterií (Yu et al. 2012), někdy bývá označován za nejlépe popsanou grampozitivní bakterii vůbec (Dijl & Hecker 2013). Některé kmeny *B. subtilis* se využívají například pro studium vývoje genetického kódu (Yu et al. 2012). *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* a *B. licheniformis* jsou z rodu *Bacillus* nejčastěji využívanými druhy pro produkci enzymů. Jejich výhodou je schopnost fermentace, vysoká výtěžnost cílových produktů a skutečnost, že nevytváří toxické vedlejší metabolity (Dijl & Hecker 2013). Tyto bakterie syntetizují také další látky, jako jsou vitamíny, aminokyseliny či antibiotika (Harwood et al. 2018). Díky schopnosti tvorby endospor a produkci celé řady antimikrobiálních sloučenin nacházejí bakterie skupiny *B. subtilis* rovněž využití v potravinářském průmyslu při konzervaci potravin či v ochraně plodin jako biopesticidy (Caulier et al. 2019). Některé bakterie skupiny *B. subtilis* se také využívají jako probiotika a aditiva do krmiv. *B. paralicheniformis* produkuje lantibiotikum formicin, které se vyznačuje širokospektrálním účinkem proti grampozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile* a *Listeria monocytogenes* (Ahire et al. 2020). Zajímavostí je, že spory *B. subtilis* se uplatňují v kosmických experimentech (Horneck et al. 2010), například se zkoumá jejich schopnost přežití na Marsu (Wassmann et al. 2012).

Přítomnost bakterií skupiny *B. subtilis* v potravinách může být nežádoucí kvůli produkci enzymů, zejména amyláz, proteáz, lipáz či fosfatáz. *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* a *B. amyloliquefaciens* mohou způsobovat kažení například pekárenských a mléčných produktů (Lücking et al. 2013; André et al. 2017).

Některé kmeny mohou být oportunními patogeny; mezi symptomy patří například podráždění očí, bolest v krku, bolest hlavy, únava či závratě. *B. subtilis* produkuje extracelulární toxin subtilisin způsobující alergické reakce u jedinců, kteří jsou tomuto toxinu opakovaně vystaveni (Yassin & Ahmad 2012). Také byly popsány například sepse způsobené *B. pumilus* (Kimouli et al. 2012) nebo bakteriémie *B. licheniformis* (Idelevich et al. 2013). *B. subtilis* a *B. mojavensis* syntetizují tepelně odolný enzym amylosin způsobující onemocnění z potravin (Apetroaie-Constantin et al. 2009), stejně tak *B. pumilus* produkuje pumilacidin (From et al. 2007) nebo *B. licheniformis* lichenysin A (De Bellis et al. 2015).

### 3.1.9 Výskyt zástupců rodu *Bacillus* v potravinách

#### 3.1.9.1 Výskyt v mléce a mléčných výrobcích

Bakterie rodu *Bacillus* jsou často spojovány s kažením syrového, ale i zpracovaného mléka a mléčných výrobků (Flint et al. 2017). Mléko a mléčné výrobky jsou totiž pro mikroorganismy výborným růstovým substrátem, díky čemuž se navzdory všem snahám mikrobiální kontaminace vyskytuje i v konečných výrobcích (Shaheen et al. 2010; Checinska et al. 2015). K tomu přispívá i neustále rostoucí rezistence mikroorganismů, které se rychle adaptují na nové metody jejich eliminace. Některé mikroorganismy se například adaptovaly na nízké teploty, a tak mohou růst v mléčných výrobcích i při dodržování správných podmínek skladování (Shaheen et al. 2010). Při zpracování mléka a výrobě mléčných výrobků, jejich skladování a distribuci se využívají různá preventivní opatření proti kažení. Těmi jsou zejména řízená teplota, snižování vlhkosti, snižování pH a speciální čisticí režimy. Mnoho těchto postupů je však pro sporulující bakterie nedostatečných. Některé bakteriální spory mohou dokonce přežít UHT záhřev. Potenciálními vstupními body pro kontaminaci mléka těmito bakteriemi mohou být zařízení pro dojení a zpracování mléka, prostředí farmy a krmiva (Flint et al. 2017), například siláž se spory bacilů, které přežijí průchod gastrointestinálním traktem zvířete (Checinska et al. 2015).

Mezi vysoce tepelně odolné druhy patří *B. sporothermodurans* a *Geobacillus stearothermophilus* a termotolerantní bakterie jako *B. licheniformis*. Často jsou nalézány v sýrech, dehydratovaných či konzervovaných mléčných výrobcích, což dokazuje schopnost spor odolávat ošetřením za vysoké teploty, tedy pasterizaci a v některých případech dokonce vysokoteplotnímu záhřevu mléka (UHT) (Jindal & Anand 2018). S kažením mléčných výrobků bývají často spojovány druhy *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*

či *B. weihenstephanensis* (Ivy et al. 2012; Sadiq et al. 2018). Ricotta, čerstvý měkký sýr vyráběný tepelnou koagulací syrovátkových proteinů, někdy mívá nežádoucí narůžovělé zabarvení, způsobené skupinou *B. cereus* a rodem *Panibacillus* (Remize 2016; Sattin et al. 2016). Poměrně nově popsanou sporulující bakterií významnou v mlékárenském průmyslu je také *B. thermoamylovorans* (Flint et al. 2017).

Kvalitu mléčných výrobků tyto bakterie ovlivňují produkcí lipolytických a proteolytických enzymů, které jsou schopny tvořit v potravinách i při skladování za nízkých teplot. Působením těchto enzymů dochází ke snížení trvanlivosti produktů, kažení a následným ekonomickým ztrátám (Stoeckel et al. 2016; Martinez et al. 2017).

#### 3.1.9.2 Výskyt v dalších chlazených potravinách

Výskyt psychrotolerantních sporulujících bakterií lze zaznamenat také u dalších chlazených potravin. Například v surimi (rybí pastě získané vařením rybích kousků se solí, cukrem a škrobem), které bývá skladováno dlouhodobě při nízkých teplotách, jsou často nalézány druhy s proteolytickou a amylolytickou aktivitou *B. simplex* a *B. subtilis*. Obecně bývají u chlazených zpracovaných potravin s prodlouženou trvanlivostí často také zástupci skupiny *B. cereus* nebo *B. pumilus* (Remize 2016).

#### 3.1.9.3 Výskyt v chlebu a dalších pekárenských produktech

Několik druhů rodu *Bacillus*, zejména *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. firmus* a *B. mesentericus*, ale také zástupci skupiny *B. cereus*, se kvůli své amylasové aktivitě a produkci slizovitých extracelulárních polysacharidů podílí na vadách chleba. Tato tzv. nitkovitost chleba se projevuje nepříjemným ovocným zápachem, změněnou barvou střídky či její lepkavostí (Pepe et al. 2003; Remize 2016). Obecně je v pekárenských produktech z aerobních sporulujících bakterií dominantní *B. amyloliquefaciens* (André et al. 2017). Problémem v pekárnách bývá adheze vegetativních buněk i spor na dopravníkové pásy, se kterými jsou pekárenské produkty v kontaktu poměrně dlouhou dobu (Fink et al. 2017).

#### 3.1.9.4 Výskyt v sušených potravinách

Schopnost přežití bakterií v potravinách s nízkou vlhkostí s hodnotami aktivity vody ( $a_w$ ) pod 0,85 má pro hodnocení mikrobiální bezpečnosti potravin velký význam (Dinh Thanh et al.

2018). V suchých potravinách, jako jsou například koření, čaje, kakaový prášek, ale také sušené mléko, syrovátkové proteiny, mouka nebo škrob, je totiž rozšíření sporulujících bakterií značné (El Saleeby et al. 2004; Remize 2016). Například Stoeckel et al. (2016) izolovali z různých potravinářských produktů, jako jsou kakaový prášek, sušené mléko či koření, druhy produkující termorezistentní spory *B. amyloliquefaciens*, *B. flexus*, *B. subtilis*, *B. thermoamylovorans*, *B. smithii*, *Geobacillus pallidus* a *Geobacillus stearothermophilus*.

V kakaovém prášku bývají časté *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. megaterium* či *B. subtilis*. Termorezistentní spory v kakaovém prášku představují problém zejména pro produkty s jeho přídavkem (Lima et al. 2011).

Sušené mléko je považováno za vektor spor. Ke kažení potraviny dochází, když je sušené mléko rekonstituováno, neboť v konečném produktu s vyšší aktivitou vody dochází ke klíčení spor (André et al. 2017). V sušeném mléce se vyskytuje nejčastěji *B. licheniformis*, dále například *B. paralicheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Paenibacillus flavithermus* (André et al. 2017; Li et al. 2019) či *Brevibacillus brevis* (Sadiq et al. 2018).

U sušeného koření se často uvádí výskyt druhů *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, a *B. toyonensis* (Gurtler & Keller 2019). Vliv na kvalitu koření mají různé faktory, jako jsou způsob pěstování, sklizeň, zpracování, balení, přeprava, skladování či země původu (Fogele et al. 2018). Vzhledem k tomu, že se s kořením obchoduje po celém světě a že pochází z regionů s odlišnými klimatickými podmínkami, představují v něm přítomné bakterie produkující vysoce termorezistentní spory značnou výzvu pro výrobce potravin (Stoeckel et al. 2016). Problémem u koření a kořenících přípravků také může být skutečnost, že s jejich přídavkem do různých potravin se mohou patogenní mikroorganismy dostat z koření do prostředí. Mohou tak kontaminovat provozy i další suroviny či finální produkty. Na druhou stranu rostliny přirozeně produkují sekundární metabolity, jako jsou silice a jiné sloučeniny, které mají antimikrobiální účinky vůči určitým mikroorganismům. Stále však zůstává nejasné, zda sušená koření vykazující antimikrobiální aktivitu v kapalných testovacích systémech mohou ovlivnit přežití mikroorganismů také za podmínek nízké vodní aktivity (Dinh Thanh et al. 2018).



## ***Alicyclobacillus* spp.**

### **3.1.10 Obecná charakteristika rodu *Alicyclobacillus***

Do rodu *Alicyclobacillus* jsou řazeny grampozitivní, striktně aerobní, termofilní, acidofilní či acidorezistentní sporotvorné bakterie tyčinkovitého tvaru (Ciuffreda et al. 2015; Pornpukdeewattana et al. 2019). Rostou v rozmezí hodnot pH od 2,2 do 6,0 a teplot od 20 do 70 °C, s optimem 35 až 55 °C (Chang & Kang 2004; Anjos et al. 2014).

Alicyklobacily byly z počátku zařazeny do rodu *Bacillus*, protože se vyznačují, stejně jako bacily, tvorbou endospor. Zásadní pro jejich budoucí samostatné fylogenetické zařazení bylo až studium genomu (Ciuffreda et al. 2015). Srovnáním sekvenčních analýz založených na 16S ribozomální RNA (rRNA) byla prokázána odlišnost těchto bakterií od druhů rodu *Bacillus*, což vedlo k vytvoření samostatného rodu *Alicyclobacillus* (Smit et al. 2011).

Alicyklobacily se obecně považují za nepatogenní organismy, významnou roli ale hrají v potravinářském průmyslu, kde se podílejí na znehodnocování potravin. Způsobují zejména kažení pasterizovaných ovocných šťáv a jiných ovocných produktů (Smit et al. 2011). Předpokládá se, že ke kontaminaci a následnému znehodnocení potravin dochází při zpracování nedostatečně očištěného ovoce, neboť zástupci rodu *Alicyclobacillus* jsou přenášeni půdou (Ciuffreda et al. 2015). Spory jsou schopné přežít pasterizaci, klíčit a růst v prostředí s nízkým pH a produkovat zápachající sloučeniny (např. guajakol), kterými znehodnocují produkt (Pornpukdeewattana et al. 2019). Produkce guajakolu je společným znakem tohoto rodu. Jeho množství je variabilní a závisí na počtu životaschopných buněk, konkrétním kmenu, teplotě skladování, koncentraci kyslíku nebo na koncentraci prekurzorů guajakolu (Ciuffreda et al. 2015). Další nežádoucí skupinou sloučenin produkovanou alicyklobacily jsou halofenoly (Salomão et al. 2014).

Za odolnost těchto bakterií vůči vysokým teplotám a kyselému prostředí mohou být zodpovědné  $\omega$ -cyklohexyl nebo  $\omega$ -cykloheptyl mastné kyseliny přirozeně se vyskytující v lipidové složce membrán (Ciuffreda et al. 2015), kde tvoří až 65 % (Smit et al. 2011). Lipidy obsahující tyto mastné kyseliny totiž pravděpodobně stabilizují membránovou strukturu, a tím zajišťují bariérové funkce membrán prokaryot. Výjimkou jsou druhy *A. pomorum*, *A. macrosporangioides*, *A. contaminans*, *A. ferrooxydans* a *A. aeris*, které ve své membráně omega-alicyklickou mastnou kyselinu neobsahují, a nejsou proto schopné růstu při stejně vysokých teplotách. Maximální teplota, při které jsou schopny růstu, se zpravidla pohybuje okolo 60 °C, u druhů *A. aeris* a *A. ferrooxydans* 35-40 °C (Goto et al. 2003, 2007; Jiang et al. 2008; Guo et al. 2009). Adaptace alicyklobacilů na extrémní prostředí by mohla být rovněž

daná přítomností hopanoidů v buňkách. Hopanové glykolipidy jsou strukturně podobné cholesterolu a mají kondenzační účinek, který při nízkém pH zabraňuje pasivní difuzi protonů přes membránu, což usnadňuje udržení neutrální hodnoty pH v cytoplazmě (Ciuffreda et al. 2015). Prado et al. (2018) navíc ve své studii prokázali, že bakterie rodu *Alicyclobacillus* mohou tvořit biofilmy, zejména na špatně dezinfikovaném vybavení a površích. Spory, které kontaminují konečný produkt, tak mohou pocházet právě z těchto biofilmů (Dos Anjos et al. 2013).

Kromě klasických kultivačních diagnostických metod existuje zajímavý způsob identifikace kontaminace bakteriemi rodu *Alicyclobacillus* pomocí tzv. elektronického nosu. Tento přístroj je schopen identifikovat kontaminované produkty již při velmi nízkých bakteriálních koncentracích s úspěšností téměř 100 %. Tím, že identifikace kontaminace pomocí elektronického nosu není založena na analýze sekundárních metabolitů, je umožněno rozpoznání kontaminace už ve velmi rané fázi (Concina et al. 2010).

### **3.1.11 *Alicyclobacillus acidoterrestris***

*A. acidoterrestris* je nejvýznamnějším druhem v rámci rodu *Alicyclobacillus*. Je hlavní příčinou kažení kyselých nápojů, které se vyznačují pachutí guajakolu. Pro výrobce je proto důležité přítomnost *A. acidoterrestris* kontrolovat, neboť ačkoli se jedná o pro člověka nepatogenní organismus, jeho přítomnost v produktu může vést k významným ekonomickým ztrátám (Tremarin et al. 2017; Pornpukdeewattana et al. 2019).

Růst tohoto druhu je značně ovlivněn teplotou skladování, objemem nevyplněného prostoru nad obsahem v uzavřené nádobě či mícháním. Rychlost růstu v částečně naplněných nádobách je vyšší než ve zcela naplněných nádobách, což zdůrazňuje aerobní povahu *A. acidoterrestris*. Také protřepání vzorku zvyšuje detekci růstu *A. acidoterrestris*, protože při něm dochází k začlenění kyslíku z prostoru nad obsahem do nápoje, čímž se opět potvrzuje aerobní charakter této bakterie (Pornpukdeewattana et al. 2019).

## Další aerobní sporulující bakterie

### 3.1.12 *Paenibacillus* spp.

Do rodu *Paenibacillus* jsou řazeny grampozitivní tyčinkovité pohyblivé bakterie, jež jsou převážně fakultativně anaerobní, případně striktně aerobní. Optimální teplota růstu těchto bakterií je v rozmezí 28-40 °C a optimální pH 7,0 (Priest 2015). Všechny druhy produkují oválné endospory (Priest 2015; Celandroni et al. 2016).

Běžným místem výskytu je půda, zejména půdy bohaté na humus a rostlinnou biomasu, ve kterých napomáhají dekompozici organických látek vylučováním extracelulárních enzymů (Priest 2015). Jejich proteázy, lipázy a fosfolipázy negativně ovlivňují strukturu a chuť mléčných výrobků. Enzym  $\beta$ -galaktosidáza hydrolyzuje laktózu a taktéž ovlivňuje kvalitu mléka (Ivy et al. 2012; Grady et al. 2016). *P. polymyxa* je zmiňován v souvislosti s tím, že fermentací laktózy způsobuje nakyslost a pěnivost mléka (De Jonghe et al. 2010). Působením proteolytických enzymů je způsobeno nežádoucí sladké srážení, tj. srážení mléka bez přidání okyselujícího činidla (Gopal et al. 2015). Tyto bakterie mohou také vykazovat lecitinázovou (fosfolipáza C) aktivitu, při které dochází k hydrolyze fosfolipidové membrány globule mléčného tuku. Tím se uvolní malé lipidové částice, které se shlukují a plovou na hladině (De Jonghe et al. 2010; Gopal et al. 2015). Tuto nežádoucí enzymatickou aktivitu nicméně nevykazují všechny kmeny izolované z mléka. S kažením mléčných výrobků bývají spojovány *P. macerans* a *P. lactis* (Sadiq et al. 2018). Další druhy izolované z mléčných výrobků zahrnují například *P. amylolyticus*, *P. graminis*, *P. lactis*, *P. lentimorbus*, *P. lucanolyticus*, *P. odorifer*, *P. peoriae* a *P. stellifer* (Ivy et al. 2012; Grady et al. 2016).

Významným zdrojem kontaminace syrového mléka sporami jsou pravděpodobně krmiva pro mléčný skot (Scheldeman et al. 2004). Tyto bakterie mají také schopnost tvorby biofilmů (Gopal et al. 2015); dále také bylo prokázáno, že dokáží růst za nízkých teplot kolem 6 °C (Ivy et al. 2012). V mléčných výrobcích tedy dokáží růst i při dodržování správných podmínek skladování (Shaheen et al. 2010).

Některé druhy rodu *Paenibacillus* jsou oportunní patogeny lidí, jiné jsou důležitými patogeny hmyzu. Příkladem je *P. larvae* ssp. *larvae* způsobující fatální bakteriální onemocnění larev včely medonosné, tzv. mor včelího plodu (Grady et al. 2016).

Lipopeptidy produkované rodem *Paenibacillus* mají potenciál pro léčbu bakteriálních infekcí člověka, například polymyxiny produkované *P. polymyxa* mají velmi silnou inhibiční aktivitu vůči růstu gramnegativních bakterií (Jeong et al. 2019). Některé exopolysacharidy

produkované těmito bakteriemi mohou zase vykazovat antioxidační a potenciálně protinádorové účinky (Grady et al. 2016).

### 3.1.13 *Brevibacillus* spp.

Rod *Brevibacillus* sdružuje grampozitivní, gramvariabilní nebo gramnegativní tyčinkovité pohyblivé bakterie, jež se vyskytují jednotlivě, ve dvojicích i v řetězcích. Většina druhů je striktně aerobní. Vytváří endospory elipsoidního tvaru, které mohou ležet centrálně, paracentrálně nebo subterminálně (Logan & Vos 2015). Jedná se o značně rozmanitou skupinu mikroorganismů, které mohou být termofilní i psychofilní a acidofilní i alkalofilní (Panda et al. 2014).

Zástupci rodu *Brevibacillus* se vyskytují díky své značné adaptabilitě v mnoha různých prostředích, jako jsou například voda, prach, skály či trávicí trakt hmyzu a vyšších živočichů (Panda et al. 2014). Často bývají izolováni z půd. Jejich odolné spory mohou působit jako kontaminanty v potravinách a farmaceutických výrobcích (Logan & Vos 2015). Kvůli schopnosti přežít pasteraci a tvorbě biofilmů působí problémy v mlékárenství (Gopal et al. 2015).

*Br. brevis* se vyznačuje proteolytickou aktivitou a jeho spory často kontaminují sušené mléko nebo výjimečně i produkty ošetřené UHT. Kažení mléčných výrobků může způsobovat také *Br. parabrevis*, neboť vykazuje fosfolipázovou aktivitu (Sadiq et al. 2018). Dále byly z potravin izolovány například *Br. centrosporus* nebo *Br. agri*, který byl detekován dokonce i ve sterilovaném mléce. *Br. laterosporus* spolu s *Bacillus laterosporus* byly izolovány ze zkaženého mléka, chleba či spontánně fermentovaných sójových bobů (Logan & Vos 2015).

Někteří zástupci tohoto rodu produkují toxiny. Příkladem může být *Br. brevis* produkující termostabilní toxin, jenž se fyzikálně-chemickými vlastnostmi podobá cereulidu, který tvoří *B. cereus* (De Jonghe et al. 2010).

*Br. agri*, *Br. brevis*, *Br. centrosporus*, *Br. laterosporus* a *Br. parabrevis* mohou být původci infekcí u lidí (Panda et al. 2014; Logan & Vos 2015). *Br. centrosporus* a *Br. parabrevis* byly dokonce izolovány z lidské krve (Logan & Vos 2015), přičemž *Br. parabrevis* vykazoval hemolytickou aktivitu (Sadiq et al. 2018).

### 3.1.14 *Lysinibacillus* spp.

Bakterie rodu *Lysinibacillus* jsou tyčinkovité grampozitivní, zpravidla aerobní pohyblivé bakterie. Endospory mají elipsoidní nebo kulový tvar a jsou umístěny terminálně. Na jednu vegetativní buňku se nevytváří více než jedna spora (Failor et al. 2019). Kämpfer et al. (2013) uvádí rozmezí pH pro růst 5,5-11,5 a teplotu 10-45 °C.

Obvykle bývají bakterie tohoto rodu izolovány z půdy, některé jsou také na povrchu rostlin (Failor et al. 2019). Mohou se vyznačovat proteolytickou aktivitou (De Jonghe et al. 2010).

Nejvíce prozkoumaným druhem rodu *Lysinibacillus* je *L. sphaericus*, který vytváří tzv. binární toxin působící jako insekticid (Surya et al. 2016; Kayath et al. 2019). Sadiq et al. (2018) zmiňují tento druh také jako kontaminant mléčných výrobků.

### 3.1.15 *Halobacillus* spp.

Rod *Halobacillus* zahrnuje grampozitivní sporulující bakterie s buňkami ve tvaru oválných tyčinek a řadí se do něj pohyblivé i nepohyblivé striktně aerobní druhy. Bakterie tohoto rodu jsou mírně halofilní. Optimum pro jejich růst je při koncentracích solí 5-10 %, teplotách 30-38 °C a pH v rozmezí mezi 7,0-8,0. Endospory jsou vysoce odolné, přežívají záhřev 75 °C po dobu 10 minut (Spring 2015).

Hojně se vyskytují v různých prostředích o vyšší koncentraci solí, od zasolených půd a sedimentů až po fermentované potraviny (Spring 2015). Zástupcem rodu s využitím v potravinářství je *H. thailandensis* produkující proteázy, které nejspíše urychlují zkapalňování ryb nezbytné pro produkci rybí omáčky (Namwong et al. 2006).

### 3.1.16 *Sporolactobacillus* spp.

Rod *Sporolactobacillus* tvoří rovné grampozitivní tyčinky, jež jsou fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní. Většinou jsou pohyblivé a vyskytují se jednotlivě, v párech a zřídka i v krátkých řetězcích. Tvoří endospory, které jsou odolné vůči zahřátí na 80 °C po dobu 10 minut (Yanagida & Suzuki 2015).

### 3.1.17 *Anoxybacillus* spp.

Bakterie tohoto rodu jsou grampozitivní a mají rovné nebo mírně zakřivené tyčinkovité buňky, které se často vyskytují v párech nebo krátkých řetězcích. Jednotlivé druhy v rámci rodu jsou pohyblivé i nepohyblivé; aerobní, fakultativně aerobní nebo fakultativně anaerobní (Pikuta 2015). Jedná se o termofilní bakterie snášející i zásadité pH, ve kterém jsou stabilní i jejich enzymy (Goh et al. 2013). Endospory, jež bývají kulatého, oválného či cylindrického tvaru, jsou umístěny na konci buněk, přičemž v buňce nebývá více než jedna spora. Spory se vyznačují odolností proti záhřevu i mrazu (Pikuta 2015).

Je známo, že bakterie rodu *Anoxybacillus* produkují enzymy rozkládající sacharidy, a to zejména enzym amylázu hydrolyzující škrob. Amylázy tohoto rodu jsou termostabilní, snášejí i alkalické prostředí a mohou být využívány v pekařském průmyslu pro výrobu maltózového sirupu (Goh et al. 2013). *A. flavothermus* produkuje  $\alpha$ -amylázu využívanou k výrobě glukózového sirupu (Tawil et al. 2012).

Zástupci tohoto rodu byli nalezeni jako kontaminující bakterie v mléce (Caspers et al. 2013), což může být zapříčiněno více faktory. Endospory těchto bakterií jsou značně tepelně odolné, a tak přežívají tepelné ošetření mléka; významná je rovněž schopnost těchto bakterií vytvářet biofilmy (Goh et al. 2013).

Do rodu *Anoxybacillus* patří 10 druhů, a to *Anoxybacillus pushchinoensis*, *A. amylolyticus*, *A. ayderensis*, *A. kontaminans*, *A. flavithermus*, *A. gonensis*, *A. kamchatkensis*, *A. kestanbolensis*, *A. rupiensis* a *A. voinovskiensis* (Pikuta 2015).

### 3.1.18 *Geobacillus* spp.

*Geobacillus* spp. jsou grampozitivní, aerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie mající buňky ve tvaru tyčinek, které se vyskytují buď jednotlivě, nebo v krátkých řetězcích a jsou pohyblivé i nepohyblivé. Vegetativní buňky vytváří pouze jednu endosporu na buňku; endospory elipsoidního nebo válcovitého tvaru jsou umístěny terminálně nebo subterminálně. Jedná se o obligátně termofilní bakterie s optimem růstu při 55-65 °C a pH 6,2-7,5, které jsou v přírodě hojně rozšířené (Logan et al. 2015; Studholme 2015). *Geobacillus* bývá izolován z prostředí jako jsou horké prameny, ropná pole a hlubinné mořské sedimenty, ale také z mlékáren a cukrovarů (Burgess et al. 2010). Spory lze také paradoxně izolovat z půd chladných oblastí a ze sedimentů studených oceánů (Zeigler 2014).

Bakterie tohoto rodu produkují vysoce teplotně stabilní enzymy, které způsobují kažení potravin. Mezi jejich nejvýznamnější enzymy patří proteázy, lipázy,  $\beta$ -galaktosidázy,  $\alpha$ -amylázy a esterázy (Sadiq et al. 2018). Některé druhy (hlavně *G. stearothermophilus*) jsou častými kontaminanty sušeného mléka a mohou způsobit znehodnocení konzervovaných potravin (André 2017). Kvůli schopnosti spor přežít pasteraci i UHT záhřev a následné tvorbě biofilmů na výrobních zařízeních bývají problémem v mlékárenských provozech. Značnou schopnost tvorby biofilmů mají zejména druhy *G. stearothermophilus* a *G. thermoglucosidans* (Gopal et al. 2015). Bakterie rodu *Geobacillus* také slouží jako biologický indikátor kontroly sterility (Durand et al. 2015).

## Metody stanovení a identifikace

### 3.1.19 Klasické kultivační metody

Klasické kultivační metody se opírají o schopnost růstu mikroorganismů na specifických médiích. Vlastnímu stanovení sporulujících bakterií plotnovou metodou zpravidla předchází zahřátí vzorku, čímž jsou inaktivovány vegetativní buňky, přičemž selektivní účinek závisí na zvoleném čase a teplotě (Remize 2016).

Pro stanovení celkového počtu aerobních sporulujících bakterií bývá často používán trypton-sójový agar (TSA) jako univerzální médium podporující růst široké škály mikroorganismů (URL 1), či Brain Heart Infusion agar (BHI) (Witthuhn et al. 2011; Lücking et al. 2013).

Média pro selektivní izolaci acidotermofilních sporulujících bakterií, jako je *Alicyclobacillus acidoterrestris*, bývají okyselena (Baumgart 2003). Těmito médii jsou například *Alicyclobacillus* agar (ALI), *Bacillus acidoterrestris* thermophilic agar (BAT), K agar, Yeast Starch Glucose agar (YSG) (Anjos et al. 2014), Potato Dextrose Agar (PDA), Orange Serum Agar (OSA), Malt Extract Agar (MEA) či Wort Agar (Baumgart 2003).

Legislativa vyžaduje monitoring pouze *B. cereus*, a to u sušené počáteční kojenecké výživy a sušených potravin pro zvláštní léčebné účely (dle Nařízení Komise ES č. 1441/2007). Další limity a přípustné množství *B. cereus* upravuje ČSN 56 9609 – Pravidla správné hygienické praxe. Metodika pro stanovení *B. cereus* je uvedena v ČSN EN ISO 7932 (560092).

Norma ČSN EN ISO 7932 (560092) uvádí jako doporučené médium pro stanovení *B. cereus* MYP agar (Mannitol Egg Yolk Polymyxin B). Dalšími běžně užívanými médii pro stanovení *B. cereus* jsou PEMB (Polymyxin Pyruvate Egg Yolk Mannitol Bromothymol Blue), HiCrome *Bacillus* agar, Brilliance *Bacillus cereus* agar či CHROMagar (Chon et al. 2014).

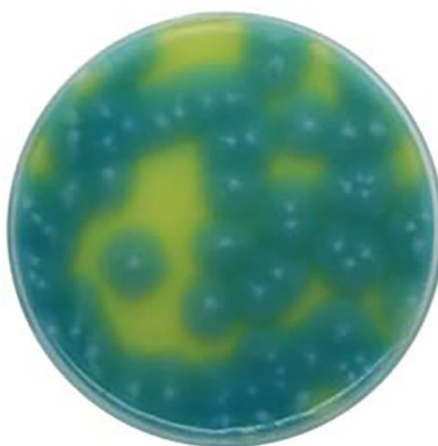
MYP agar odlišuje *B. cereus* od ostatních bakterií na základě rezistence *B. cereus* na polymyxin B, jeho neschopnosti fermentovat mannitol a lecitinázové aktivity. Charakteristické zbarvení kolonií *B. cereus* je růžové. Emulze z vaječného žloutku v tomto médiu poskytuje lecitin, který je hydrolyzován lecitinázou, čímž se vytváří zóna precipitace kolem kolonií (tzv. „halo“ efekt). Roztok polymyxinu B inhibuje růst gramnegativních bakterií (URL 2; URL 3). Kolonie *B. cereus* na MYP agaru jsou zachyceny na Obrázku 3.





**Obrázek 3:** *B. cereus* na MYP agaru (URL 4)

PEMB agar je další selektivní médium pro izolaci a stanovení počtů *B. cereus*. Indikátorem pH je zde bromthymolová modř. Stejně jako v případě MYP agaru, je do PEMB média přidáván polymyxin B jako selektivní činidlo a žlutková emulze pro detekci lecitinázové aktivity (URL 5). Obrázek 4 ilustruje *B. cereus* na PEMB agaru; *B. cereus* na tomto agaru tvoří modré kolonie se zónou precipitace.



**Obrázek 4:** *B. cereus* na PEMB agaru (URL 6)

HiCrome Bacillus agar je chromogenní médium sloužící k diferenciaci různých druhů rodu *Bacillus*. Složení tohoto média vychází z MYP agaru, navíc ale obsahuje chromogenní substrát specifický pro enzym  $\beta$ -glukosidázu. Organismy schopné fermentovat mannitol, jako je *B. megaterium*, tvoří na tomto médiu žluté kolonie, zatímco *B. cereus* štěpící chromogenní směs tvoří kolonie modré. *B. thuringiensis* má na tomto médiu také modré až modrozelené kolonie, ale na rozdíl od *B. cereus* jsou jeho kolonie nepravidelně ohraničené.

Pro selektivní stanovení *B. cereus* se, stejně jako u MYP, do média přidává selektivní suplement s polymyxinem B a bacitracinem (URL 7).

Brilliance Bacillus cereus agar je rovněž chromogenní médium, které slouží k detekci *B. cereus* ve vzorcích potravin. Obsahuje chromogenní substrát 5-brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -glukopyranosid, který je štěpen  $\beta$ -glukosidázou přítomnou v *B. cereus*, což vede k tvorbě modrých až zelených kolonií. Polymyxin B inhibuje většinu gramnegativních a některé grampozitivní bakterie, včetně některých druhů rodu *Bacillus*, jiných než *B. cereus*. Antibiotikum trimethoprim, které se také přidává do média, blokuje syntézu kyseliny listové nezbytné pro produkci DNA, a účinkuje tak proti mnoha grampozitivním bakteriím. Kombinace polymyxinu B a trimethoprimu je účinnější než použití samotného polymyxinu B (URL 8).

CHROMagar rovněž umožňuje detekci bakterií této skupiny. *B. cereus* na něm tvoří sytě modré kolonie, kolem kterých je bílý, tzv. „halo“ efekt. Kolonie tvořené ostatními druhy rodu *Bacillus* jsou modré až bezbarvé, případně mohou být i potlačeny. Tento agar ve srovnání s MYP značně usnadňuje vyhodnocení, neboť vyhodnocení intenzivně modrých kolonií na průsvitném agaru bývá snazší. Na rozdíl od MYP a PEMB není třeba přidávat emulzi vaječného žloutku (URL 9).

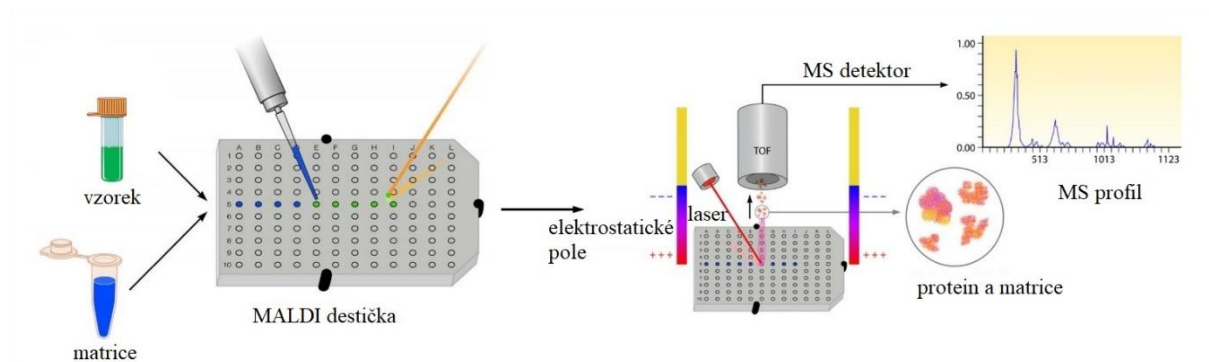
### **3.1.20 Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS)**

MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie je analytická technika, při které jsou neutrální vzorky ionizovány na nabitě molekuly a ty následně rozděleny na základě molekulové hmotnosti a velikosti náboje. Jedná se o měkkou ionizační techniku, při které nedochází ke fragmentaci molekul analytu. Je vhodná pro analýzu biomolekul, jako jsou peptidy, lipidy, sacharidy nebo jiné organické makromolekuly. Rovněž je hojně využívána pro rychlou a spolehlivou identifikaci mikroorganismů, zejména v klinických laboratořích. Pro účely identifikace mikroorganismů je metoda založena na analýze ribozomálních proteinů (Murray 2010).

Vzorky jsou aplikovány na destičku vyrobenou z nerezové oceli a překryty matricí. Po umístění do přístroje jsou vzorky ionizovány laserem. Ozáření trvá jen krátkou dobu, aby se zabránilo poškození analytu. Matrice energii laserového pulsu absorbuje, čímž dochází k její desorpci. Zároveň dojde k desorpci a ionizaci molekul analytu přenosem protonu z matrice na analyt. Nabité molekuly analytu jsou poté urychleny elektrickým polem a vstupují do hmotnostního analyzátoru doby letu (TOF), který měří dobu, za kterou ionty proletí trubici

o známé délce. Tato doba se pohybuje zpravidla v mikrosekundách a odvíjí se od hmotnosti a náboje molekuly. Lehčí ionty letí rychleji, jejich doba letu je tedy kratší a k detektoru dorazí dříve (Clark et al. 2013; Singhal et al. 2015). Proces MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie je schematicky znázorněn na Obrázku 5. Výsledkem jsou tzv. hmotnostní spektra, která jsou pro každý organismus specifická. Získané spektrum je následně softwarem porovnáváno s referenční databází a každému vzorku je přiděleno tzv. skóre identifikace. Hodnoty skóre identifikace MALDI-TOF jsou uvedeny v Tabulce 4.

Výběr správné matrice je velmi důležitý. Obecně platí, že pro značně polární analyty je vhodné použít vysoce polární matrice a naopak nepolární analyty kombinovat s matricemi nepolárními. V současné době se jako matrice nejčastěji používají  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina, 2,5-dihydroxybenzoová kyselina, 3,5-dimethoxy-4-hydroxy skořicová kyselina a 2,6-dihydroxyacetofenon (Clark et al. 2013).



**Obrázek 5:** Proces MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (upraveno podle Clark et al. 2013)

**Tabulka 4:** Skóre identifikace MALDI-TOF

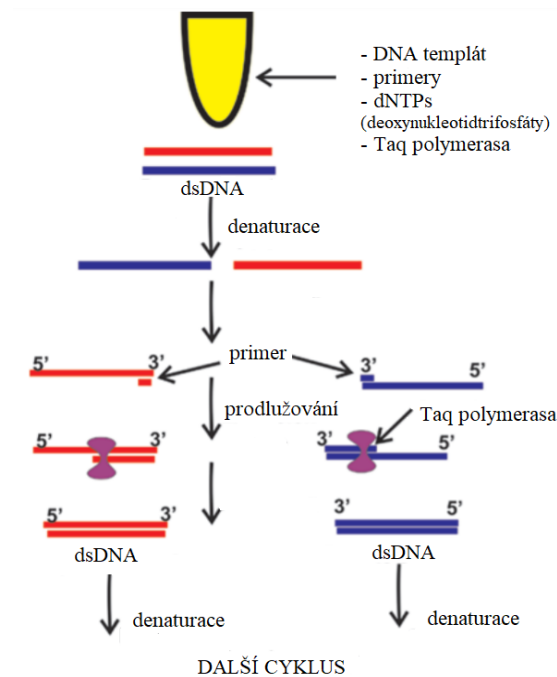
skupina	skóre	identifikace
1	2,300 – 3,000	vysoce pravděpodobná identifikace druhu
2	2,000 – 2,299	bezpečná identifikace rodu, pravděpodobná identifikace druhu
3	1,700 – 1,999	pravděpodobná identifikace rodu
4	0,000 – 1,699	nespolehlivá identifikace

### 3.1.21 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je rychlá, vysoce specifická a citlivá technika používaná k selektivní amplifikaci cílových segmentů DNA. Tato metoda slouží pro detekci, kvantifikaci a identifikaci různých mikrobiálních činitelů zejména v oblasti klinické a veterinární diagnostiky a bezpečnosti potravin (Kralik & Ricchi 2017).

Je založena na třech základních krocích. V prvním kroku dochází k záhřevu na teplotu 94-95 °C. Při této teplotě je DNA denaturována, čímž dojde k rozdělení dvouvláknové DNA (dsDNA, z angl. double stranded) a vzniku jednovláknových řetězců (ssDNA, z angl. single stranded). V druhém kroku, tzv. hybridizaci či annealingu, se teplota sníží obvykle na 55-65 °C a dochází k navázání primerů (oligonukleotidové řetězce), které nasedají na 3' konec komplementárního vlákna a ohraničují požadovaný úsek DNA. V posledním kroku, nazývaném elongace nebo též extenze, je syntetizováno nové komplementární vlákno. Tento proces je zprostředkován pomocí enzymu Taq DNA polymerázy, který katalyzuje začleňování volných nukleotidů do řetězce ve směru od 3' k 5' konci. Tímto dojde ke zdvojení původní molekuly DNA, přičemž každá z nových molekul obsahuje jeden starý a jeden nový řetězec DNA. Optimální teplota pro elongaci bývá odvozena od konkrétní Taq polymerázy a obvykle se pohybuje v rozmezí 72-78 °C. Pro získání dostatečného množství ampikonů se celý proces analogicky opakuje, přičemž množství nově vzniklých fragmentů DNA se každým cyklem dvojnásobí. Počet cyklů pak bývá přibližně 30 až 50. V současnosti je proces PCR plně automatizovaný a probíhá v přístrojích nazývaných termocyklery (Ehtisham et al. 2016; Dey 2018).

Na Obrázku 6 je schematický diagram průběhu PCR zachycující denaturaci dvouvláknové DNA na jednovláknovou DNA, nasedání primerů a syntézu nového řetězce DNA.

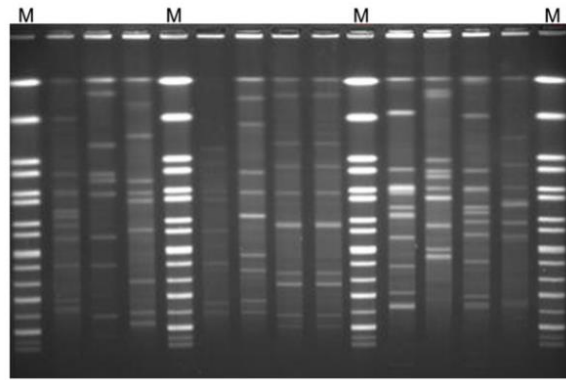


**Obrázek 6:** Průběh PCR (upraveno podle Dey 2018)

### 3.1.22 Pulzní gelová elektroforéza

Pulzní gelová elektroforéza je velice citlivá metoda využívaná pro genotypizaci bakterií. Metoda zahrnuje štěpení bakteriální DNA restrikčními enzymy, separaci fragmentů pomocí pulzní elektroforetické komory a následnou typizaci bakterií na základě charakteristického profilu neboli fingerprintu (Lopez-Canovas et al. 2019; Neoh et al. 2019). Princip separace DNA pomocí pulzní gelové elektroforézy je založen na střídání směru aplikace elektrického pole a na schopnosti molekul DNA se v novém směru elektrického pole přeorientovat. Čas, který molekuly potřebují pro změnu směru, závisí na jejich velikosti. Menší molekuly se přeorientují rychleji, čímž se migrace větších molekul v gelu zpomaluje, a molekuly jsou tak odděleny. Příklad profilu DNA fingerprintů je znázorněn na Obrázku 7, elektroforetický systém na Obrázku 8.

Využití pulzní gelové elektroforézy v potravinářském průmyslu spočívá ve sledování bakteriálních kontaminantů v produktech, kdy jsou získané fingerprinty porovnávány s referenčními fingerprinty významných patogenů (Neoh et al. 2019).



**Obrázek 7:** Profil DNA fingerprintů (upraveno podle Liu et al. 2016).  
Zobrazeno je 11 kmenů *B. cereus*. M = marker



**Obrázek 8:** Elektroforetický systém (URL 10)

## 4 Metodika

V praktické části diplomové práce byl sledován výskyt aerobních sporulujících bakterií v potravinách rostlinného i živočišného původu.

### Materiál

Seznam testovaných vzorků potravin je uveden v následující Tabulce 5. Všechny tyto vzorky byly analyzovány v rámci data použitelnosti či data minimální trvanlivosti.

**Tabulka 5:** Seznam vzorků potravin

skupina potravin	konkrétní vzorek potravin
živočišné	<i>výrobky z masa</i>
	hovězí bujon
	hovězí sušené maso natural
	sýr cottage
	pudingový dezert
	se šlehačkou čokoládový
	ricotta
	tvoroh polotučný
	gulášové koření
	kari indické sypké
rostlinné	<i>koření</i>
	kmín drcený
	pepř černý mletý
	skořice mletá
	zázvor sušený
	paprika červená sladká
	bazalka drhnutá
	zeleninové ochucovadlo
	bylinný čaj se ženšenem
	čistící čaj s červenou řepou
ovocné	ovocný čaj citronový
	se zázvorem
	kakaový prášek holandského typu
	<i>kakao a cereální směsi</i>
	cereální kaše čokoládová
	cereální kaše jablečná
se skořicí	
<i>výrobky z ovoce a džusy</i>	
ovocné pyré	
džus jablečný	
džus pomerančový	

## Metody

### 4.1.1 Mikrobiologický rozbor

V prvním kroku byly vzorky důkladně homogenizovány. Následně byl asepticky odebrán 1 ml u tekutých či 1 g u pevných vzorků a toto množství bylo převedeno do 9 ml ředícího média (masopeptonový bujón 5 g/l, trypton 5 g/l, kvasničný extrakt 2,8 g/l a tween 80 0,5 ml/l). Vzorky byly opět důkladně homogenizovány na vortexu a pasterovány při teplotě 85 °C po dobu 10 minut ve vodní lázni a následně sériově ředěny desítkovým ředěním do hodnoty 10<sup>-6</sup>.

Pro stanovení celkového počtu aerobních sporulujících bakterií byl použit trypton-sójový agar (TSA, Oxoid). Jeden ml z každého ředění byl převeden do sterilní Petriho misky, zalit agarem vytemperovaným na 50 °C a krouživým pohybem promíchán, aby bylo dosaženo rovnoměrného nárůstu.

Pro stanovení počtu *Bacillus cereus* byl použit Bacillus cereus agar base (Himedia) obohacený o polymyxin B (2 vialky/l, Himedia) a žloutkovou emulzi (50 ml/l, Himedia) dle ISO 7932. Na předem připravené agarové plotny bylo pipetováno 0,1 ml z 1. a 2. ředění a rozetřeno sterilní mikrobiologickou hokejkou.

Kultivace probíhala v obou případech aerobně při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin.

### 4.1.2 Izolace čistých kultur

Po uplynutí doby kultivace byla popsána morfologie kolonií a jednotlivé kolonie, dostatečně vzájemně izolované, pak asepticky převedeny do trypton-sójového bujónu (TSB, Oxoid). Kultivace probíhala po dobu <24 hodin při 30 °C. Následně byla mikroskopicky ověřena čistota kultur a čisté kmeny byly identifikovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

### 4.1.3 Identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS)

Pro identifikaci čistých kmenů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie byl 1 ml čerstvě narostlé kultury převeden do mikrocentrifugačních zkumavek (Eppendorf) a odstředěn při 14,5 tis. ot./min po dobu 2 minut. Následně byl slit supernatant, pelet resuspendován v 0,5 ml 70% ethanolu a opět odstředěn. Proces centrifugace byl zopakován dvakrát, aby se zcela odstranily zbytky kultivačního média. Po druhém odstředění byl slit supernatant a pelet se nechal vyschnout několik minut při laboratorní teplotě. Poté byla k peletu



přidána v poměru 1:1 70% mravenčí kyselina a 100% acetonitril (v objemu 15-25 µl v závislosti na množství peletu), směs byla promíchána a opět centrifugována (14 500 ot./min, 2 min). Následně byl 1 µl supernatantu nanesen na MALDI destičku a ihned po uschnutí překryt 1 µl MALDI matrice (nasyčený roztok kyseliny  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicové v 50 % acetonitrilu, 47,5 % deionizované vody a 2,5 % kyseliny trifluoroctové; Bruker Daltonik). Připravená destička byla vložena do MALDI-TOF hmotnostního spektrometru (Bruker Daltonik). Vlastní identifikace byla realizována pomocí softwaru FlexControl (verze 3.4) na základě analýzy hmotnostních spekter s referenčními kmeny, uvedenými v databázi softwarem BioTyper (verze 2.0). Měření každého kmene bylo provedeno dvakrát.

#### **4.1.4 Identifikace pomocí sekvenování genu pro 16S rRNA**

Kmeny, které nebylo možné spolehlivě identifikovat pomocí MALDI-TOF MS, byly identifikovány sekvenováním genu pro 16S rRNA.

##### **4.1.4.1 Příprava buněčného lyzátu pro PCR**

Jeden ml čerstvě narostlé kultury byl sterilní stříkačkou přenesen do mikrocentrifugační zkumavky a odstředěn při 14,5 tis. ot./min po dobu 2 minut. Supernatant byl slit a k buněčnému peletu bylo pipetováno 100 µl PrepMan© Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems). Následně byl vzorek zvortexován a zahřát v termobloku na 100 °C po dobu 10 minut. Po zchlazení na laboratorní teplotu byl vzorek odstředěn (14,5 tis. ot./min, 2 min) a 50 µl supernatantu bylo přemístěno do nové mikrocentrifugační zkumavky. Takto připravený lyzát byl použit pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR).

##### **4.1.4.2 Amplifikace genu pro 16S rRNA**

Pro amplifikaci 16S rDNA byly použity primery fD1 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') a rP2 (5' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3') navržené ve studii Weisburg et al. (1991) s očekávanou velikostí PCR produktu okolo 1500 párů bází (pb). PCR byla prováděna v celkovém objemu reakční směsi 25 µl, obsahující 2 µl buněčného lyzátu, 1 µl každého primeru (10µM), 12,5 µl DreamTaq Green PCR Master Mixu (Thermo Fisher Scientific) a 8,5 µl PCR vody (Thermo Fisher Scientific). Amplifikace probíhala v automatickém termocykleru T100 (Bio-Rad).

Podmínky procesu PCR jsou uvedeny v následující Tabulce 6.

**Tabulka 6:** Podmínky procesu PCR

počáteční denaturace	92,0 °C	5 min	
denaturace	92,0 °C	1 min	
hybridizace	52,5 °C	90 s	35 cyklů
elongace	72,0 °C	2 min	
závěrečná elongace	72,0 °C	5 min	

#### 4.1.4.3 Gelová elektroforéza

##### 4.1.4.3.1 Příprava gelu

Vznik požadovaného PCR produktu byl ověřen elektroforeticky s použitím 1% agarózového gelu. Jeden gram agarózy byl smíchán se 100 ml 1×TAE pufru (40mM tris(hydroxymethyl)aminomethan, 20mM octová kyselina, 1mM EDTA; Fermentas) a zahříván v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění, zhruba po dobu 2-3 minut. Připravený gel byl ponechán při pokojové teplotě mírně zchladnout a poté do něj bylo přidáno 5 µl barviva GelRed (Biotium). Směs gelu s barvivem byla nalita do plastové formy s ELFO hřebenem pro vytvoření jamek k aplikaci vzorků a gel se nechal zatuhnout.

##### 4.1.4.3.2 Elektroforéza

Po zatuhnutí byl gel přemístěn do elektroforetické vany a do každé jamky bylo pipetováno 5 µl PCR produktu. Pro odečtení velikosti výsledného PCR produktu byl použit velikostní marker Mass Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific), taktéž v množství 5 µl na jamku. Separace probíhala při konstantním napětí 130 V po dobu 60 minut. Fragmenty DNA byly v gelu vizualizovány pomocí UV transiluminátoru (Bio-Rad) a byly pořízeny digitální snímky. Vzorky s dostatečně silnými bandy, které odpovídaly velikostí a nebyla u nich zaznamenána formace nespecifických PCR produktů, byly vybrány pro identifikaci sekvenováním.

##### 4.1.4.4 Purifikace vzorků vybraných pro identifikaci sekvenováním

PCR produkty byly purifikovány E.Z.N.A. Cycle Pure kitem (OMEGA bio-tek). K 20 µl PCR produktu bylo přidáno 5 objemů CP pufru (100 µl), směs byla důkladně promíchána a napipetována do HiBind DNA kolonky, umístěné ve sběrné mikrozkuhavce. Vzorky byly odstředěny při 14,5 tis. ot./min po dobu 60 sekund

při laboratorní teplotě a filtrát byl ze sběrné zkumavky odstraněn. Do kolonky bylo poté přidáno 700  $\mu$ l promývacího pufru a opět proběhla centrifugace za stejných podmínek, jako je uvedeno výše. Tento krok byl opakován dvakrát. Po odstranění filtrátu byla prázdná kolonka znovu odstředěna po dobu 2 min, aby došlo k odstranění zbytkového etanolu. Následně byla kolonka přenesena do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky, doprostřed kolonky bylo napipetováno 30-50  $\mu$ l elučního pufru, v závislosti na koncentraci PCR produktu, ponecháno 2 minuty při laboratorní teplotě a následně odstředěno po dobu 1 min. Filtrát obsahující přečištěný PCR produkt byl použit pro sekvenování.

#### 4.1.4.5 Sangerovo sekvenování 16S rDNA

Pět  $\mu$ l přečištěného PCR produktu bylo smícháno s 5  $\mu$ l primeru o 5  $\mu$ M koncentraci. Každý vzorek byl namíchán dvakrát, jednou s fD1 a podruhé rP2 primerem. Vlastní sekvenování 16S rDNA Sangerovou metodou bylo uskutečněno servisem GATC společnosti Eurofins Genomics.

Získaná data byla zpracována v programech Chromas Lite a BioEdit a s použitím programu BLAST porovnána se sekvencemi publikovanými v databázi nukleotidů GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI).

#### 4.1.5 Statistické vyhodnocení

Statistická analýza získaných dat byla provedena v programu Statistica 12 (StatSoft).

## 5 Výsledky

Celkem bylo hodnoceno 24 vzorků potravin rostlinného i živočišného původu. Všechny vzorky byly pasterovány při teplotě 85 °C po dobu 10 minut. Kontaminace sporulujícími bakteriemi byla prokázána v 19 vzorcích, přičemž se tyto mikroorganismy vyskytovaly ve všech zkoumaných skupinách potravin. Celkové počty nebylo možné stanovit z důvodu častého přerůstání a výsledky tudíž nejsou v práci uvedeny. *B. cereus* nebyl u žádného vzorku detekován. Četnost výskytu jednotlivých bakteriálních druhů v dané potravíně je uvedena v Tabulce 7.

Izolováno bylo 105 kmenů bakterií, z nichž bylo metodou MALDI-TOF MS (Bruker Biotyper) spolehlivě identifikováno 85, nejméně na úroveň rodu (36,25 % izolátů identifikováno na úroveň druhu (hodnoty skóre  $\geq 2,000$ ), 43,75 % izolátů na úroveň rodu (hodnoty skóre 1,700-1,999), u 20 % izolátů nebyla identifikace spolehlivá (hodnoty skóre  $\leq 1,699$ ). Celkem 73 kmenů patřilo mezi sporulující bakterie a všechny náležely do rodu *Bacillus*. Tyto byly rozděleny na základě druhu či skupiny a podrobeny statistickému hodnocení. Zbylých 12 bylo identifikováno jako bakterie nesporeující. Pomocí MALDI-TOF MS nebylo možné identifikovat 20 izolátů.

Pro sekvenování bylo vybráno celkem 9 kmenů, z nichž 6 patřilo k izolátům, které nebylo možné identifikovat pomocí MALDI-TOF MS. Další 3 vybrané kmene byly pomocí MALDI-TOF MS určeny na úroveň rodu či druhu a sloužily tedy k ověření shody obou metod.

**Tabulka 7:** Seznam vzorků potravin, jejich zařazení do skupin a výskyt bakteriální druhů

vzorek potraviny	druh rodu <i>Bacillus</i>	pozn. k danému druhu	celkem izolátů ve vzorku	celkem izolátů ve skupině
<b>výrobky z masa</b>				
hovězí bujon	<i>B. subtilis</i>	b	4	9
	<i>B. pumilus</i>	a	1	
	<i>B. atropheus</i>	b	1	
hovězí sušené maso natural	<i>B. megaterium</i>	a	2	
	<i>B. oleronius</i>	a	1	
<b>mléčné výrobky</b>				
cottage cheese	-		0	
pudingový dezert se šlehačkou čokoládový	<i>B. firmus</i>	a	3	6
	<i>B. thuringiensis</i>	b	1	
	<i>B. mycoides</i>	b	1	
ricotta	<i>B. mycoides</i>	b	1	
tvaroh polotučný	<i>B. licheniformis</i>	a	1	

**Tabulka 7** – pokračování: Seznam vzorků potravin, jejich zařazení do skupin a výskyt bakteriální druhů

vzorek potravin	druh rodu <i>Bacillus</i>	pozn. k danému druhu	celkem izolátů ve vzorku	celkem izolátů ve skupině
<b>koření</b>				
gulášové koření	-		0	
kari indické sypké	<i>B. subtilis</i>	b	5	
	<i>B. mojavensis</i>	b	3	
	<i>B. pumilus</i>	a	1	
kmín drcený	<i>B. pumilus</i>	a	2	
	<i>B. licheniformis</i>	a	1	
	<i>B. subtilis</i>	a	1	
pepř černý mletý	<i>B. subtilis</i>	b	5	31
	<i>B. pumilus</i>	a	2	
	<i>B. atropheus</i>	b	1	
skořice mletá	<i>B. mycooides</i>	a	2	
	<i>B. mojavensis</i>	b	1	
zázvor sušený	<i>B. pumilus</i>	a	3	
	<i>B. subtilis</i>	a	1	
paprika červená sladká	<i>B. atropheus</i>	b	1	
bazalka drhnutá	-		0	
zeleninové	<i>B. gibsonii</i>	a	1	
ochucovadlo	<i>B. atropheus</i>	b	1	
<b>bylinné čajové směsi</b>				
bylinný čaj se ženšenem	<i>B. licheniformis</i>	a	1	
čistící čaj s červenou řepou	<i>B. subtilis</i>	a	2	19
ovocný čaj	<i>B. pumilus</i>	b	11	
citronový se zázvorem	<i>B. safensis</i>	b	2	
	<i>B. mojavensis</i>	b	1	
	<i>B. sonorensis</i>	b	1	
<b>kakao a cereální směsi</b>				
kakaový prášek	<i>B. licheniformis</i>	b	4	7
holandského typu	<i>B. drentensis</i>	a	1	
cereální kaše čokoládová	<i>B. licheniformis</i>	a	1	
cereální kaše jablečná se skořicí	<i>B. megaterium</i>	a	1	
<b>výrobky z ovoce a džusy</b>				
ovocné pyré	<i>B. pumilus</i>	a	1	1
džus jablečný	-		0	
džus pomerančový	-		0	

Pozn.:

**a** – shodný výsledek identifikace u všech opakování a skóre

**b** – shodný výsledek identifikace u většiny skóre a/nebo všechny druhy navržené pro daný kmen náleží do stejné skupiny taxonomicky příbuzných druhů

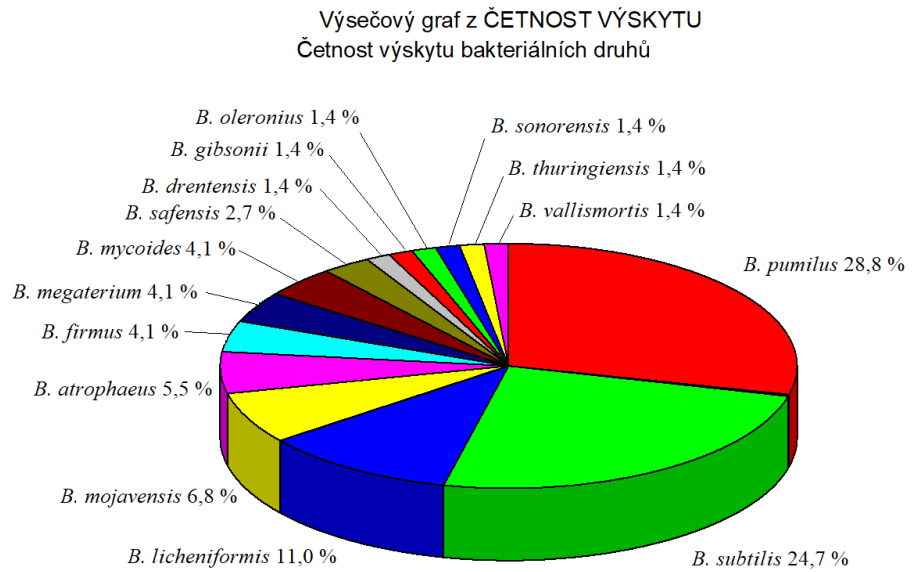
Nejvyšší počet různých druhů byl nalezen u dvou skupin potravin, a to u koření (7 druhů) a bylinných čajových směsí (7 druhů). Z potravin z masa s vysokým obsahem proteinů bylo izolováno 5 druhů, z mléčných výrobků 4 druhy, z kakaa a cereálních směsí 3 druhy a z výrobků z ovoce a zeleniny 1 druh.

Celkem bylo získáno 15 různých druhů rodu *Bacillus*. Ze statisticky hodnocených izolátů patřilo 86,30 % do skupiny *B. subtilis*, 5,48 % do skupiny *B. cereus* a 8,22 % izolátů nebylo zařazeno do žádné z těchto dvou skupin (viz Tabulka 8). Relativní četnosti výskytu jednotlivých druhů bakterií v souhrnu ve všech vzorcích potravin znázorňuje Tabulka 8 a Graf 1.

**Tabulka 8:** Relativní četnosti výskytu druhů rodu *Bacillus* souhrnně ve všech vzorcích

druh	skupina <i>B. subtilis</i> / <i>B. cereus</i> / nezařazený druh	počet izolátů*	relativní četnost výskytu v %*
<i>B. pumilus</i>	<i>B. subtilis</i>	21	28,8
<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	18	24,7
<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	8	11,0
<i>B. mojavensis</i>	<i>B. subtilis</i>	5	6,8
<i>B. atrophaeus</i>	<i>B. subtilis</i>	4	5,5
<i>B. firmus</i>	<i>B. subtilis</i>	3	4,1
<i>B. megaterium</i>	nezařazený druh	3	4,1
<i>B. mycoides</i>	<i>B. cereus</i>	3	4,1
<i>B. safensis</i>	<i>B. subtilis</i>	2	2,7
<i>B. drentensis</i>	nezařazený druh	1	1,4
<i>B. gibsonii</i>	nezařazený druh	1	1,4
<i>B. oleronius</i>	nezařazený druh	1	1,4
<i>B. sonorensis</i>	<i>B. subtilis</i>	1	1,4
<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i>	1	1,4
<i>B. vallismortis</i>	<i>B. subtilis</i>	1	1,4

\* vzhledem k celkovému počtu 73 izolátů sporulujících bakterií



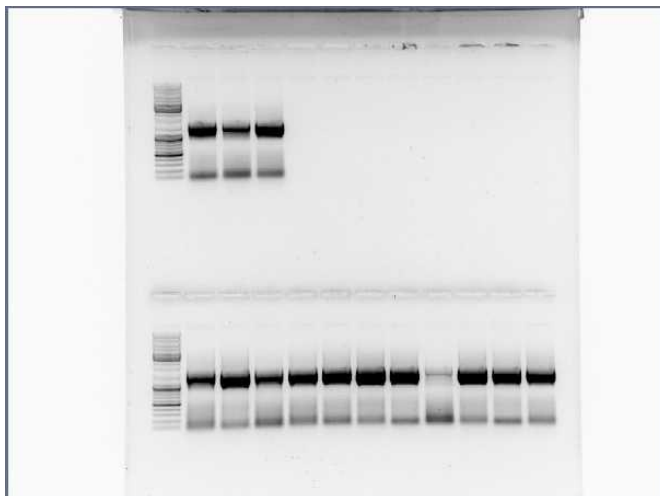
**Graf 1:** Relativní četnosti výskytu druhů rodu *Bacillus* souhrnně ve všech vzorcích (výstup z programu Statistica 12, upraveno)

Dále bylo u vybraných druhů bakterií a skupin potravin provedeno testování nezávislosti pomocí Pearsonova chí-kvadrát testu, v případě testování závislosti mezi výskytem *B. licheniformis* a kořením či bylinnými čajovými směsmi pomocí Fisherova faktoriálního testu z důvodu malých četností pro použití asociační tabulky. Dané výsledky byly prokázány na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Neexistuje statisticky významná závislost mezi výskytem jednotlivých skupin či druhů rodu *Bacillus* a typem potravin, neboť nebyl pozorován žádný trend. Jediný případ, ve kterém byla nalezena statisticky významná závislost, byl mezi *B. pumilus* a rostlinnými či živočišnými potravinami; jednalo se však pouze o závislost se slabou silou (0,2482815). Tabulkový výstup z Programu Statistica 12 je uveden v Příloze I.

## Výsledky elektroforetické separace vybraných kmenů

Na Obrázku 9 je znázorněn elektroforeogram výsledků PCR.



**Obrázek 9:** Elektroforeogram výsledků PCR

## Výsledky sekvenování vybraných kmenů

Tabulka 9 uvádí výsledky sekvenování vybraných kmenů.

**Tabulka 9:** Výsledky sekvenování vybraných kmenů

vzorek potraviný	% shody (podobnosti)	druh*
ovocný čaj citronový se zázvorem	100*	<i>B. zhangzhouensis</i>
		<i>B. safensis</i> subsp. <i>safensis</i>
ovocný čaj citronový se zázvorem	100*	<i>B. zhangzhouensis</i>
		<i>B. safensis</i> subsp. <i>safensis</i>
ovocný čaj citronový se zázvorem	100	<i>B. siamensis</i>
paprika červená sladká	99,91	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>
zázvor sušený	99,52	<i>B. pumilus</i>
čisticí čaj s červenou řepou	99,91*	<i>B. tequilensis</i>
		<i>B. subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>
hovězí bujón	100	<i>B. velezensis</i>
hovězí bujón	100	<i>B. megaterium</i>
hovězí bujón	100*	<i>B. zhangzhouensis</i>
		<i>B. safensis</i> subsp. <i>safensis</i>

\* shoda pro více druhů



## 6 Diskuze

Identifikace jednotlivých druhů rodu *Bacillus* a jemu příbuzných rodů bývá pomocí klasických mikrobiologických metod často obtížná, neboť úzce příbuzné druhy mají velmi podobné morfologické, biochemické i genetické charakteristiky. Zejména patrná je tato skutečnost mezi členy skupiny *B. cereus sensu lato*, která kromě *B. cereus* zahrnuje například *B. anthracis*, *B. thuringiensis* a *B. mycooides*, jež vykazují téměř identické 16S rRNA genové sekvence. Použití MALDI-TOF MS pro jejich identifikaci se proto díky schopnosti této metody rozlišit různé druhy patřící do stejného rodu zdá být vhodným řešením. Výhodou MALDI-TOF MS, oproti pracnějším a dražším sekvenování, je také snadná příprava vzorku a nízké náklady, které bývají uváděny o dvě třetiny nižší oproti konvenčním metodám (Böhme et al. 2011; Celandroni et al. 2016).

MALDI-TOF MS je spolehlivá a rychlá metoda hojně užívaná pro identifikaci a klasifikaci mikroorganismů, sporulující bakterie nevyjímaje (AlMasoud et al. 2014). Nicméně podmínky kultivace a s nimi související tvorba endospor ovlivňují přesnost metody. Při výzkumu vlivu rozdílné délky inkubace, teploty a médií bylo zjištěno, že po 24 hodinách kultivace jsou ovlivněna výsledná hmotnostní spektra tím, že dochází k mísení endospor a vegetativních buněk. Toto bylo zaznamenáno i při našem výzkumu. Vzhledem ke skutečnosti, že endospory mají odlišnou expresi proteinů ve srovnání s vegetativními buňkami, jsou tím ovlivněny profily hmotnostních spekter. Stejně tak teplota kultivace měla podle Shu & Yang (2017) vliv na hmotnostní spektra. Naopak nebyly zaznamenány žádné výrazné rozdíly ve hmotnostních spektrech při použití různých elektivních médií (Shu & Yang 2017). Kontrola podmínek kultivace je proto zásadní pro identifikaci a klasifikaci sporulujících bakterií pomocí MALDI-TOF MS (Böhme et al. 2011; Shu & Yang 2017). Úspěšná identifikace touto metodou vyžaduje, aby byly sledované kmeny analyzovány ve stejném fyziologickém stadiu (Schumann & Maier 2014). V našem experimentu probíhala kultivace aerobně při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Stejně či podobné podmínky jsou uváděny i u jiných autorů, například Böhme et al. (2011) uvádějí 24hodinovou aerobní kultivaci při 30 či 37 °C a AlMasoud et al. (2014) při 37 °C.

V neposlední řadě je jedním z klíčových požadavků pro úspěšné hodnocení pomocí MALDI-TOF MS sestavení a aktualizace hromadných databází, které umožňují charakterizovat experimentální data na základě odpovídajících profilů (Cherkaoui et al. 2010). Identifikace neznámého spektra je tak omezena na druhy uvedené v databázi (Böhme et al. 2011). Díky

výsledkům sekvenování v rámci našeho výzkumu, které byly v návaznosti na stanovení pomocí MALDI-TOF MS, by mohla být univerzitní databáze MALDI-TOF rozšířena o několik druhů rodu *Bacillus*. Mezi výsledky identifikace pomocí MALDI-TOF a sekvenováním byla shoda.

Hypotéza o závislosti výskytu a druhového zastoupení aerobních sporulujících bakterií na typu potraviny a způsobu konzervace nebyla potvrzena. Při porovnání našich výsledků s výsledky jiných autorů však byly shledány podobnosti ve výskytu některých druhů v daných potravinách.

V hovězím bujónu jsme zaznamenali výskyt *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. atrophaeus* a v sušeném mase jsme identifikovali *B. megaterium*. Nepodařilo se v literatuře pro srovnání dohledat, zda tyto druhy byly nalezeny i v jiném výzkumu. Vzhledem k tomu, že určité složky potravin, jako jsou tuky a soli, mohou působit ochranně proti hydrostatickému tlaku při zpracování a konzervaci potravin, čímž způsobují zpomalenou či neúplnou inaktivaci spor a mikroorganismů, je tento výskyt možný (Sevenich et al. 2015). Lee et al. (2015) uvádí, že v sušeném mase může být detekován také *B. cereus* kvůli značné schopnosti jeho spor přežít zpracování. Sušené maso je výživnou potravinou, vyznačující se díky nízkému obsahu vody delší trvanlivostí, kterou ale může snižovat právě bakteriální kontaminace (Kim et al. 2010). Je pravděpodobné, že výskyt bakterií v bujónu a sušeném mase podporuje vyšší obsah proteinů a lipidů v těchto potravinách. Stejně tomu může být i u mléčných výrobků.

Ve skupině mléčných výrobků se vyskytoval druh *B. firmus*, který uvádějí také další výzkumy (Heyndrickx & Scheldeman 2008; Lücking et al. 2013). V ricottě jsme zjistili druhy *B. thuringiensis* a *B. mycoides*. Oba tyto druhy náleží do skupiny *Bacillus cereus* a byly v ricottě popsány i u jiných autorů, kde způsobovaly její kažení a nežádoucí růžové zbarvení (Sattin et al. 2016). Spanu et al. (2016) zase zkoumali přirozenou kontaminaci sýru ricotta salata přímo *B. cereus*. Zjistili, že výskyt vegetativních buněk *B. cereus* se během skladování v chladu snížil. Jako rizikové vyhodnotili, že výroba sýru ricotta salata zahrnuje zahřívání syrovátky následované pomalým ochlazováním sraženin, při kterém hrozí riziko klíčení spor a následný růst bakterií schopných produkce toxinů.

V koření se vyskytovaly zejména druhy skupiny *Bacillus subtilis*, a to konkrétně *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* a *B. atrophaeus*. Také však byl nalezen druh *B. mycoides* patřící do skupiny *Bacillus cereus* nebo *B. gibsonii*, který není zařazen do žádné z těchto dvou skupin. Přítomnost některého z uvedených druhů v koření uvádějí i další autoři, například *B. subtilis*, *B. atrophaeus* (Gurtler & Keller 2019) a *B. licheniformis* (Klimešová et al. 2015). Frentzel et al. (2018) uvádí, že spory druhů skupiny *Bacillus cereus* jsou častým kontaminantem v potravinách včetně koření. Kontaminaci koření druhem *B. cereus*

uvádí také Fogele et al. (2018). Bohatá mikrobiální kontaminace koření bývá důsledkem mnoha faktorů, které ovlivňují kvalitu produktu. Mezi tyto faktory se řadí země původu, způsob pěstování a sklizně, zpracování, balení, doprava a skladování. Koření je zpravidla pěstováno v oblastech s teplým a vlhkým podnebím. Ačkoli bývá skladováno v suchu, při kontaktu se vzduchem o vyšší vlhkosti hrozí riziko vyšší pravděpodobnosti mikrobiálního znehodnocení (Fogele et al. 2018). V našem experimentu byly zvoleny levnější obchodní značky koření, u kterých lze předpokládat, že nebylo na výše zmíněné faktory prevence kontaminace tolik dbáno. Z tohoto důvodu bylo patrně ze skupiny koření získáno nejvíce izolátů ze všech zkoumaných skupin potravin. V počtu izolátů následovaly bylinné čajové směsi, které byly rovněž voleny v levnější cenové kategorii a obecně pro ně platí podobné faktory ovlivňující kvalitu.

Bylinné čajové směsi byly na rozmanitost bakteriálních druhů, stejně jako koření, bohaté. Zaznamenány byly druhy *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis* a *B. sonorensis*. Všechny tyto druhy se řadí do skupiny *Bacillus subtilis*. Výskyt prvních tří uvedených druhů v černém a zeleném čaji kromě dalších zástupců skupiny *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus* zmiňují například Carraturo et al. (2018). Stejně jako v případě koření, i u čajů a bylinných čajových směsí bývají vzduch a usazený prach v zařízeních na zpracování často kontaminovány bakteriemi, čímž se jen zvyšuje prvotní kontaminace komodity už z prvovýroby (Tournas & Katsoudas 2008).

Ve skupině kakaa a cereálních směsí se vyskytovaly *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. drentensis*, přičemž první dva uvedené druhy jsou poměrně běžné, stejně jako *B. subtilis* (Lima et al. 2011). Pereira & Sant'Ana (2018) také uvádějí výskyt *B. firmus* během fermentace kakaových bobů, je tedy možný i jeho přenos do výsledného produktu. Aerobní sporulující bakterie jsou v tomto případě nežádoucí kvůli produkci pektinolytických enzymů a dalších sloučenin, které mohou přispívat ke kyselosti kakaových bobů nebo dokonce vést ke vzniku nežádoucí chuti. Mezi tyto pro chuť nepříznivé sloučeniny se řadí například octová a mléčná kyselina, butan-2,3-diol či tetrametylpyrazin, které jsou produkovány rodem *Bacillus*. *B. subtilis*, *B. cereus* a *B. megaterium* produkují také volné mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které se vyskytují během aerobní fáze fermentace a rovněž způsobují nežádoucí chuť (Pereira & Sant'Ana 2018).

V ovocném pyré byl detekován *B. pumilus*, v ovocných džusech byl výskyt negativní, což by mohlo být způsobeno dobrou kvalitou vstupní suroviny nebo vyšším stupněm pasterace džusů, neboť Aneja et al. (2014) uvádějí v čerstvě připravených nepasterovaných džusech výskyt *B. subtilis* i *B. cereus*, Iqbal et al. (2015) také *B. subtilis*. Výsledky skladovacích pokusů

provedených Sevenich et al. (2015) dokazují přítomnost bakterií rodu *Bacillus* také v dětských přesnídávkách. Mezi kritické faktory ovlivňující mikrobiální kažení džusů a pyré patří hodnota pH, oxidačně-redukční potenciál, aktivita vody, dostupnost živin, přítomnost antimikrobiálních látek a konkurenční mikrobioty (Aneja et al. 2014). Při testování džusů se předpokládal růst zejména acidotolerantních či acidofilních bakterií, například z rodu *Alicyclobacillus*, které se však izolovat nepodařilo. Možným řešením pro izolaci těchto bakterií při dalším výzkumu by bylo vhodně upravit médium okyselením.

Rozhodně lze očekávat, že cílený výzkum zaměřený na výskyt aerobních sporulujících bakterií v různých potravinách může přispět k lepšímu zpracování a optimalizaci kvality potravinářských produktů.

## 7 Závěr

V praktické části práce byla u vybraných druhů potravin rostlinného i živočišného původu zkoumána kontaminace aerobními sporulujícími bakteriemi a závislost výskytu a druhového zastoupení těchto bakterií na typu potravin a způsobu konzervace.

Kontaminace těmito mikroorganismy byla prokázána v 19 ze 24 vzorků, přičemž se aerobní sporulující bakterie vyskytovaly ve všech zkoumaných skupinách potravin. Celkem bylo identifikováno 15 různých druhů a všechny náležely do rodu *Bacillus*. Nejvyšší počet různých druhů byl nalezen u koření a bylinných čajových směsí. Nicméně žádný druh se nevyskytoval u všech zkoumaných skupin potravin. Nejrozšířenějšími druhy byly *B. pumilus* (28,8 %), *B. subtilis* (24,7 %) a *B. licheniformis* (11,0 %). Do skupiny *B. subtilis* bylo zařazeno 86,30 % izolátů, do skupiny *B. cereus* 5,48 % a 8,22 % nebylo zařazeno do žádné z těchto dvou skupin. *B. cereus* nebyl detekován.

S ohledem na skutečnost, že v testovaných vzorcích nebyl zjištěn žádný primárně patogenní druh, není zdravotní riziko pravděpodobné.

Závislost výskytu a druhového zastoupení bakterií na typu potravin a způsobu konzervace nebyla potvrzena, neboť nebyl pozorován žádný trend.

Přestože v současnosti obsahuje databáze MALDI-TOF okolo 100 druhů bacilů, nepokrývá všechny druhy běžně se vyskytující v potravinách a měla by být pro účely spolehlivé identifikace rozšířena. Konkrétně se jedná o druhy *B. siamensis*, *B. tequilensis*, *B. velezensis*, *B. zhangzhouensis* a další.

## 8 Literatura

- Ahire JJ, Kashikar MS, Lakshmi SG, Madempudi R. 2020. Identification and characterization of antimicrobial peptide produced by indigenously isolated *Bacillus paralicheniformis* UBBLi30 strain. *3 Biotech* **10**:1–13.
- Albert I, Alfonso G, Victor F. 2014. Ultraviolet in food preservation and processing. *Conventional and Advanced Food Processing Technologies*.1–712.
- AlMasoud N, Xu Y, Nicolaou N, Goodacre R. 2014. Optimization of matrix assisted desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) for the characterization of *Bacillus* and *Brevibacillus* species. *Analytica Chimica Acta* **840**:49–57.
- André S, Vallaëys T, Planchon S. 2017. Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Research in Microbiology* **168**:379–387.
- Aneja KR, Dhiman R, Aggarwal NK, Kumar V, Kaur M. 2014. Microbes associated with freshly prepared juices of citrus and carrots. *International Journal of Food Science* **2014**:1–7.
- Anjos MM, Ruiz SP, Abreu Filho BA. 2014. Evaluation of different culture media and enrichment in orange juice upon the growth of *Alicyclobacillus* spp. *Arquivos do Instituto Biológico* **81**:113–118.
- Apetroaie-Constantin C, Mikkola R, Andersson MA, Teplova V, Suominen I, Johansson T, Salkinoja-Salonen M. 2009. *Bacillus subtilis* and *B. mojavensis* strains connected to food poisoning produce the heat stable toxin amyloisin. *Journal of Applied Microbiology* **106**:1976–1985.
- Azizbekyan RR, Didenko L V., Smirnova TA, Kuzin AI, Shevlyagina N V., Zubasheva M V., Nikolaenko MA. 2015. Biofilm formation and sporulation in *Brevibacillus laterosporus*. *Applied Biochemistry and Microbiology* **51**:866–872.
- Bader J, Albin A, Stahl U. 2012. Spore-forming bacteria and their utilisation as probiotics. *Beneficial Microbes* **3**:67–75.
- Baumgart J. 2003. Media for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* in foods. *Progress in Industrial Microbiology* **37**:161–166.
- Berthold-Pluta A, Pluta A, Garbowska M. 2015. The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract. *Microbial Pathogenesis* **82**:7–14.
- Böhme K, Fernández-No IC, Barros-Velázquez J, Gallardo JM, Cañas B, Calo-Mata P. 2011. Rapid species identification of seafood spoilage and pathogenic Gram-positive bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis* **32**:2951–2965.
- Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R. 2006. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology* **59**:1229–1238.
- Burgess SA, Lindsay D, Flint SH. 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology* **144**:215–225.
- Carlin F, Brillard J, Broussolle V, Clavel T, Duport C, Jobin M, Guinebretière MH, Auger S, Sorokine A, Nguyen-Thé C. 2010. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Research International* **43**:1885–1894.
- Carraturo F, De Castro O, Troisi J, De Luca A, Masucci A, Cennamo P, Trifuoggi M, Aliberti F, Guida M. 2018. Comparative assessment of the quality of commercial black and green tea using microbiology analyses. *BMC Microbiology* **18**:1–12.
- Caspers MPM, Boekhorst J, Abee T, Siezen RJ, Kort R. 2013. Complete genome sequence of *Anoxybacillus flavithermus* TNO-09.006, a thermophilic sporeformer associated with a

- dairy-processing environment. *Genome Announcements* **1**:9–10.
- Caulier S, Nannan C, Gillis A, Licciardi F, Bragard C, Mahillon J. 2019. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology* **10**:1–19.
- Celandroni F, Salvetti S, Gueye SA, Mazzantini D, Lupetti A, Senesi S, Ghelardi E. 2016. Identification and pathogenic potential of clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* isolates. *PLoS ONE* **11**:1–13.
- Celandroni F, Vecchione A, Cara A, Mazzantini D, Lupetti A, Ghelardi E. 2019. Identification of *Bacillus* species: Implication on the quality of probiotic formulations. *PLoS ONE* **14**:1–13.
- Chang S Sen, Kang DH. 2004. *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: History, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical Reviews in Microbiology* **30**:55–74.
- Checinska A, Paszczynski A, Burbank M. 2015. *Bacillus* and Other Spore-Forming Genera: Variations in Responses and Mechanisms for Survival. *Annual Review of Food Science and Technology* **6**:351–369.
- Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, Schrenzel J. 2010. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *Journal of Clinical Microbiology* **48**:1169–1175.
- Chhetri V, Prakitchaiwattana C, Settachaimongkon S. 2019. A potential protective culture; halophilic *Bacillus* isolates with bacteriocin encoding gene against *Staphylococcus aureus* in salt added foods. *Food Control* **104**:292–299.
- Cho W Il, Chung MS. 2017. Antimicrobial effect of a combination of herb extract and organic acid against *Bacillus subtilis* spores. *Food Science and Biotechnology* **26**:1423–1428.
- Chon JW, Song KY, Kim H, Seo KH. 2014. Comparison of 3 selective media for enumeration of *Bacillus cereus* in several food matrixes. *Journal of Food Science* **79**:M2480–M2484.
- Ciesiolka J, Jezowska-Bojczuk M, Wrzesiński J, Stokowa-Sołtys K, Nagaj J, Kasproicz A, Błaszczuk L, Szczepanik W. 2014. Antibiotic bacitracin induces hydrolytic degradation of nucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1840**:1782–1789.
- Ciuffreda E, Bevilacqua A, Sinigaglia M, Corbo M. 2015. *Alicyclobacillus* spp.: New Insights on Ecology and Preserving Food Quality through New Approaches. *Microorganisms* **3**:625–640.
- Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. 2013. Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* **26**:547–603.
- Concina I, Bornšek M, Baccelliere S, Falasconi M, Gobbi E, Sberveglieri G. 2010. *Alicyclobacillus* spp.: Detection in soft drinks by Electronic Nose. *Food Research International* **43**:2108–2114.
- Cutting SM, Hong HA, Baccigalupi L, Ricca E. 2009. Oral vaccine delivery by recombinant spore probiotics. *International Reviews of Immunology* **28**:487–505.
- Daryaei H, Balasubramaniam VM, Yousef AE, Legan JD, Tay A. 2016. Lethality enhancement of pressure-assisted thermal processing against *Bacillus amyloliquefaciens* spores in low-acid media using antimicrobial compounds. *Food Control* **59**:234–242.
- De Bellis P, Minervini F, Di Biase M, Valerio F, Lavermicocca P, Sisto A. 2015. Toxigenic potential and heat survival of spore-forming bacteria isolated from bread and ingredients. *International Journal of Food Microbiology* **197**:30–39.
- De Jonghe V, Coorevits A, De Block J, Van Coillie E, Grijspeerdt K, Herman L, De Vos P, Heyndrickx M. 2010. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers

- isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology* **136**:318–325.
- Dey P. 2018. *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore.
- Dijl JM van, Hecker M. 2013. *Bacillus subtilis*: From Soil Bacterium to Super-Secreting Cell Factory. *Microbial Cell Factories* **12**:1–6.
- Dinh Thanh M, Frentzel H, Fetsch A, Krause G, Appel B, Mader A. 2018. Tenacity of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in dried spices and herbs. *Food Control* **83**:75–84.
- Dos Anjos MM, Ruiz SP, Nakamura CV, De Abreu Filho BA. 2013. Resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores and biofilm to industrial sanitizers. *Journal of Food Protection* **76**:1408–1413.
- Durand L, Planchon S, Guinebretiere MH, Carlin F, Remize F. 2015. Genotypic and phenotypic characterization of foodborne *Geobacillus stearothermophilus*. *Food Microbiology* **45**:103–110.
- Ehling-Schulz M, Lereclus D, Koehler TM. 2019. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum* **7**:1–35.
- Ehtisham M, Wani F, Wani I, Kaur P, Nissar S. 2016. Polymerase Chain Reaction (PCR): Back to Basics. *Indian Journal of Contemporary Dentistry* **4**:30.
- El Saleeby CM, Howard S, Hayden R, McCullers JA. 2004. Association Between Tea Ingestion and Invasive *Bacillus cereus* Infection in Children With Cancer: a Case Control Study. *Journal of Investigative Medicine* **52**:S314.1-S314.
- Elshaghabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H. 2017. *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology* **8**:1–15.
- ElZamkan M, Mubarak A. 2017. Detection of *B. cereus* and Some of Its Virulence Genes in Some Dairy Desserts and Children Diarrhea. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences* **53**:28.
- Failor KC, Tian L, Monteil CL, Vinatzer BA. 2019. *Lysinibacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Springer Nature Switzerland AG, Switzerland.
- Fink R, Oder M, Stražar E, Filip S. 2017. Efficacy of cleaning methods for the removal of *Bacillus cereus* biofilm from polyurethane conveyor belts in bakeries. *Food Control* **80**:267–272.
- Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. 2016. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* **14**:563–575.
- Flint S, Gonzaga ZJ, Good J, Palmer J. 2017. *Bacillus thermoamylovorans* – A new threat to the dairy industry – A review. *International Dairy Journal* **65**:38–43.
- Fogele B, Granta R, Valciņa O, Bērziņš A. 2018. Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. *Food Control* **83**:69–74.
- Frentzel H, Thanh MD, Krause G, Appel B, Mader A. 2018. Quantification and differentiation of *Bacillus cereus* group species in spices and herbs by real-time PCR. *Food Control* **83**:99–108.
- From C, Hormazabal V, Granum PE. 2007. Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *International Journal of Food Microbiology* **115**:319–324.
- Fünfhaus A, Göbel J, Ebeling J, Knispel H, Garcia-Gonzalez E, Genersch E. 2018. Swarming motility and biofilm formation of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American Foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*). *Scientific Reports* **8**:1–12.
- Gayán E, Condón S, Álvarez I. 2014. Biological Aspects in Food Preservation by Ultraviolet Light: A Review. *Food and Bioprocess Technology* **7**:1–20.
- Goh KM, Kahar UM, Chai YY, Chong CS, Chai KP, Ranjani V, Illias RM, Chan KG. 2013. Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**:1475–1488.



- Gopal N, Hill C, Ross PR, Beresford TP, Fenelon MA, Cotter PD. 2015. The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Frontiers in Microbiology* **6**:1–18.
- Goto K, Mochida K, Asahara M, Suzuki M, Kasai H, Yokota A. 2003. *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess  $\omega$ -alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**:1537–1544.
- Goto K, Mochida K, Kato Y, Asahara M, Fujita R, An SY, Kasai H, Yokota A. 2007. Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangiidus* sp. nov., *Alicyclobacillus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**:1276–1285.
- Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A, Yuan ZC. 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: A review. *Microbial Cell Factories* **15**:1–18.
- Grutsch AA, Nimmer PS, Pittsley RH, McKillip JL. 2018. *Bacillus* spp. as Pathogens in the Dairy Industry. In: *Foodborne Diseases*. Elsevier Inc., Netherlands.
- Guo X, You XY, Liu LJ, Zhang JY, Liu SJ, Jiang CY. 2009. *Alicyclobacillus aeris* sp. nov., a novel ferrous-and sulfur-oxidizing bacterium isolated from a copper mine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**:2415–2420.
- Gupta S, Anand S. 2018. Induction of pitting corrosion on stainless steel (grades 304 and 316) used in dairy industry by biofilms of common sporeformers. *International Journal of Dairy Technology* **71**:519–531.
- Gurtler JB, Keller SE. 2019. Microbiological Safety of Dried Spices. *Annual Review of Food Science and Technology* **10**:409–427.
- Harwood CR, Mouillon JM, Pohl S, Arnau J. 2018. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiology Reviews* **42**:721–738.
- Helgason E, Økstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, Hegna I, Kolstø AB. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* - One species on the basis of genetic evidence. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:2627–2630.
- Heyndrickx M. 2011. The Importance of Endospore-Forming Bacteria Originating from Soil for Contamination of Industrial Food Processing. *Applied and Environmental Soil Science* **2011**:1–11.
- Heyndrickx M, Scheldeman P. 2008. Bacilli Associated with Spoilage in Dairy Products and Other Food. *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*:64–82.
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **11**:506–514.
- Hong HA, Khaneja R, Tam NMK, Cazzato A, Tan S, Urdaci M, Brisson A, Gasbarrini A, Barnes I, Cutting SM. 2009. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Research in Microbiology* **160**:134–143.
- Horneck G, Klaus DM, Mancinelli RL. 2010. Space Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74**:121–156.
- Idelevich EA, Pogoda CA, Ballhausen B, Wüllenweber J, Eckardt L, Baumgartner H, Waltenberger J, Peters G, Becker K. 2013. Pacemaker lead infection and related bacteraemia caused by normal and small colony variant phenotypes of *Bacillus licheniformis*. *Journal of Medical Microbiology* **62**:940–944.
- Iqbal MN, Anjum AA, Ali MA, Hussain F, Ali S, Muhammad A, Irfan M, Ahmad A, Shabbir A. 2015. Assessment of Microbial Load of Un-pasteurized Fruit Juices Antibacterial

- Potential of Honey Against Bacterial Isolates. *The Open Microbiology Journal* **9**:26–32.
- Ivy RA, Ranieri ML, Martin NH, den Bakker HC, Xavier BM, Wiedmann M, Boor KJ. 2012. Identification and characterization of psychrotolerant sporeformers associated with fluid milk production and processing. *Applied and Environmental Microbiology* **78**:1853–1864.
- Jeong H, Choi SK, Ryu CM, Park SH. 2019. Chronicle of a soil bacterium: *Paenibacillus polymyxa* E681 as a Tiny Guardian of Plant and Human Health. *Frontiers in Microbiology* **10**:1–16.
- Jeßberger N, Dietrich R, Bock S, Didier A, Märtilbauer E. 2014. *Bacillus cereus* enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. *Toxicon* **77**:49–57.
- Jiang CY, Liu Y, Liu YY, You XY, Guo X, Liu SJ. 2008. *Alicyclobacillus ferrooxydans* sp. nov., a ferrous oxidizing bacterium from solfataric soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**:2898–2903.
- Jindal S, Anand S. 2018. Comparison of adhesion characteristics of common dairy sporeformers and their spores on unmodified and modified stainless steel contact surfaces. *Journal of Dairy Science* **101**:5799–5808.
- Kämpfer P, Martin K, Glaeser SP. 2013. *Lysinibacillus contaminans* sp. nov., isolated from surface water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**:3148–3153.
- Kayath AC, Voudibio MAB, Mokémiabeka SN, Kaya-Ongoto MD, Nguimbi E. 2019. The Genus *Lysinibacillus*: Versatile Phenotype and Promising Future. *International Journal of Science and Research* **8**:1238–1242
- Khan N, Mishra A, Chauhan PS, Nautiyal CS. 2011. Induction of *Paenibacillus lentimorbus* biofilm by sodium alginate and CaCl<sub>2</sub> alleviates drought stress in chickpea. *Annals of Applied Biology* **159**:372–386.
- Kim HJ, Chun HH, Song HJ, Song K Bin. 2010. Effects of electron beam irradiation on the microbial growth and quality of beef jerky during storage. *Radiation Physics and Chemistry* **79**:1165–1168.
- Kimouli M, Vrioni G, Papadopoulou M, Koumaki V, Petropoulou D, Gounaris A, Friedrich AW, Tsakris A. 2012. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants. *Journal of Medical Microbiology* **61**:596–599.
- Klimešová M, Horáček J, Ondřej M, Manga I, Koláčková I, Nejeschlebová L, Ponížil A. 2015. Microbial contamination of spices used in production of meat products. *Potravinarstvo* **9**:154–159.
- Kralik P, Ricchi M. 2017. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology* **8**:1–9.
- Lee NK, Kim HW, Lee JY, Ahn DU, Kim CJ, Paik HD. 2015. Antimicrobial effect of nisin against *Bacillus cereus* in beef jerky during storage. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* **35**:101–107.
- Lee NK, Kim WS, Paik HD. 2019. *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Science and Biotechnology* **28**:1297–1305.
- Li F, Hunt K, Van Hoorde K, Butler F, Jordan K, Tobin JT. 2019. Occurrence and identification of spore-forming bacteria in skim-milk powders. *International Dairy Journal* **97**:176–184.
- Lima LJR, Kamphuis HJ, Nout MJR, Zwietering MH. 2011. Microbiota of cocoa powder with particular reference to aerobic thermoresistant spore-formers. *Food Microbiology* **28**:573–582.
- Liu X, Huang M, Zhang H, Li W, Pang Z, Lin P, Qian H. 2016. Application of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in *Bacillus cereus* typing. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **9**:9497–9502.

- Logan NA, Vos P De. 2015. *Brevibacillus*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Springer Nature Switzerland AG, Switzerland.
- Logan NA, Vos P De, Dinsdale A. 2015. *Geobacillus*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Springer Nature Switzerland AG, Switzerland.
- Lopez-Canovas L, Martinez Benitez MB, Herrera Isidron JA, Flores Soto E. 2019. Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future. *Analytical Biochemistry* **573**:17–29.
- Lücking G, Stoeckel M, Atamer Z, Hinrichs J, Ehling-Schulz M. 2013. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology* **166**:270–279.
- Margosch D, Gänzle MG, Ehrmann MA, Vogel RF. 2004. Pressure Inactivation of *Bacillus* Endospores. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:7321–7328.
- Martinez BA, Stratton J, Bianchini A. 2017. Isolation and genetic identification of spore-forming bacteria associated with concentrated-milk processing in Nebraska. *Journal of Dairy Science* **100**:919–932.
- Maughan H, Van der Auwera G. 2011. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution* **11**:789–797.
- Murray PR. 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection* **16**:1626–1630.
- Namwong S, Hiraga K, Takada K, Tsunemi M, Tanasupawat S, Oda K. 2006. A halophilic serine proteinase from *Halobacillus* sp. SR5-3 isolated from fish sauce: Purification and characterization. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **70**:1395–1401.
- Neoh H min, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. 2019. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infection, Genetics and Evolution* **74**:103935.
- Noma S, Kiyohara K, Hirokado R, Yamashita N, Migita Y, Tanaka M, Furukawa S, Ogihara H, Morinaga Y, Igura N, Shimoda M. 2018. Increase in hydrophobicity of *Bacillus subtilis* spores by heat, hydrostatic pressure, and pressurized carbon dioxide treatments. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **125**:327–332.
- Ostrov I, Sela N, Belausov E, Steinberg D, Shemesh M. 2019. Adaptation of *Bacillus* species to dairy associated environment facilitates their biofilm forming ability. *Food Microbiology* **82**:316–324.
- Panda AK, Bisht SS, DeMondal S, Senthil Kumar N, Gurusubramanian G, Panigrahi AK. 2014. *Brevibacillus* as a biological tool: A short review. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **105**:623–639.
- Patrone V, Molinari P, Morelli L. 2016. Microbiological and molecular characterization of commercially available probiotics containing *Bacillus clausii* from India and Pakistan. *International Journal of Food Microbiology* **237**:92–97.
- Pepe O, Blaiotta G, Moschetti G, Greco T, Villani F. 2003. Rope-producing strains of *Bacillus* spp. from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:2321–2329.
- Pereira APM, Sant'Ana AS. 2018. Diversity and fate of spore forming bacteria in cocoa powder, milk powder, starch and sugar during processing: A review. *Trends in Food Science and Technology* **76**:101–118.
- Pikuta E V. 2015. *Anoxybacillus*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Springer Nature Switzerland AG, Switzerland.
- Pornpukdeewattana S, Jindaprasert A, Massa S. 2019. *Alicyclobacillus* spoilage and control - a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **0**:1–15.
- Prado DB do, Fernandes M da S, dos Anjos MM, Tognim MCB, Nakamura CV, Machinski Junior M, Mikcha JMG, de Abreu Filho BA. 2018. Biofilm-forming ability of

- Alicyclobacillus* spp. isolates from orange juice concentrate processing plant. *Journal of Food Safety* **38**:1–7.
- Priest FG. 2015. *Paenibacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Springer Nature Switzerland AG, Switzerland.
- Prod'hom G, Bille J. 2017. Aerobic Gram-Positive Bacilli. *Infectious Diseases* **2**: 1537-1552.
- Ragul K, Syiem I, Sundar K, Shetty PH. 2017. Characterization of probiotic potential of *Bacillus* species isolated from a traditional brine pickle. *Journal of Food Science and Technology* **54**:4473–4483.
- Remize F. 2016. Spore-Forming Bacteria. In: *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*. Woodhead Publishing, United Kingdom.
- Ricca E, Cutting SM. 2003. Emerging applications of bacterial spores in nanobiotechnology. *Journal of Nanobiotechnology* **1**:1–10.
- Ripert G, Racedo SM, Elie AM, Jacquot C, Bressollier P, Urdaci MC. 2016. Secreted compounds of the probiotic *Bacillus clausii* strain O/C inhibit the cytotoxic effects induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* toxins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60**:3445–3454.
- Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R. 2010. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:2230–2234.
- Sadiq FA, Flint S, He GQ. 2018. Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria. *International Dairy Journal* **85**:159–168.
- Salomão B de CM, Muller C, do Amparo HC, de Aragão GMF. 2014. Survey of molds, yeast and *Alicyclobacillus* spp. from a concentrated apple juice productive process. *Brazilian Journal of Microbiology* **45**:49–58.
- Sattin E, Andreani NA, Carraro L, Fasolato L, Balzan S, Novelli E, Squartini A, Telatin A, Simionati B, Cardazzo B. 2016. Microbial dynamics during shelf-life of industrial ricotta cheese and identification of a *Bacillus* strain as a cause of a pink discolouration. *Food Microbiology* **57**:8–15.
- Scheldeman P, Goossens K, Rodriguez-Diaz M, Pil A, Goris J, Herman L, De Vos P, Logan NA, Heyndrickx M. 2004. *Paenibacillus lactis* sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:885–891.
- Schumann P, Maier T. 2014. MALDI-TOF mass spectrometry applied to classification and identification of bacteria. In: *Methods in Microbiology*. Elsevier, Netherlands.
- Sevenich R, Bark F, Kleinstueck E, Crews C, Pye C, Hradecky J, Reineke K, Lavilla M, Martinez-de-Maranon I, Briand JC, Knorr D. 2015. The impact of high pressure thermal sterilization on the microbiological stability and formation of food processing contaminants in selected fish systems and baby food puree at pilot scale. *Food Control* **50**:539–547.
- Shaheen R, Svensson B, Andersson MA, Christiansson A, Salkinoja-Salonen M. 2010. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiology* **27**:347–355.
- Shu LJ, Yang YL. 2017. *Bacillus* Classification Based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry - Effects of Culture Conditions. *Scientific Reports* **7**:6–15.
- Silva AA, Santos IF, Anjos MM, Pascoli IC, Ruiz SP, Graton Mikcha JM, Machinski Junior M, Ueda Nakamura T, Nakamura C V., Abreu Filho BA. 2019. Evaluation of the antibacterial and sporicidal activity of the essential oils of *Copaifera multijuga* and *Thymus vulgaris* against *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *International Food Research Journal* **26**:1327–1337.

- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* **6**:1–16.
- Smit Y, Cameron M, Venter P, Witthuhn RC. 2011. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation - A review. *Food Microbiology* **28**:331–349.
- Spanu C, Scarano C, Spanu V, Pala C, Casti D, Lamon S, Cossu F, Ibba M, Nieddu G, De Santis EPL. 2016. Occurrence and behavior of *Bacillus cereus* in naturally contaminated ricotta salata cheese during refrigerated storage. *Food Microbiology* **58**:135–138.
- Spring S. 2015. *Halobacillus*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Springer Nature Switzerland AG, Switzerland.
- Steyn CE, Cameron M, Witthuhn RC. 2011. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment - A review. *International Journal of Food Microbiology* **147**:1–11.
- Stoeckel M, Lücking G, Ehling-Schulz M, Atamer Z, Hinrichs J. 2016. Bacterial spores isolated from ingredients, intermediate and final products obtained from dairies: thermal resistance in milk. *Dairy Science and Technology* **96**:569–577.
- Studholme DJ. 2015. Some (bacilli) like it hot: Genomics of *Geobacillus* species. *Microbial Biotechnology* **8**:40–48.
- Surya W, Chooduang S, Choong YK, Torres J, Boonserm P. 2016. Binary toxin subunits of *Lysinibacillus sphaericus* are monomeric and form heterodimers after in vitro activation. *PLoS ONE* **11**:1–14.
- Talebi S, Makhdoumi A, Bahreini M, Matin MM, Moradi HS. 2018. Three novel *Bacillus* strains from a traditional lacto-fermented pickle as potential probiotics. *Journal of Applied Microbiology* **125**:888–896.
- Tawil G, Viksø-Nielsen A, Rolland-Sabaté A, Colonna P, Buléon A. 2012. Hydrolysis of concentrated raw starch: A new very efficient  $\alpha$ -amylase from *Anoxybacillus flavothermus*. *Carbohydrate Polymers* **87**:46–52.
- Tournas VH, Katsoudas EJ. 2008. Microbiological Quality of Various Medicinal Herbal Teas and Coffee Substitutes. *Microbiology Insights* **1**:MBI.S943.
- Tremarin A, Brandão TRS, Silva CLM. 2017. Inactivation kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice submitted to ultraviolet radiation. *Food Control* **73**: 18–23.
- Wassmann M, Moeller R, Rabbow E, Panitz C, Horneck G, Reitz G, Douki T, Cadet J, Stan-Lotter H, Cockell CS, Rettberg P. 2012. Survival of spores of the UV-Resistant *Bacillus subtilis* strain MW01 after exposure to low-earth orbit and simulated martian conditions: Data from the space experiment ADAPT on EXPOSE-E. *Astrobiology* **12**:498–507.
- Webb MD, Barker GC, Goodburn KE, Peck MW. 2019. Risk presented to minimally processed chilled foods by psychrotrophic *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science and Technology* **93**:94–105.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**:697–703.
- Witthuhn M, Lücking G, Atamer Z, Ehling-Schulz M, Hinrichs J. 2011. Thermal resistance of aerobic spore formers isolated from food products. *International Journal of Dairy Technology* **64**:486–493.
- Yanagida F, Suzuki K. 2015. *Sporolactobacillus*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Springer Nature Switzerland AG, Switzerland.
- Yassin N, Ahmad A. 2012. Incidence and Resistotyping Profiles of *Bacillus subtilis* Isolated from Azadi Teaching Hospital in Duhok City, Iraq. *Materia Socio Medica* **24**:194.

- Yu CS, Yim KY, Tsui SKW, Chan TF. 2012. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* strain QB928, a strain widely used in *B. subtilis* genetic studies. *Journal of Bacteriology* **194**:6308–6309.
- Yu Z, Sun Z, Yin J, Qiu J. 2018. Enhanced production of polymyxin E in *Paenibacillus polymyxa* by replacement of glucose by starch. *BioMed Research International* **2018**: Article ID 1934309.
- Zeigler DR. 2014. The *Geobacillus* paradox: Why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet? *Microbiology (United Kingdom)* **160**:1–11.
- Zhao D, Barrientos JU, Wang Q, Markland SM, Churey JJ, Padilla-Zakour OI, Worobo RW, Kniel KE, Moraru CI. 2015. Efficient reduction of pathogenic and spoilage microorganisms from apple cider by combining microfiltration with UV treatment. *Journal of Food Protection* **78**:716–722.

### Internetové zdroje:

**URL 1:** Sigma Aldrich. 2018. *Tryptic Soy Agar*. Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/22091dat.pdf> (accessed February 2020)

**URL 2:** Oxoid. *Dehydrated Culture Media. MYP agar*. Oxoid Limited, Thermo Fisher Scientific Inc. Available from: [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0929&c=UK&lang=EN&org=91&img=CM0929&sec](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0929&c=UK&lang=EN&org=91&img=CM0929&sec) (accessed February 2020)

**URL 3:** Hardy Diagnostics. *Instructions for Use. Mannitol Yolk Polymyxin (MYP) Agar*. Hardy Diagnostics, California, USA. Available from: [https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/Content/hugo/MYPAgar.html](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/MYPAgar.html) (accessed February 2020)

**URL 5:** Liofilchem Diagnostici. *Bacillus cereus agar (PEMBA). Technical Sheet*. LIOFILCHEM® s.r.l., Italy. Available from: [http://www.liofilchem.net/login/pd/ts/10007\\_TS.pdf](http://www.liofilchem.net/login/pd/ts/10007_TS.pdf) (accessed February 2020)

**URL 7:** HIMEDIA. 2017. *HiCrome Bacillus Agar. Technical Data*. HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India. Available from: <http://himedialabs.com/TD/M1651.pdf> (accessed February 2020)

**URL 8:** Oxoid. *Dehydrated Culture Media. Brilliance Bacillus cereus agar*. Oxoid Limited, Thermo Fisher Scientific Inc. Available from: [http://www.oxoid.com/uk/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM1036&c=uk&lang=EN&org=9&img=CM1036C&sec=](http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1036&c=uk&lang=EN&org=9&img=CM1036C&sec=) (accessed February 2020)

**URL 9:** CHROMagar. *CHROMagar B. cereus*. CHROMagar, Paris, France. Available from: [http://www.chromagar.com/fichiers/1542731533LF\\_EXT\\_034\\_BC\\_V4.0.pdf](http://www.chromagar.com/fichiers/1542731533LF_EXT_034_BC_V4.0.pdf) (accessed February 2020)

**Internetové zdroje obrázků:**

**URL 4:** Oxoid. *Dehydrated Culture Media. MYP agar*. Oxoid Limited, Thermo Fisher Scientific Inc. Available from: [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0929&c=UK&lang=EN&org=91&img=CM0929&sec](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0929&c=UK&lang=EN&org=91&img=CM0929&sec) (accessed February 2020)

**URL 6:** EOLabs. 2018. *Bacillus cereus Selective Agar (PEMBA)*. E&O Laboratories Ltd., Scotland, UK. Available from: <http://www.eolabs.com/product/pp0051-bacillus-cereus-pemba/> (accessed February 2020)

**URL 10:** Fisher Scientific. 2016. *Thermo Scientific™ Owl™ D2 Wide-Gel Electrophoresis System*. Thermo Fisher Scientific Inc. Available from: <https://www.fishersci.com/shop/products/thermo-scientific-owl-d2-wide-gel-electrophoresis-systems-d2-wide-gel-complete-system-buffer-exchange-ports/owd2bp> (accessed January 2020)

## 9 Seznam použitých zkratk a symbolů

**DNA** – deoxyribonukleová kyselina (z angl. Deoxyribonucleic Acid)

**GIT** – gastrointestinální trakt

**KTJ** – kolonie tvořící jednotka (z angl. CFU – Colony Forming Unit)

**MALDI-TOF MS** – hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (z angl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)

**PCR** – polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)

**RNA** – ribonukleová kyselina (z angl. Ribonucleic Acid)

**UHT** – vysokoteplotní ošetření (z angl. Ultra High Temperature)



## 10 Seznam obrázků, tabulek a grafů

**Obrázek 1:** Životní cyklus sporulující bakterie

**Obrázek 2:** Základní části spory

**Obrázek 3:** *B. cereus* na MYP agaru

**Obrázek 4:** *B. cereus* na PEMB agaru

**Obrázek 5:** Proces MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

**Obrázek 6:** Průběh PCR

**Obrázek 7:** Profil DNA fingerprintů

**Obrázek 8:** Elektroforetický systém

**Obrázek 9:** Elektroforeogram výsledků PCR

**Tabulka 1:** Druhy rodu *Bacillus* produkující potravinářsky významné enzymy

**Tabulka 2:** Dva typy otrav jídlem způsobené *B. cereus*

**Tabulka 3:** Nejvyšší mezní hodnoty *B. cereus* v potravinách

**Tabulka 4:** Skóre identifikace MALDI-TOF

**Tabulka 5:** Seznam vzorků potravin

**Tabulka 6:** Podmínky procesu PCR

**Tabulka 7:** Seznam vzorků potravin, jejich zařazení do skupin a výskyt bakteriální druhů

**Tabulka 8:** Relativní četnosti výskytu druhů rodu *Bacillus* souhrnně ve všech vzorcích

**Tabulka 9:** Výsledky sekvenování vybraných kmenů

**Graf 1:** Relativní četnosti výskytu druhů rodu *Bacillus* souhrnně ve všech vzorcích



## 11 Samostatné přílohy

### Příloha I

- Testování nezávislosti mezi výskytem *B. pumilus* a rostlinnými či živočišnými potravinami

Tabulkový výstup z programu – chí kvadrát (asociační tabulka):

skupina potravin	2-rozměrná tabulka: Pozorované četnosti (StatSoft)		
	výskyt ano	výskyt ne	Řádk. součty
rostlinné	20	38	58
živočišné	1	14	15
Celk.	21	52	73

Tabulkový výstup z programu – testování, závislosti:

Statist.	Statist. : skupina potravin(2) x výskyt(2) (StatSoft)		
	Chí-kvadr.	sv	p
Pearsonův chí-kv.	4,499991	df=1	p=,03390
M-V chí-kvadr.	5,534338	df=1	p=,01865
Fí pro tabulky 2 x 2	,2482815		
Tetrachorická korelace	,5426952		
Kontingenční koeficient	,2409656		

## Příloha II

- Podrobné výsledky MALDI-TOF MS

	identifikace	skóre	identifikace	vzorek - potravina
2,165	<i>Bacillus licheniformis</i>	2,137	<i>Bacillus licheniformis</i>	cereální kaše čokoládová
2,101	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2,052	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	cereální kaše jablečná se skořicí
2,034	<i>Bacillus megaterium</i>	1,943	<i>Bacillus megaterium</i>	cereální kaše jablečná se skořicí
2,113	<i>Staphylococcus capitis</i>	1,962	<i>Staphylococcus capitis</i>	cottage cheese
2,149	<i>Staphylococcus warneri</i>	2,131	<i>Staphylococcus warneri</i>	cottage cheese
2,449	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,398	<i>Staphylococcus hominis</i>	cottage cheese
1,833	<i>Bacillus vallismortis</i>	1,831	<i>Bacillus mojavenis</i>	čistící čaj s červenou řepou
1,685	not reliable identification	1,607	not reliable identification	čistící čaj s červenou řepou
1,733	<i>Bacillus subtilis</i>	1,732	<i>Bacillus subtilis</i>	čistící čaj s červenou řepou
1,94	<i>Bacillus subtilis</i>	1,926	<i>Bacillus subtilis</i>	čistící čaj s červenou řepou
1,481	not reliable identification	1,348	not reliable identification	gulášové koření
1,6	not reliable identification	1,581	not reliable identification	gulášové koření
1,472	not reliable identification	1,408	not reliable identification	hovězí bujón
1,672	not reliable identification	1,658	not reliable identification	hovězí bujón
2,28	<i>Bacillus subtilis</i>	2,231	<i>Bacillus subtilis</i>	hovězí bujón
1,433	not reliable identification	1,404	not reliable identification	hovězí bujón
2,231	<i>Bacillus subtilis</i>	2,137	<i>Bacillus subtilis</i>	hovězí bujón
1,899	<i>Bacillus pumilus</i>	1,856	<i>Bacillus pumilus</i>	hovězí bujón
1,83	<i>Bacillus subtilis</i>	1,789	<i>Bacillus mojavenis</i>	hovězí bujón
1,809	<i>Bacillus atrophaeus</i>	1,809	<i>Bacillus vallismortis</i>	hovězí bujón
1,459	not reliable identification	1,433	not reliable identification	hovězí bujón
1,545	not reliable identification	1,491	not reliable identification	hovězí bujón

1,784	<i>Bacillus subtilis</i>	1,69	not reliable identification	hovězí bujón
1,487	not reliable identification	1,463	not reliable identification	hovězí bujón
2,434	<i>Bacillus megaterium</i>	2,404	<i>Bacillus megaterium</i>	hovězí jerky natural
1,818	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,807	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	hovězí jerky natural
2,127	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,069	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	hovězí jerky natural
1,771	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,729	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	hovězí jerky natural
2,102	<i>Bacillus oleronius</i>	2,05	<i>Bacillus oleronius</i>	hovězí jerky natural
1,885	<i>Bacillus megaterium</i>	1,745	<i>Bacillus megaterium</i>	hovězí jerky natural
2,09	<i>Bacillus drentensis</i>	1,923	<i>Bacillus drentensis</i>	kakaový prášek holandského typu
2,148	<i>Bacillus licheniformis</i>	2,074	<i>Bacillus licheniformis</i>	kakaový prášek holandského typu
2,087	<i>Bacillus licheniformis</i>	2,044	<i>Bacillus licheniformis</i>	kakaový prášek holandského typu
1,751	<i>Bacillus licheniformis</i>	1,62	not reliable identification	kakaový prášek holandského typu
2,135	<i>Bacillus licheniformis</i>	1,729	<i>Bacillus licheniformis</i>	kakaový prášek holandského typu
1,967	<i>Bacillus mojavensis</i>	1,92	<i>Bacillus subtilis</i>	kari indické sypké
2,309	<i>Bacillus mojavensis</i>	2,292	<i>Bacillus mojavensis</i>	kari indické sypké
1,862	<i>Bacillus subtilis</i>	1,85	<i>Bacillus subtilis</i>	kari indické sypké
2,38	<i>Bacillus subtilis</i>	2,339	<i>Bacillus subtilis</i>	kari indické sypké
2,359	<i>Bacillus subtilis</i>	2,318	<i>Bacillus subtilis</i>	kari indické sypké
2,263	<i>Bacillus subtilis</i>	2,22	<i>Bacillus subtilis</i>	kari indické sypké
1,804	<i>Bacillus pumilus</i>	1,795	<i>Bacillus pumilus</i>	kari indické sypké
2,133	<i>Bacillus mojavensis</i>	2,059	<i>Bacillus subtilis</i>	kari indické sypké
2,177	<i>Bacillus subtilis</i>	2,157	<i>Bacillus subtilis</i>	kari indické sypké
1,849	<i>Bacillus subtilis</i>	1,846	<i>Bacillus subtilis/Bacillus mojavensis</i>	kmín drcený
2,106	<i>Bacillus licheniformis</i>	2,019	<i>Bacillus licheniformis</i>	kmín drcený
1,801	<i>Bacillus pumilus</i>	1,765	<i>Bacillus pumilus</i>	kmín drcený
2	<i>Bacillus pumilus</i>	1,87	<i>Bacillus pumilus</i>	kmín drcený
1,868	<i>Bacillus pumilus</i>	1,803	<i>Bacillus pumilus</i>	ovocné pyré
1,916	<i>Bacillus pumilus</i>	1,807	<i>Bacillus pumilus</i>	ovocný čaj citronový se zázvorem
2,052	<i>Bacillus safensis</i>	1,834	<i>Bacillus safensis</i>	ovocný čaj citronový se zázvorem
1,778	<i>Bacillus safensis</i>	1,657	not reliable identification	ovocný čaj citronový se zázvorem

1,849	<i>Bacillus pumilus</i>	1,847	<i>Bacillus pumilus</i>	ovocný čaj citronový se zázvorem
1,69	not reliable identification	1,639	not reliable identification	ovocný čaj citronový se zázvorem
1,642	not reliable identification	1,572	not reliable identification	ovocný čaj citronový se zázvorem
1,592	not reliable identification	1,535	not reliable identification	ovocný čaj citronový se zázvorem
1,872	<i>Bacillus pumilus</i>	1,801	<i>Bacillus pumilus</i>	ovocný čaj citronový se zázvorem
1,807	<i>Bacillus pumilus</i>	1,762	<i>Bacillus pumilus</i>	ovocný čaj citronový se zázvorem
2,04	<i>Bacillus pumilus</i>	1,833	<i>Bacillus pumilus</i>	ovocný čaj citronový se zázvorem
1,922	<i>Bacillus pumilus</i>	1,725	<i>Bacillus pumilus</i>	ovocný čaj citronový se zázvorem
1,704	<i>Bacillus pumilus</i>	1,632	not reliable identification	ovocný čaj citronový se zázvorem
1,765	<i>Bacillus sonorensis</i>	1,664	not reliable identification	ovocný čaj citronový se zázvorem
1,61	not reliable identification	1,579	not reliable identification	ovocný čaj citronový se zázvorem
1,812	<i>Bacillus pumilus</i>	1,734	<i>Bacillus pumilus</i>	ovocný čaj citronový se zázvorem
1,569	not reliable identification	1,565	not reliable identification	ovocný čaj citronový se zázvorem
1,817	<i>Bacillus pumilus</i>	1,797	<i>Bacillus pumilus</i>	ovocný čaj citronový se zázvorem
1,819	<i>Bacillus pumilus</i>	1,771	<i>Bacillus pumilus</i>	ovocný čaj citronový se zázvorem
1,8	<i>Bacillus pumilus</i>	1,699	not reliable identification	ovocný čaj citronový se zázvorem
1,565	not reliable identification	1,532	not reliable identification	ovocný čaj citronový se zázvorem
2,096	<i>Bacillus mojavenis</i>	2,007	<i>Bacillus vallismortis</i>	ovocný čaj citronový se zázvorem
1,834	<i>Bacillus pumilus</i>	1,772	<i>Bacillus pumilus</i>	pepř černý mletý
2,144	<i>Bacillus subtilis</i>	2,141	<i>Bacillus subtilis</i>	pepř černý mletý
1,975	<i>Bacillus subtilis</i>	1,907	<i>Bacillus mojavenis</i>	pepř černý mletý
1,699	not reliable identification	1,692	not reliable identification	pepř černý mletý
2,067	<i>Bacillus subtilis</i>	2,05	<i>Bacillus subtilis</i>	pepř černý mletý
1,845	<i>Bacillus atrophaeus</i>	1,793	<i>Bacillus mojavenis</i>	pepř černý mletý
2,031	<i>Bacillus subtilis</i>	1,997	<i>Bacillus subtilis</i>	pepř černý mletý
1,923	<i>Bacillus pumilus</i>	1,905	<i>Bacillus pumilus</i>	pepř černý mletý
2,088	<i>Bacillus subtilis</i>	2,073	<i>Bacillus subtilis</i>	pepř černý mletý
2,025	<i>Staphylococcus warneri</i>	2,017	<i>Staphylococcus warneri</i>	pudingový dezert se šlehačkou čokoládový
1,981	<i>Bacillus firmus</i>	1,871	<i>Bacillus firmus</i>	pudingový dezert se šlehačkou čokoládový
1,972	<i>Bacillus firmus</i>	1,953	<i>Bacillus firmus</i>	pudingový dezert se šlehačkou čokoládový

1,909	<i>Bacillus firmus</i>	1,853	<i>Bacillus firmus</i>	pudingový dezert se šlehačkou čokoládový
2,144	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,116	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ricotta
1,939	<i>Staphylococcus warneri</i>	1,923	<i>Staphylococcus warneri</i>	ricotta
2,05	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2,032	<i>Bacillus mycooides</i>	ricotta
2,127	<i>Bacillus mycooides</i>	2,105	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ricotta
2,205	<i>Pantoea agglomerans</i>	2,184	<i>Pantoea agglomerans</i>	skořice mletá
1,938	<i>Bacillus mycooides</i>	1,894	<i>Bacillus mycooides</i>	skořice mletá
1,963	<i>Bacillus mycooides</i>	1,857	<i>Bacillus mycooides</i>	skořice mletá
1,94	<i>Bacillus mojaviensis</i>	1,926	<i>Bacillus subtilis</i>	skořice mletá
2,186	<i>Bacillus licheniformis</i>	1,954	<i>Bacillus licheniformis</i>	tvaroh polotučný
1,444	not reliable identification	1,412	not reliable identification	tvaroh polotučný
2,093	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,051	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	tvaroh polotučný
1,677	not reliable identification	1,481	not reliable identification	tvaroh polotučný
1,842	<i>Bacillus pumilus</i>	1,775	<i>Bacillus pumilus</i>	zázvor sušený
2,023	<i>Bacillus subtilis</i>	1,974	<i>Bacillus subtilis</i>	zázvor sušený
1,822	<i>Bacillus pumilus</i>	1,753	<i>Bacillus pumilus</i>	zázvor sušený
1,791	<i>Bacillus pumilus</i>	1,785	<i>Bacillus pumilus</i>	zázvor sušený
1,976	<i>Bacillus gibsonii</i>	1,955	<i>Bacillus gibsonii</i>	zeleninové ochucovadlo
1,712	<i>Bacillus atrophaeus</i>	1,628	not reliable identification	paprika červená sladká
1,757	<i>Bacillus atrophaeus</i>	1,696	not reliable identification	zeleninové ochucovadlo
1,561	not reliable identification	1,534	not reliable identification	paprika červená sladká
1,391	not reliable identification	1,382	not reliable identification	bazalka drhnutá
1,994	<i>Bacillus licheniformis</i>	1,965	<i>Bacillus licheniformis</i>	bylinný čaj s ženšenem