

Charakterizace vybraných grampozitivních bakterií izolovaných z potravin nepříznivých pro jejich růst

Diana Macháčková



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Diana Macháčková
Osobní číslo:	T22872
Studijní program:	B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin
Specializace:	Potravinářské biotechnologie a aplikovaná mikrobiologie
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Charakterizace vybraných grampozitivních bakterií izolovaných z potravin nepříznivých pro jejich růst

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši zaměřenou na výskyt mikroorganismů v potravinách nepříznivých pro jejich růst, zaměřte se na grampozitivní koky a tyčinky a faktory, které mohou ovlivňovat jejich růst.
- 2) Z vybraných potravin izolujte a dostupnými metodami identifikujte vybrané grampozitivní bakterie.
- 3) Proveďte charakterizaci vybraných identifikovaných grampozitivních bakterií.
- 4) Výsledky vyhodnotte, diskutujte a formulujte závěry práce.

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

Seznam doporučené literatury:

HUANG, M., ZHANG, M., BHANDARI, B. Recent development in the application of alternative sterilization technologies to prepared dishes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 59(7): 1188-1196. 2019
CHITRAKAR, B., ZHANG, M., ADHIKARI, B. Dehydrated foods: Are they microbiologically safe? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59: 2734-2745. 2019
NEMA, P. K., SEHRAWAT, R. et al. Inactivating Food Microbes by High-Pressure Processing and Combined Nonthermal and Thermal Treatment: A Review. *Journal of Food Quality*. 2022: 797843. 2022
ALP, D., BULANTEKIN, O. The microbial quality of various foods dried by applying different drying methods: a review. *European Food Research and Technology*, 247: 1333-1343. 2021
ICMSF – International Commission on Microbiological Specification for Foods. *Microorganisms in foods* 6. 2nd ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 2005
Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně

Vedoucí bakalářské práce: **prof. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2025**
Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2025

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení bakalářské práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – bakalářskou práci – nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá; neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji, že

- jsem na bakalářské práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autor

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá identifikací a charakterizací grampozitivních bakteriálních kmenů, které byly izolovány z potravin nepříznivých pro jejich růst, a to z tavených sýrů a masových konzerv.

Mezi cílené charakterizované vlastnosti patřila schopnost tvorby biofilmu modifikovanou Christensenovou metodou, sledování růstu kmenů při rozdílných kultivačních teplotách a testování antibiotické rezistence na vybraná antibiotika diskovou difuzní metodou.

V experimentální části bylo zjištěno, že z vybraných potravin byly izolovány bakteriální rody *Bacillus*, *Cytobacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* a *Peribacillus*. Izolované kmeny těchto rodů vykazovaly velmi dobrý růst v rozmezí teplot 25 – 45 °C. Tvorba biofilmu byla prokázána u většiny zástupců rodu *Bacillus*, *Cytobacillus* a *Lysinibacillus* a u rodu *Paenibacillus* a *Peribacillus* taktéž. V rámci testování antibiotické citlivosti bylo zjištěno, že všechny kmeny jsou rezistentní vůči penicilinu. Některé kmeny byli vyhodnoceny jako multirezistentní.

Tato práce prokázala, že v potravinách nepříznivých pro růst mikroorganismů se určité mikroorganismy vyskytovat mohou.

Klíčová slova: grampozitivní bakterie, tavené sýry, masové konzervy, růst, biofilm, antibiotická rezistence

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the identification and characterization of Gram-positive bacterial strains isolated from foods unfavourable for their growth, namely processed cheese and canned meat.

The targeted characterization included the ability to form biofilms by the modified Christensen method, monitoring the growth of the strains at different cultivation temperatures, and testing antibiotic resistance to selected antibiotics by the disk diffusion method.

In the experimental part, the bacterial genera *Bacillus*, *Cytobacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* and *Peribacillus* were isolated from the selected foods. The isolated strains of these genera showed very good growth in the temperature range of 25 – 45 °C. Biofilm formation was demonstrated for most representatives of the genera *Bacillus*, *Cytobacillus* and *Lysinibacillus*, and the genera *Paenibacillus* and *Peribacillus* as well. In antibiotic susceptibility testing, all strains were found to be resistant to penicillin. Some strains were evaluated as multiresistant.

This work has shown that certain microorganisms can be present in food unfavourable for the growth of microorganisms.

Keywords: gram-positive bacteria, processed cheese, canned meat, growth, biofilm, antibiotic resistance

Rada by som sa touto cestou poďakovala vedúcej mojej bakalárskej práce pani prof. RNDr. Leone Buňkovej, Ph.D. za možnosť spracovať tak zaujímavú problematiku, trpezlivosť, ochotu a odborné rady, ktoré mi počas štúdia a vypracovávania tejto bakalárskej práce predala. Tiež by som sa rada poďakovala Ing. Ivane Huňovej za poskytnutie testovaných izolátov, pomoc pri identifikácii bakteriálnych kmeňov a cenné rady, Ing. Veronike Kučabovej a Mgr. Markéte Havlišťovej za asistenciu a pomoc pri práci v laboratóriu. Rada by som taktiež poďakovala mojej rodine, priateľovi, spolužiackam a blízkym kamarátom, ktorí mi boli veľkou oporou a podporovali ma nie len počas písania bakalárskej práce, ale aj počas celého štúdia.

Prehlasujem, že odovzdaná verzia bakalárskej práce a verzia elektronická nahraná do IS/STAG sú totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	15
I TEORETICKÁ ČASŤ	16
1 CHARAKTERISTIKA POTRAVÍN NEPRIAZNIVÝCH PRE RAST MIKROORGANIZMOV	17
1.1 MÄSOVÉ KONZERVY A POLOKONZERVY	17
1.1.1 Mikrobiológia mäsových konzerv a polokonzerv	17
1.2 TAVENÉ SYRY	18
1.2.1 Mikrobiológia tavených syrov	19
2 FAKTORY VPLÝVAJÚCE NA RAST MIKROORGANIZMOV VO VYBRANÝCH POTRAVINÁCH.....	20
2.1 TEPELNÉ OŠETRENIE POTRAVÍN	20
2.1.1 Zabezpečenie komerčnej sterility.....	20
2.1.2 Tepelné ošetrenie mäsových konzerv a polokonzerv.....	21
2.1.3 Tepelné ošetrenie tavených syrov	21
2.2 KONZERVOVANIE POTRAVÍN	22
2.2.1 Cieľ konzervovania mäsa a mäsových výrobkov.....	22
2.2.2 Proces konzervovania.....	23
2.2.3 Konzervovanie chemickými konzervačnými látkami	23
2.4 pH	24
2.5 PRÍDAVOK LÁTOK S EMULGUJÚCIMI ÚČINKAMI	24
3 VYBRANÉ GRAMPOZITÍVNE BAKTÉRIE V POTRAVINÁCH.....	25
3.1 <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i>	25
3.2 <i>BACILLUS CEREUS</i>	25
3.3 <i>BACILLUS PUMILUS</i>	26
3.4 <i>BACILLUS SIAMENSIS</i>	26
3.5 <i>BACILLUS VELEZENSIS</i>	26
3.6 <i>CYTOBACILLUS HORNECKIAE</i>	27
3.7 <i>LYSINIBACILLUS FUSIFORMIS</i>	27
3.8 <i>PAENIBACILLUS GLUCANOLYTICUS</i>	27
3.9 <i>PERIBACILLUS SIMPLEX</i>	28
II PRAKTICKÁ ČASŤ	29
4 CIEĽ PRÁCE	30
5 POUŽITÝ MATERIÁL.....	31
5.1 POPIS TESTOVANÝCH VZORIEK	31
5.2 KULTIVAČNÉ MÉDIÁ A ROZTOKY.....	31

5.3	POMÔCKY A ZARIADENIA	32
5.4	ROZTOKY A CHEMICKÉ ČINIDLÁ	34
5.5	ANTIMIKRÓBNE DISKY	35
6	METODIKA.....	36
6.1	IZOLÁCIA GRAMPOZITÍVNYCH BAKTÉRIÍ Z POTRAVÍN	36
6.2	IDENTIFIKÁCIA GRAMPOZITÍVNYCH BAKTÉRIÍ	36
6.2.1	Gramovo farbenie	36
6.2.2	Izolácia bakteriálnej DNA	37
6.2.3	Kontrola koncentrácie a čistoty izolovanej DNA	37
6.2.4	Polymerázová reťazová reakcia	38
6.2.5	Vizualizácia DNA	38
6.2.6	Purifikácia DNA	39
6.2.7	Kontrola koncentrácie purifikovanej DNA	40
6.2.8	Identifikácia izolovaných mikroorganizmov sekvenciou génu pre 16S rRNA, úprava chromatogramov	40
6.3	CHARAKTERIZÁCIA GRAMPOZITÍVNYCH BAKTÉRIÍ	41
6.3.1	Testovanie rastu grampozitívnych baktérií pri rôznych teplotných podmienkach	41
6.3.2	Testovanie schopnosti tvorby biofilmu Christensenovou metódou	42
6.3.3	Testovanie rezistencie na antibiotiká diskovo difúznou metódou	43
7	VÝSLEDKY	45
7.1	IDENTIFIKÁCIA BAKTERIÁLNYCH IZOLÁTOV SEKVENCIOU 16S rRNA	45
7.2	TESTOVANIE RASTU GRAMPOZITÍVNYCH BAKTÉRIÍ PRI RÔZNYCH TEPLOTNÝCH PODMIENKACH	46
7.2.1	Zhrnutie testovania rastu vybraných grampozitívnych baktérií	51
7.3	TESTOVANIE SCHOPNOSTI TVORBY BIOFILMU	52
7.4	TESTOVANIE REZISTENCIE NA ANTIBIOTIKÁ DISKOVO DIFÚZNOU METÓDOU	54
7.4.1	Antibiotická rezistencia u <i>Bacillus</i> spp.	54
7.4.2	Antibiotická rezistencia u <i>Cytobacillus horneckiae</i>	54
7.4.3	Antibiotická rezistencia u <i>Lysinibacillus fusiformis</i>	55
7.4.4	Antibiotická rezistencia u <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> a <i>Peribacillus</i> <i>simplex</i>	55
8	DISKUSIA.....	57
8.1	IZOLÁCIA A IDENTIFIKÁCIA KMEŇOV	57
8.2	RAST KMEŇOV PRI RÔZNYCH TEPLOTÁCH	57
8.3	SCHOPNOSŤ TVORBY BIOFILMU	58
8.4	ANTIBIOTICKÁ REZISTENCIA	59
	ZÁVER.....	61
	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	62
	ZOZNAM OBRÁZKOV	70

ZOZNAM TABULIEK	71
ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK.....	72

ÚVOD

Niektoré potraviny svojím prostredím, zložením a spôsobom výroby sú priam nepriaznivé pre rast mnohých mikroorganizmov. V prípade zlyhania výrobného, skladovacieho alebo kulinárskeho procesu môže dochádzať ku kazeniu alebo kontaminácii mikroorganizmami. Medzi mikroorganizmy, ktoré kontaminujú potraviny patria aj grampozitívne baktérie, ktoré môžu mať negatívny vplyv na bezpečnosť a zdravotnú nezávažnosť týchto potravín.

Tavené syry a mäsové konzervy a polokonzervy patria do tejto skupiny potravín, v ktorých pri sa za normálnych podmienok mikroorganizmy vyskytovať nemali. Výrobou takýchto potravín sa predĺži trvanlivosť až o niekoľko mesiacov až rokov a zníži pravdepodobnosť mikrobiálneho rizika. Vďaka teplotnému záhrevu počas výroby alebo po výrobe sa zabezpečí tzv. komerčná sterilita.

S možnosťou prežitia a množenia grampozitívnych baktérií v potravinách, ktoré nepodporujú ich rast sa zvyšuje riziko zdravotných problémov, ktoré môžu úzko súvisieť s ich možnou prítomnosťou génov rezistencie voči antibiotikám a schopnosťou tvorby biofilmu.

Predložená bakalárska práca sa zameriava na bakteriálny rod *Bacillus* a od neho rody odvodené. Najznámejším z vybraných zástupcov je pravdepodobne *Bacillus cereus*, ktorý je známy svojou produkciou toxínov, ktoré môžu mať na svedomí vážne zdravotné ťažkosti. Iné kmene majú poľnohospodárske a environmentálne využitie.

Cieľom praktickej časti bolo identifikovať a charakterizovať vybrané grampozitívne bakteriálne kmene, čo zahŕňalo sledovanie rastu pri rôznych teplotných podmienkach, schopnosť tvorby biofilmu a testovanie antibiotickej rezistencie.

I TEORETICKÁ ČASŤ

1 CHARAKTERISTIKA POTRAVIN NEPRIAZNIVÝCH PRE RAST MIKROORGANIZMOV

Táto kapitola sa zaoberá potravinami, z ktorých boli v rámci dizertačnej práce Ing. Ivany Huňovej vyizolované dané kultúry grampozitívnych baktérií. Išlo hlavne o tepelne upravené výrobky, ako sú tavené syry a mäsové nátierky.

Všeobecne platí, že tieto potraviny sú bezpečné na konzumáciu, pokiaľ sú dodržané výrobné, hygienické a skladovacie pravidlá. U mäsových výrobkoch a tavených syrov je mikrobiologické riziko menšie vďaka použitej vysokej teplote pri výrobe.

1.1 Mäsové konzervy a polokonzervy

Mäso a mäsové výrobky sú vysoko proteínové výrobky, ktoré z hľadiska biologickej a výživovej hodnoty, sú jednou z najdôležitejších skupín potravín nevyhnutných pre správnu výživu človeka. (Bobko et al., 2018)

Ich spracovanie, rovnako ako aj využitie vedľajších jatočných produktov na výrobu kvalitných a trvanlivých mäsových výrobkov, si okrem praktických skúseností vyžaduje aj odborné vedomosti. Práve tie zabezpečujú, že výroba prebieha v hygienicky vyhovujúcich podmienkach, čím sa predchádza znehodnoteniu výrobkov a prípadnej kontaminácii. Dôležité je pritom zohľadniť vlastnosti mäsa a aplikovať správne technologické postupy. (Bobko et al., 2018)

Mnohé konzervované mäsové výrobky obsahujú tzv. konzervačné soli, ktoré najčastejšie predstavujú kombináciu chloridu sodného a dusitanu sodného. Ak sú tieto látky súčasťou receptúry výrobku, efektívne zabraňujú rozmnožovaniu bakteriálnych spór. Jeho inhibičný účinok sa zvyšuje znížením pH a zároveň zvýšením obsahu soli vo výrobku. (Green et al., 1998)

1.1.1 Mikrobiológia mäsových konzerv a polokonzerv

Znehodnotenie, kazenie, či výskyt patogénnych baktérií v mäse a mäsových výrobkoch úzko súvisí s vonkajšími podmienkami, ako sú teplota a atmosféra, vnútornými faktormi, ako je pH a aktivita vody, ale aj s procesnými faktormi, napr. použitie konzervačných látok. Tieto faktory spolu s environmentálnymi zmenami ovplyvňujú bezpečnosť a kvalitu mäsových výrobkov. (Paulsen, Smulders, 2023)

Mikrobiologická kontaminácia u spracovaných mäsových výrobkov môže pochádzať z rôznych zdrojov a spôsobuje vážny bezpečnostný problém. Na zabezpečenie zdravotnej nezávažnosti týchto výrobkov sa používajú rôzne intervenčné technológie, ako sú tepelné, netepelné, biologické a chemické metódy, ktoré sú navrhnuté na inaktiváciu, taktiež aj inhibíciu kontaminantov a patogénov prenášaných potravinami. (Hardin, 2014; Aiyegoro 2014)

Mikrobiálne kazenie konzervovaných mäsových výrobkov môže byť spôsobené prežitím spór termofilných baktérií, rastom prežitých termofilných baktérií v dôsledku zlého technologického spracovania alebo skladovaním a rekontamináciou mikroorganizmami v dôsledku netesnosti hermetického obalu. Tieto okolnosti môžu zapríčiniť výskyt baktérií rodu *Bacillus* a od nich odvodených rodov (napr. *Heyndrickxia coagulans*, *Geobacillus staerothermophilus* a ďalších) a rodu *Clostridium* a od nich odvodených rodov (napr. *C. butyricum*, *C. thermosaccharolyticum* a *Thermoanaerobacterium sporogenes*). (Magar, 2025)

Prítomnosťou niektorých baktérií dochádza k produkcii sírovodíku, ktorý je následne absorbovaný potravinami, čo vedie k tvorbe sulfidu železnatého a čiernemu sfarbeniu potravín a vnútra konzervy. Ďalšími možnými produkovanými zápachajúcimi zlúčeninami môžu byť indol, amoniak a ďalšie plyny. Tento problém môže viesť k bombáži a nadúvaniu konzerv. (Magar, 2025; Eyo, 2024)

1.2 Tavené syry

Syr, či už tavený alebo prírodný, je výživná surovina, ktorá obsahuje dôležité živiny, ako sú bielkoviny, tuky, vitamíny a minerálne látky. Tavený syr prechádza technologickou úpravou, ktorá môže ovplyvniť jeho zloženie, stráviteľnosť a vstrebávanie bielkovín. Najznámejšie druhy tavených syrov sú tavená syrová nátierka a tavené syrové plátky. (Abou El-Nour a Gouda 2003)

Podľa Vyhlášky č. 397/2016 Sb. o požiadavkách na mlieko a mliečné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje (§14) sa ako „tavený syr“ označuje mliečny výrobok, ktorý je tepelne upravený tavením. (Ministerstvo zemědělství ČR, 2016)

Tavené syry vznikli s cieľom predĺžiť trvanlivosť syrov a zlepšiť ich stabilitu. Proces ich výroby zahŕňa tavenie syra, pridanie surovín a emulgujúcich činidiel a dôkladnú homogenizáciu za čiastočného podtlaku. Medzi základné suroviny na výrobu tavených syrov

patrí prírodný syr rôznej zrelosti s možným mechanickým poškodením (praskliny a pod.), ale bez mikrobiologickej vady, maslo alebo prípadne smotana na zvýšenie obsahu tuku, pitná voda pre úpravu sušiny a tavné soli. (El-Bakry a Mehta, 2022; Buňka et al., 2009)

Tavné soli pôsobia ako emulgujúce činidlá na dosiahnutie homogénnej zmesi bez separácii ostatných zložiek taveného syra. Najčastejšie používanými tavnými soľami sú soli s viacsýtnymi aniónmi – fosforečnany, polyfosforečnany a citrany, a monovalentnými alkalickými kovmi – hlavne sodíkom. (Buňka et al., 2009)

Na úpravu organoleptických vlastností tavených syrov je možné použiť látky, ktoré upravujú farbu, chuť a vôňu, ako je napr. korenie, zelenina a ďalšie. (El-Bakry a Mehta, 2022; Buňka et al., 2009)

1.2.1 Mikrobiológia tavených syrov

Mikrobiologická stabilita tavených syrov závisí od kvality a akosti použitých surovín, teploty spracovania a podmienkach skladovania. Pri dostatočnom tepelnom zázehve pri výrobe sa väčšina patogénnych mikroorganizmov zničí, ale nedostatočný tepelný zázehv môže byť dôvodom prežitia mikroorganizmov, ktoré znižujú kvalitu, bezpečnosť a akosť výrobkov. Skladovanie pri chladiarenských teplotách dokáže prežiť veľké množstvo psychrotrofných a kontaminujúcich mikroorganizmov a mikroorganizmy, ktoré sú schopné rastu pri atmosfére s nízkym obsahom kyslíka. Avšak ich metabolická aktivita je výrazne spomalená alebo takmer zastavená kvôli nevhodnej teplote pre aktivitu ich enzýmov. Pri zvýšení teploty na optimálnu teplotu pre ich rast, metabolická a enzymatická aktivita sa znova obnoví. (Buňková et al., 2010; El-Bakry a Mehta, 2022; Buňková a Buňka, 2017; Buňka et al., 2009)

V aeróbných podmienkach môžu tavené syry obsahovať plesne a kvasinky, pričom riziko ich výskytu rastie pri použití nevhodných obalových materiálov. Baktérie ako rody *Bacillus* a *Clostridium* a od nich odvodené rody, môžu prežiť v syre vo forme spór aj vysoké teploty tepelného zázehvu, ktoré sa potom aktivujú pri vhodných podmienkach. To môže viesť k alimentárnym nákazám. (El-Bakry a Mehta, 2022)

K sekundárnej kontaminácii môže dôjsť po tepelnom zázehve, ktorý je možné prirovnať k pasterizácii, napr. pri nedodržaní hygienických zásad, najmä patogénnymi mikroorganizmami, ako sú *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, alebo iné nepatogénne a podmienené patogénne mikroorganizmy. (El-Bakry a Mehta, 2022)

2 FAKTORY VPLÝVAJÚCE NA RAST MIKROORGANIZMOV VO VYBRANÝCH POTRAVINÁCH

Rast mikroorganizmov ovplyvňujú rôzne faktory. Preto je dôležité tieto faktory ovplyvniť tak, aby sme znížili alebo zamedzili rast a metabolizmus mikroorganizmov v potravinách. Faktory rozdeľujeme na vonkajšie, kde patrí teplota a atmosférický kyslík, a vnútorné, ako sú živiny, pH, aktivita vody a prístup kyslíka. Tepelné spracovanie a konzervovanie potravín sú kľúčové pre komerčné uchovávanie potravín. (Epralima, 2014)

2.1 Tepelné ošetrovanie potravín

Teplota je jedným z najvýznamnejších faktorov ovplyvňujúcich rast mikroorganizmov a preto, keď sa zamýšľame nad ochranou potravín, je to kľúčový faktor, ktorý musíme brať do úvahy. Nesprávne teploty pri konzervovaní, skladovaní alebo spracovaní môžu viesť k infekciám a intoxikáciám spôsobeným jedlom. (Epralima, 2014)

Teplota, u ktorej mikroorganizmy vykazujú maximálnu rýchlosť rastu sa nazýva optimálna teplota. Rast a metabolizmus mikroorganizmov sa znížením alebo zvýšením teploty optimálnej spomalí, prípadne zastaví. (Epralima, 2014)

2.1.1 Zabezpečenie komerčnej sterility

Komerčná sterilita znamená stav, keď konzervované potraviny neobsahujú žiadne životaschopné mikroorganizmy schopné rastu a metabolizmu za normálnych skladovacích podmienok. Dosiahnutie komerčnej sterility zahŕňa ohrev potravín na vhodné teploty a použitie vhodného tlaku, aby sa zničili všetky patogénne mikroorganizmy, a mikroorganizmy, ktoré by mohli spôsobiť kazenie potravín a spóry. (Kumar, 2024; Guerrero-Legarreta, 2014) Je nevyhnutné, aby sa počas tepelného ošetrovania udržiavali správne hodnoty teploty v rozmedzí 101 – 121 °C a tlaku 68,9 – 103,4 kPa po danú dobu, v závislosti od typu tepelne ošetrenej potraviny. (Kumar, 2024)

Úroveň pH potraviny zohráva významnú úlohu pri určovaní parametrov tepelného spracovania. Nízko kyslé potraviny (pH vyššie ako 4,6) vyžadujú vyššie teploty a dlhšie časy spracovania, zatiaľ čo vysoko kyslé potraviny (pH nižšie ako 4,6) môžu byť spracované pri nižších teplotách. (Kumar, 2024)

Taktiež je dôležitá integrita použitej nádoby na prevenciu kontaminácie. Akékoľvek poškodenie alebo defekty konzervy alebo uzáveru môžu ohroziť sterilitu a bezpečnosť konzervovanej potraviny. (Kumar, 2024)

2.1.2 Tepelné ošetrenie mäsových konzerv a polokonzerv

Konzervované a polokonzervované mäsové výrobky prechádzajú rôznymi tepelnými ošetreniami a úpravami s cieľom zaistiť ich bezpečnosť a predĺžiť ich trvanlivosť. (FSIS - USDA, 2021)

V praxi sa úplná sterilita dosiahnuť nedá, preto sa konzervované mäso zvyčajne podrobuje tepelnému spracovaniu, ktoré zabezpečí tzv. komerčnú sterilitu. Tento výrobok sa považuje za sterilný, ak neobsahuje žiadne životaschopné spóry baktérií ako *Geobacillus stearothermophilus* alebo *Clostridium perfringens*. Okrem toho je sledovaný výskyt aj iných spórotvorných mikroorganizmov, a to *Paenibacillus macerans* a *Paenibacillus polymyxa*. (FSIS - USDA, 2021; Guerrero-Legarreta, 2014)

Údené konzervované mäsové výrobky podstupujú intenzívnejšie tepelné ošetrenie, a to „úplné sterilizačné varenie“, ktoré zaručuje zničenie všetkých škodlivých mikroorganizmov. (FSIS - USDA, 2021)

Polokonzervované mäsové výrobky v porovnaní s úplne konzervovanými výrobkami prechádzajú menej intenzívnym tepelným spracovaním. Tieto technologické tepelné úpravy produkt síce čiastočne konzervujú, ale zároveň sa zachovávajú niektoré vlastnosti čerstvého mäsa. (Green et al., 1998; FSIS - USDA, 2021)

Trvanlivosť týchto výrobkov sa dosahuje synergickým pôsobením tepla, upraveného pH, prídavku chloridu a dusitanu sodného a nízkej úrovne prirodzene prítomných spór. K znehodnoteniu takto spracovaných mäsových výrobkov dochádza len výnimočne, čo zvyčajne súvisí so zlyhaním pri samotnom soliacom procese alebo pri nedodržaní technologických a hygienických zásad. (Green et al., 1998)

2.1.3 Tepelné ošetrenie tavených syrov

Pri výrobe tavených syrov sa všetky potrebné suroviny (prírodný syr, pitná voda, maslo a emulgujúce činidlá) zmiešajú a následne sa tavia v stroji na tavenie syra. Tento proces sa deje pri teplote 80 °C alebo vyššej a pri nepretržitom mechanickom miešaní po dobu

približne 10 až 15 minút, tak aby výsledkom bola homogénna hmota. Potom sa tavený syr plní do obalov, chladí sa a následne sa distribuuje do obchodnej siete. (Song et al., 2003; Lazárková et al., 2011; Silverson, 2019)

Tavený syr sa po výrobe už ďalej tepelne neošetruje. Výnimkou je sterilizovaný tavený syr, ktorý sa využíva napr. pri zostavovaní bojových dávok potravín pre Českú armádu. Takéto hermeticky uzatvorené výrobky sa sterilizujú pri teplotách od 115 do 125 °C po dobu niekoľkých minút. (Buňka et al. 2009)

2.2 Konzervovanie potravín

Konzervovanie je bežná metóda uchovávania mäsa, ktoré zahŕňa umiestnenie potravín do hermeticky uzavretého obalu. Hermeticky uzatvorený obalový materiál je nádoba, ktorá je úplne tesnená tak, aby sa zabránilo prieniku alebo úniku vzduchu. Tým sa produkt chráni pred vstupom mikroorganizmov a vzduchu, možnou oxidáciou alebo kazením výrobku. (Green et al., 1998; Bitting et al., 2015; Abadouch 2014)

Mäsové konzervy a polokonzervy sú hermeticky uzatvorené v plechovom alebo sklenenom obale a tepelne spracované tak, aby sa dosiahla dlhodobá trvanlivosť. Trvanlivosť mäsových konzerv a polokonzerv môže dosiahnuť dobu niekoľkých mesiacov až rokov pri správnom tepelnom ošetrovaní a skladovaní. Mäsové polokonzervy musia byť skladované pri chladiarenských teplotách. (Bitting et al., 2015; Karki, 2020)

2.2.1 Cieľ konzervovania mäsa a mäsových výrobkov

Hlavným cieľom konzervovania mäsa a mäsových výrobkov je zničenie mikroorganizmov – či už vegetatívne bunky, tak aj ich spóry – a deaktivovanie enzýmov, ktoré môžu spôsobovať znehodnotenie a kazenie týchto výrobkov. Tepelná úprava sa pri konzervovaní riadi časovo-teplotnými parametrami, ktoré zohľadňujú odolnosť konkrétnych mikroorganizmov voči teplu. (Guerrero-Legarreta, 2014)

Zatiaľ čo vegetatívne formy baktérií sú zničené pri teplotách mierne nad ich optimom rastu, spóry niektorých druhov sú extrémne odolné voči teplu. Preto sa pre výrobu dlhotrvanlivých výrobkov používajú princípy tepelnej úpravy, ktoré zabezpečia aj zničenie spór patogénneho *Clostridium botulinum* – producenta botulotoxínu – a baktérií rodu *Bacillus* a od nich odvodených rodov. (Austin et al., 2024; Guerrero-Legarreta, 2014)

2.2.2 Proces konzervovania

Proces konzervovania mäsových produktov zahŕňa prípravu nádob, do ktorých sa bude jedlo plniť a predhrievať na sterilizáciu, prípravu jedla podľa typu a plnenie do nádob pre sterilizáciu. Nasleduje odvdzdušenie – proces eliminácie vzduchu z konzervy, zabráni sa tým napučaniu konzervy a znižuje chemickú reakciu medzi nádobou a obsahom potraviny. Po odvdzdušení sa konzerva okamžite uzavrie, pričom teplota konzervovaného jedla nesmie klesnúť pod 74 °C. Uzatvorené konzervy sa tepelne spracujú pri vhodnom čase a teplote, ktorá je zvyčajne nad 100 °C (vegetatívne baktérie zničené pri 80 °C/30 min, spórotvorné baktérie pri 110 °C/30 min, spóry pri 121 °C/3 min). Po tepelnom spracovaní nasleduje chladenie nádob na izbovú teplotu ponorením do studenej vody alebo postriekaním studenou vodou. Medzi poslednými krokmi je vysušenie obalu na označenie etiketou, ktorá by mala obsahovať identifikáciu produktu, značku, čistý obsah, kódové číslo, meno a adresu výrobcu, zoznam prísad a výživové informácie, dátum výroby a dátum spotreby. Po označení sa konzervy skladujú na chladných a suchých miestach. (Magar, 2025)

2.2.3 Konzervovanie chemickými konzervačnými látkami

Do mäsa a mäsových výrobkov sa chemické konzervačné látky pridávajú ako súčasť dreveného dymu a konzervačnej zmesi. Povolené konzervačné látky v mäse a mäsových konzervách sú NaCl, cukor, dusitan sodný a ocot, ale ocot sa bežne nepoužíva. Cukor a NaCl slúžia k zníženiu vodnej aktivity (a_w) a dodávajú chuť. Dusitan sodný sa rozkladá na oxid dusnatý, ktorý reaguje v mäse s myoglobínom a vytvára nitroso-myoglobín, ktorý dodáva mäsovým výrobkom charakteristickú červenú farbu. (Karki, 2020)

Údenie potravín má zvyčajne dva hlavné účely, a to vytvorenie požadovaných organoleptických vlastností a konzervovanie. Údením získa potravina charakteristickú chuť, vôňu, farbu a dochádza ku zjemneniu mäsa. Dym sa väčšinou získava spaľovaním tvrdého suchého dreva. Teplota údenia sa zvyčajne pohybuje v rozmedzí od 48 °C do 72 °C a trvá niekoľko hodín až dní. (Karki, 2020)

Konzervačný účinok údenia je spôsobený niekoľkými faktormi, a to chemickými konzervačnými látkami, ohrevom a sušiacim účinkom. Drevený dym obsahuje veľké množstvo prchavých zlúčenín s bakteriostatickou a baktericídnu aktivitou, ako sú formaldehyd, fenol, krezol, alifatické kyseliny, aldehydy a ketóny. (Karki, 2020)

2.3 Vodná aktivita

Jednou zo základných podmienok rastu a rozmnožovanie mikroorganizmov je dostupnosť vody, ktorá môže byť vyjadrená hodnotou vodnej aktivity. Voda sa v potravinách vyskytuje vo voľnej forme alebo sa viaže na určité zložky potraviny. Zníženie aktivity vody v potravinách je možné ovplyvniť pridaním soli alebo cukru. (Buňková, Buňka, 2017)

Veľké množstvo baktérií spojených s kazením potravín vyžaduje prostredie s vodnou aktivitou vyššou ako 0,91. Nízke hodnoty vodnej aktivity prostredia predlžujú lag fázu, čím znižuje rýchlosť rastu. (Buňková, Buňka, 2017)

Vodná aktivita u tavených syrov sa zvyčajne pohybuje medzi 0,91 a 0,96. Tieto hodnoty vodnej aktivity sú vhodné na prevenciu rastu vegetatívnych foriem niektorých kmeňov *Clostridium botulinum* a na prevenciu produkcie ich toxínov. Pri vodnej aktivite tavených syrov nižšej ako 0,944 nebola zistená žiadna produkcia botulotoxínu. (Buňková a Buňka, 2017)

2.4 pH

Väčšina mikroorganizmov sa najlepšie rozmnožuje pri pH neutrálnom (pH medzi 6,6 – 7,5). Tavené syry (pH 5,6 – 6,0) a mäsové konzervy a polokonzervy (pH vyššie ako 5,2) patria medzi nízko kyslé alebo nekyslé potraviny, čo umožňuje rast mnohých mikroorganizmov a hodnota pH prostredia taktiež môže ovplyvniť klíčenie spór. (Buňková a Buňka, 2017; Magar, 2025)

2.5 Prídavok látok s emulgujúcimi účinkami

Látky s emulgujúcimi účinkami - fosforečnany, polyfosforečnany a citrany môžu spôsobovať zmenu pH alebo iónovej sily zmesi. Na zabezpečenie uplatnenia emulgujúcich vlastností kazeínu sa používajú hlavne polyfosforečnany, ktoré pôsobia antibakteriálne na grampozitívne baktérie. (Buňková a Buňka, 2017)

3 VYBRANÉ GRAMPOZITÍVNE BAKTÉRIE V POTRAVINÁCH

Grampozitívne baktérie sú v potravinách bežné, ale môžu mať rôzne účinky na ich kvalitu a bezpečnosť. Grampozitívne baktérie sú rôznorodá skupina baktérií, ktoré sa vyznačujú hrubou bunkovou stenou tvorenou peptidoglykánom, ale nemajú vonkajšiu lipopolysacharidovú membránu. (Groman, 2009; Rogers, 2025)

Táto kapitola sa zaoberá iba charakteristikou vybraných grampozitívnych baktérií z čeľade *Bacillaceae* izolovaných v tejto práci z tavených syrov a mäsových konzerv a polokonzerv.

3.1 *Bacillus amyloliquefaciens*

Bacillus amyloliquefaciens je všadeprítomná aeróbna baktéria s peritrichóznymi bičíkmi, ktorá sa bežne vyskytuje v pôdnom prostredí. Využíva sa na produkciu rôznych proteínov, ako sú β -glukánáza, α -amyláza, celuláza, peroxidáza, keratináza a ďalšie. Pôsobí ako ideálne multifunkčné probiotikum kvôli účinnému potláčaniu patogénnych baktérií a zlepšovaniu vstrebávania živín. Okrem všetkého má *B. amyloliquefaciens* viacero výhod aj v oblasti poľnohospodárstva, ako bio hnojivo, vďaka produkcii sekundárnych metabolitov s antimikrobiálnou aktivitou voči rôznym fytopatogénnym mikroorganizmom, čím podporuje rast rastlín a zlepšuje ich celkový stav. V komposte výrazne zvyšuje obsah uhlíka, čím zlepšuje kvalitu pôdy. (Zalila-Kolsi et al., 2023; Dhumal et al., 2021; Luo et al., 2022)

Táto baktéria je taktiež schopná vytvárať komplexné biofilmy, ktoré slúžia ako živé biologické materiály vhodné na produkciu rôznych funkčných biomateriálov – rastových faktorov, antibiotík, lyzozýmu a antimikrobiálnych peptidov pre medicínske účely. Tvorba biofilmu *B. amyloliquefaciens* zároveň prispieva k zvýšeniu odolnosti jačmeňa voči slanostnému stresu. (Zalila-Kolsi et al., 2023)

3.2 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus je fakultatívne anaeróbna baktéria vyskytujúca sa v životnom prostredí. Kontaminuje potraviny a produkuje toxíny, ktoré môžu po požití spôsobiť gastrointestinálne ťažkosti, pričom enterotoxíny spôsobujú hnačky a emetický toxín vracanie. Môže dochádzať aj k iným poškodeniam netýkajúcich sa tráviaceho traktu, a to k infekciám kože a očí. Tieto formy črevných a mimočrevných infekcií súvisia s produkciou tkaniva poškodzujúceho

exoenzy – hemolýzami, proteázami, fosfolipázami a ceramidázami. (McDowell et al., 2023; BNO, 2021)

Tak ako aj iné baktérie z rodu *Bacillus*, aj *Bacillus cereus* tvorí spóry. Tieto spóry sú mimoriadne odolné voči extrémnym podmienkam, ako sú vysoké či nízke teploty, sucho alebo slané prostredie, ale dokážu prežiť aj vo vlhkých a kyslých potravinách, kde sa môžu množiť a začať klíčiť. (ŠVPS, 2023)

B. cereus najčastejšie kontaminuje potraviny rastlinného pôvodu, z dôvodu výskytu v pôde, ale nevyhýba sa mäsovým výrobkom či pasterizovanej smotane. Tepelné opracovanie síce ničí vegetatívne bunky, ale to zároveň vytvára priaznivé podmienky na klíčenie spór a následné množenie patogénu v potravine. (ŠVPS, 2023)

3.3 *Bacillus pumilus*

Bacillus pumilus je aeróbná termofilná baktéria, ktorá je schopná produkcie množstva biologicky aktívnych látok prospešných pre organizmus, napr. hydrolytických enzýmov, vitamínov a aminokyselín. Tento mikroorganizmus má tiež schopnosť priamo rozkladať niektoré mikroorganizmy, ako je napr. *Staphylococcus*, či iné grampozitívne baktérie čomu vďaka jeho lyzozýmovej aktivite. Okrem toho môže aj pozitívne ovplyvňovať črevné prostredie, lebo sa zúčastňuje na biologickom viazaní kyslíka v čreve, čím vytvára priaznivé podmienky pre rast a množenie prospešných anaeróbných baktérií a pomáha udržiavať črevnú mikrobiálnu rovnováhu. (Zhao et al., 2023)

3.4 *Bacillus siamensis*

Menej známy *Bacillus siamensis* patrí do skupiny *Bacillus subtilis* a jeho heterotypické synonymum je *Bacillus vanillea*. Táto fakultatívne anaeróbná pohyblivá baktéria bola izolovaná zo soleného kraba v Thajsku. (Sumpavapol et al., 2010; Dunlap, 2015)

3.5 *Bacillus velezensis*

Aeróbný *Bacillus velezensis* tvorí endospóry a je známy svojimi silnými antimikrobiálnymi vlastnosťami a schopnosťou podporovať rast rastlín. Genomové štúdie odhalili, že *B. velezensis* obsahuje kmeňovo špecifické klastre génov súvisiacich so syntézou sekundárnych metabolitov. Niektoré kmene tohto druhu sú účinné pri potláčaní rastu rôznych

mikrobiálních patogénov, vrátane baktérií, húb a hlíst. Vďaka týmto schopnostiam sa využíva ako biologický pesticíd. (Rabbee et al., 2019; Su et al., 2024)

Okrem toho je *B. velezensis* sľubným probiotikom, pretože vyznačuje vysokú toleranciu voči žlčovým soliam, úspešne kolonizuje črevnú sliznicu a dokáže pozitívne ovplyvniť črevnú mikrobiotu tým, že podporuje rast prospešných mikroorganizmov. (Su et al., 2024)

3.6 *Cytobacillus horneckiae*

Cytobacillus horneckiae (pôvodne klasifikovaný ako *Bacillus horneckiae*) patrí k menej známym zástupcom rodu *Cytobacillus* z čeľade *Bacillaceae*. Táto aeróbna polyextrémofilná baktéria bola izolovaná z povrchov sterilizačných zariadení na Medzinárodnej vesmírnej stanici (ISS), čo značí jej vysokú odolnosť voči suchu, radiácii a iným extrémnym podmienkam. Podľa štúdií NASA spóry *Cytobacillus horneckiae* izolované z priestoru, kde sa montovala kozmická sonda Phoenix, vykazovali odolnosť voči UV žiareniu až do intenzity 1000 J/m². Spóry sa nachádzali subterminálne, t. j. blízko konca bunky, a boli obklopené vonkajšou ochrannou vrstvou. (NTRS, 2011; Vaishampayan et al., 2010)

3.7 *Lysinibacillus fusiformis*

Lysinibacillus fusiformis je bežne vyskytujúca sa baktéria tvoriaca endospóry, ktoré umožňujú odolnosť voči nepriaznivým podmienkam, ako sú extrémne teploty, vysychanie a chemické dezinfekčné prostriedky. (Morioka et al. 2021; BiologyInsights Team, 2024)

Predpokladá sa, že *L. fusiformis* môže spôsobovať tropické vredy. V tejto súvislosti sa hovorí o prípade baktériémie – prítomnosti baktérií v krvi – spôsobenej *L. fusiformis*, ktorý bol spriahnutý so vznikom pľuzgierov pri kóme. (Morioka et al. 2021)

3.8 *Paenibacillus glucanolyticus*

Paenibacillus glucanolyticus (pôvodne klasifikovaný ako *Bacillus glucanolyticus*) je fakultatívne anaeróbna baktéria známa svojou schopnosťou rozkladať zložité sacharidy – celulózu a hemicelulózu – a má potenciálne využitie v priemysle a environmentálnych procesoch. (BiologyInsights Team, 2024; Mathews et al. 2014)

3.9 *Peribacillus simplex*

Peribacillus simplex je spórotvorná baktéria, ktorá sa vyskytuje v rôznych prostrediach. Patrí do skupiny rizobaktérií podporujúcich rast rastlín pri mnohých plodinách prostredníctvom fixácie živín a produkcie antimikrobiálnych zlúčenín. *P. simplex* vykazuje širokú škálu aktivity, stimuluje rast u paradajok, pšenice, sóji alebo kukurice. Môže byť lepšou alternatívou hnojív pri produkcii potravín, lebo v niektorých prípadoch môže vykazovať podobné výsledky ako s použitím chemických hnojív. Táto baktéria má taktiež potenciál na bioremediáciu, teda schopnosť odbúravať a odstraňovať kontaminanty ako sú ťažké kovy, pesticídy alebo ropné látky z prostredia. (Manetsberger et al., 2023)

II PRAKTICKÁ ČASŤ

4 CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo v teoretickej časti vypracovať literárnu rešerš zameriavajúcu sa na charakterizáciu grampozitívnych baktérií v potravinách, ktoré nepodporujú ich rast, popísať potraviny, z ktorých boli jednotlivé kmene izolované a na faktory, ktoré ovplyvňujú výskyt týchto mikroorganizmov v potravinách.

Hlavným cieľom praktickej časti bolo identifikovať pomocou molekulárnej metódy sekvencie časti génu 16S rRNA a charakterizovať grampozitívne kmene izolované z potravín, ktoré sú mikrobiologicky nerizikové. V rámci naplnenia tohto cieľa boli prevedené nasledovné kroky:

- testovanie vplyvu 3 rôznych teplôt na rast,
- schopnosť tvorby biofilmu,
- testovanie antibiotickej rezistencie.

5 POUŽITÝ MATERIÁL

5.1 Popis testovaných vzoriek

Pre praktickú časť tejto bakalárskej práce bolo použitých 14 bakteriálnych kultúr izolovaných v rámci dizertačnej práce Ing. Ivany Huňovej. Tieto vzorky boli izolované z tepelne ošetrovaných potravín, a to z tavených syrov ($n = 1$) a mäsových konzerv ($n = 13$). Potravinárske výrobky boli buď vyrobené na Ústave technológií potravín v Zlíne, Univerzite obrany v Brne, kde boli vzorky následne nechané pri teplotách 5 °C, 25 °C a 40 °C, alebo pochádzajú z obchodných reťazcov. Potraviny neboli ďalej ošetrované pasterizáciou.

5.2 Kultivačné médiá a roztoky

NB (Nutrient Broth)

- **zloženie:** 5,0 g/l mäsový peptón, 1,5 g/l hovädzí extrakt, 1,5 g/l kvasničný extrakt, 1,5 g/l chlorid sodný
- **použitie:** všeobecne použiteľné tekuté kultivačné médium
- **príprava:** naváženie 13,0 g prípravku na 1000 ml destilovanej vody, rozpustenie a sterilizácia v autokláve pri 121 °C po dobu 15 min

PCA (Plate Count Agar)

- **zloženie:** 15,0 g/l agar, 5,0 g/l enzymatický digest kazeínu/tryptónu, 2,5 g/l kvasničný extrakt, 1,0 g/l glukóza
- **použitie:** všeobecne použiteľné pevné kultivačné médium
- **príprava:** naváženie 23,5 g prípravku na 1000 ml destilovanej vody, rozpustenie a sterilizácia v autokláve pri 121 °C po dobu 15 min

MHA (Mueller-Hinton agar)

- **zloženie:** 17,5 g/l kyslý hydrolyzát kazeínu, 17,0 g/l agar, 2,0 g/l hovädzí extrakt, 1,5 g/l škrob

- **použitie:** stanovenie citlivosti mikroorganizmov na antimikrobiálne látky diskovo difúznou metódou
- **príprava:** naváženie 21 g prípravku na 1000 ml destilovanej vody, rozpustenie a sterilizácia v autokláve pri 121 °C po dobu 15 min

BHI (Brain Heart Infusion Agar)

- **zloženie:** 12,5 g tel'acia mozgová sušina, 10 g proteózový peptón, 5 g mozgovo srdcová sušina, 5 g chlorid sodný, 2,5 g hydrogénfosforečnan (di)sodný, 2 g dextróza
- **použitie:** kultivácia nutrične náročnejšie mikroorganizmy, biofilm
- **príprava:** naváženie 37,0 g prípravku na 1000 ml destilovanej vody, rozpustenie a sterilizácia v autokláve pri 121 °C po dobu 15 minút

Fyziologický roztok

- **použitie:** riedenie vzoriek na požadované koncentrácie
- **príprava:** naváženie 8,5 g NaCl na 1000 ml destilovanej vody, rozpustenie a sterilizácia v autokláve pri 121 °C po dobu 15 min

5.3 Pomôcky a zariadenia

- automatické jednonábové a multikanábové pipety 10 až 1000 µl (Eppendorf)
- sterilné špičky bez filtrov, pinzety a kľíčky
- laborátorne sklo: kadičky, skúmavky, fľaše s uzáverom, odmerný valec, Erlenmeyerova banka
- mikroskopické a podložné sklíčka
- plastové sterilné skúmavky s objemom 15 ml a 50 ml
- sterilné plastové Petriho misky ø 60 mm a ø 90 mm
- stojan na skúmavky

- sterilná 96-jamková mikrotitračná doštička s vrchnákom (GAMA®)
- sterilné eppendorfkové mikroskúmavky a PCR mikroskúmavky v stripoch
- elektroforetická vanička, hrebienky a silikónové tesnenie
- komerčný izolačný kit DNeasy® Blood Tissue Kit 250 (QIAGEN)
- komerčný kit DeNovix dsDNA High Sensitivity Assay
- magnetický stojan (Magic Stand-96)
- nitrilové rukavice

Prístroje:

- biohazard box
- kahan
- mikrovlnná trúba (Electrolux)
- chladnička (Beko)
- binokulárny mikroskop (Olympus SM 44)
- denzitometer (Densi-La-meter®)
- laboratórna autokláva (Tuttnauer)
- horizontálna elektroforetická vaňa s vrchnákom multiSUB
- termostat (BT 120)
- termoblok Bio TDP-100 (Biosan)
- VX-200 Vortex Mixer (Labnet), Biosan Vortex V-1 plus
- centrifuga MiniSpin (Ependorf), Dry Block Termostat TDB-100 (Biosan)
- PCR cycler Bio-Rad C1000 Thermal Cycler

- Tecan Infinite M200 PRO
- Stomacher ® 400
- bioreaktory RTS-1C (Biosan)
- UV transluminátor SynGene InGenius LHR2
- zdroj jednosměrného elektrického proudu (Consort EV243)

5.4 Roztoky a chemické činidla

- destilovaná voda
- 96 % etanol
- kryštalová violet'
- Lugolov roztok
- safranin
- agaróza (SeaKem® LE Agarose for gel electrophoresis)
- forward primer FD1
- reverse primer RD1
- sterilná PCR voda
- VWR Red Taq DNA Polymerase Master Mix
- TAE pufr (tris-acetát-EDTA)
- PBS pufr
- Red gel (etídiumbromid) – UV vizualizačné fluorescenčné činidlo
- porovnávací marker 100 bp DNA Ladder
- magnetické častice SPRIselect

- antimikrobiálne disky (kapitola 5.5, tabuľka 1)

5.5 Antimikróbne disky

U vybraných grampozitívnych bakteriálnych izolátov bola testovaná citlivosť na antimikrobiálne látky diskovo-difúznou metódou. Táto metóda využíva komerčne vyrábané antibiotiká v podobe papierových diskov s priemerom 6 mm napustených určitým množstvom antibiotika. Antibiotiká vybrané pre testovanie sú uvedené v tabuľke 1. Antibiotiká boli zvolené na základe doporučeného výberu podľa EUCAST (Európsky výbor pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti).

Tabuľka 1 Zoznam použitých antimikrobiálnych látok a ich koncentrácie

Skupina	Antimikrobiálna látka	Skratka antimikrobiálnej látky	Koncentrácia (μl/disk)
Amfenikoly	chloramfenikol	C	30
Aminoglykosidy	amikacín	AK	30
	gentamycín	HLG	120
	tobramycín	TOB	10
Beta-laktámy	imipenem	IPM	10
	meropenem	MRP	10
	penicilín	P	1 unit
Fluorochinolóny	ciprofloxacin	CIP	5
	levofloxacin	LE	5
	norfloxacin	NX	5
Glykopeptidy	vancomycín	VA	10
Linkozamidy	clindamycín	CD	2
Makrolidy	erytromycín	E	5
Tetracyklíny	tertracyklín	TE	10

6 METODIKA

6.1 Izolácia grampozitívnych baktérií z potravín

Pre experiment boli použité bakteriálne kultúry izolované v rámci prebiehajúceho štúdia Ing. Ivany Huňovej. Jednotlivé kmene boli izolované bežne používanými metódami pre izoláciu mikroorganizmov z potravín, a to postupy ako sú homogenizácia vzorku, naočkovanie suspenzie na dané živné médium, kultivácia a odčítanie vyrastených kolónií.

Morfológia (veľkosť, farba, tvar, okraj a povrch) kolónií kmeňov bola zhodnotená vizuálne po krížovom roztere. Dôležité bolo získať čistú kultúru daného kmeňa, pretože rôznorodosť kolónií by značila prítomnosť iných mikroorganizmov.

6.2 Identifikácia grampozitívnych baktérií

Opakovaným preočkovaním izolovaných kultúr pomocou krížového rozteru na PCA agar boli najskôr získané čisté kultúry, čo bolo potvrdené Gramovým farbením a následným mikroskopovaním. Izolované grampozitívne baktérie boli následne identifikované pomocou molekulárnej metódy PCR a následnou sekvenciou časti génu 16S rRNA.

6.2.1 Gramovo farbenie

Mikroskopické zhodnotenie čistoty kolónií bolo prevedené Gramovým farbením. Princípom Gramovho farbenia je rozdelenie baktérií na grampozitívne a gramnegatívne. To, do ktorej skupiny patria závisí na štruktúre ich bunkovej steny a na rozdielnej reakcii a chemikáliami použitými počas farbenia.

Prvým krokom pri Gramovom farbení je príprava fixovaného preparátu daného kmeňa a následná aplikácia farbiva kryštálovej violeti, ktorá preniká do buniek. Roztok tohto farbiva sa necháva pôsobiť po dobu 60 sekúnd. Destilovanou vodou je tento roztok spláchnutý a následne prevrstvený Lugolovým roztokom, ktorý sa tiež necháva pôsobiť 60 sekúnd a potom sa z preparátu opláchne destilovanou vodou. Lugolov roztok tvorí s kryštálovou violetou jódový komplex, preto sú grampozitívne baktérie stabilnejšie. Preparát sa prevrství malým množstvom acetónu po dobu maximálne 15 sekúnd, ktorý ho v prípade grampozitívnych baktérií neodfarbí a naopak u grampozitívnych baktérií je prítomná vonkajšia membrána, takže udržanie komplexu kryštálová violet'-jód v tomto prípade nie je možné, takže dôjde k odfarbeniu. Nasleduje opláchnutie destilovanou vodou.

Posledným krokom je dofarbenie roztokom safraninu, ktorý sa viaže na gramnegatívne baktérie. Gramovo farbenie hovorí o štruktúre bunkovej steny, ale bližšie informácie k identifikácii mikroorganizmov neposkytuje.

6.2.2 Izolácia bakteriálnej DNA

Izolácia bola prevedená podľa protokolu doporučeného výrobcom komerčného izolačného kitu DNeasy® Blood and Tissue (QIAGEN).

Pipetou bolo odobraných 2 ml 24-hodinovej bakteriálnej kultúry, ktorá bola prenesená do eppendorfkovej mikroskúmavky. Obsah mikroskúmavky bol odstredený pomocou centrifúgy (14500 ot./min, 2 minúty). Supernatant bol opatrne zliaty, prípadne odpipetovaný tak, aby pelet ostal nepoškodený. K peletu bolo pridaných 200 µl pufru PBS a obsah premiešaný pomocou vortexu. K resuspenovanej zmesi bolo pridaných 200 µl pufru AL a obsah bol päť dôkladne premiešaný pomocou vortexu. Mikroskúmavky so zmesou boli vložené na inkubáciu do termobloku a zahrievané na 56 °C po dobu 10 minút. Následne bolo pridaných 200 µl 96 % etanolu. Zmes bola premiešaná pomocou vortexu, potom bola napipetovaná na DNeasy Mini spinovej kolónky s membránou, ktorá bola umiestnená do 2 ml zbernej skúmavky. Následne bola pripravená aparatúra odstredená na centrifúge (8000 ot./min, 1 minúta). Po centrifugácii bola zberná skúmavka s prietokovým roztokom odstránená. Spinová kolóna s membránou bola vložená do novej 2 ml zbernej skúmavky, kam bolo pridaných 500 µl pufru AW1 a zmes bola odstredená pomocou centrifúgy (8000 ot./min, 1 minúta). Zberná skúmavka s roztokom bola opäť odstránená. Na kolónku s membránou bola znova nasadená 2 ml zberná skúmavka, bolo pridaných 500 µl AW2 a zmes bola opäť odstredená (14500 ot./min, 3 minúty). Po odstredení bola zberná skúmavka s prietokovým roztokom odstránená. Pod spinovú kolónku s membránou bola umiestnená 2 ml mikrocentrifugačná skúmavka, kde bola izolovaná DNA eluovaná do pridaním 200 µl pufru AE do stredu kolónky. Kolónka s vzorkou bola inkubovaná pri laboratórnej teplote počas 10 minút a nakoniec opäť odstredená pomocou centrifúgy (8000 ot./min, 1 minúta). Vzorka s DNA bola presunutá do sterilnej 2 ml eppendorfkovej mikroskúmavky (DNeasy Blood and Tissue Kits for DNA Isolation, 2024).

6.2.3 Kontrola koncentrácie a čistoty izolovanej DNA

Kontrola koncentrácie a čistoty izolovanej DNA bola zistená pomocou spektrofotometru Tecan Infinite M200 PRO. Najskôr bolo na spektrofotometrickú doštičku napipetovaných

2 μl elučného pufru AE (blank) a bola zmeraná absorbancia. Doštička bola poriadne očistená etanolom a následne na ňu bolo napipetovaných 2 μl vzorky. Takto bola zmeraná absorbancia vzoriek v porovnaní s blankom. Absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke 260 a 280 nm.

6.2.4 Polymerázová reťazová reakcia

Pre amplifikáciu špecifického úseku DNA – génu 16S rRNA – bola prevedená PCR, pričom ako templátová DNA bola použitá izolovaná bakteriálna DNA (z kapitoly 6.4). Týmto spôsobom bol získaný PCR produkt, ktorý následne slúžil na ďalšiu analýzu.

Podľa odporúčenia výrobcu bol v PCR boxe pripravený master mix, ktorý obsahoval pre 1 reakčnú zmes s celkovým objemom 25 μl 12,5 μl už predpripraveného master mixu (VWR Red Taq DNA Polymerase Master mix), 0,5 μl primeru FD1 a 0,5 μl primeru RD1, 10,5 μl PCR vody. Všetky komponenty boli dôkladne premiešané pomocou vortexu. Do sterilných 0,2 ml mikroskúmaviek bolo napipetovaných 24 μl master mixu a následne 1 μl templátovej DNA. Pre negatívnu kontrolu bol použitý len master mix, bez templátovej DNA.

Vzorky boli odstredené pomocou mikrocentrifúgy a umiestnené do PCR termocyklera. Následne bol nastavený PCR program. Priebeh PCR je uvedený v tabuľke 2.

Tabuľka 2 Program pre amplifikáciu DNA pre sekvenciu génu pre 16S rRNA

Fáza cyklu	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas [s]
Počiatočná denaturácia	95	180
Denaturácia	95	30
Annealing primerov	63	30
Elongácia	72	90
Záverečná extenzia	72	360
Chladenie	4	neobmedzene

6.2.5 Vizualizácia DNA

Na vizualizáciu PCR amplifikovaného produktu z predchádzajúceho kroku (kapitola 6.5) bola použitá agarózová horizontálna elektroforéza.

PCR amplifikovaný produkt bol detekovaný na 1,5 % agarózovom gély, ktorý bol pripravený navážením 3,75 g agarózy do Erlenmayerovej banky a pridaním 250 ml pufru TAE. Po rozpustení agarózy v pufre bola Erlenmayerova banka vložená do mikrovlnnej trúby, kde bol roztok agarózy rozvarený. Po vychladnutí agarózového roztoku na cca 60 °C, bolo pridaných 5 kvapiek vizualizačného flourescenčného farbiva Gel-Red (etídiumbromid), ktoré bolo v roztoku poriadne rozmiešané.

Pripravený agarózový roztok bol naliaty do predpripravenej elektroforézovej vaničky s umiestnenými hrebienkami pre požadované množstvo jamiek a nechaný pri laboratórnej teplote do stuhnutia. Po stuhnutí boli z gélu odstránené hrebienky a gél bol vložený do elektroforézovej nádoby s pufrom TAE tak, aby bol v ňom celý gél ponorený. Na zaistenie migrácie záporne nabitej DNA ku kladne nabitej anóde, boli jamky umiestnené k záporne nabitej katóde. Do prvej a poslednej jamky boli napipetované 3 µl porovnávacieho markeru (100 bp DNA Ladder) a do ostatných bolo napipetovaných 5 µl analyzovanej vzorky vrátane negatívnej kontroly – bez analyzovanej DNA. Po nanesení všetkých vzoriek bola elektroforézová nádoba prikrytá viečkom. Nachystaná elektroforetická aparatura bola pripojená k zdroju jednosmerného elektrického prúdu s napätím 90 V s trvaním 60 minút.

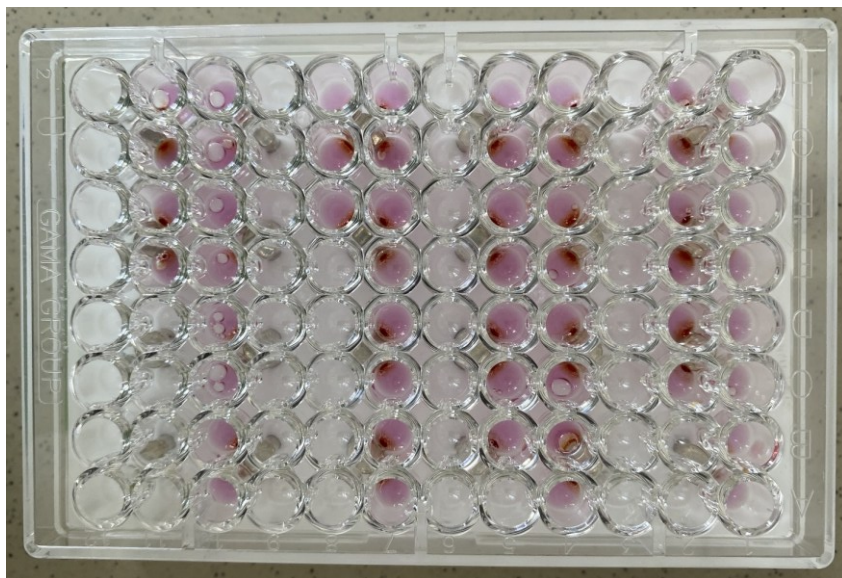
Po dokončenej separácii vzoriek bol zdroj prúdu odpojený a gél s vaničkou bol vytiahnutý z nádoby. DNA amplikóny boli vizualizované pomocou UV transluminátora SynGene.

6.2.6 Purifikácia DNA

Amplifikované DNA úseky získané pomocou PCR boli následne očistené – purifikované, aby sa zvýšila ich čistota. Týmto procesom boli odstránené prípadné nešpecifické produkty a zvyšné PCR komponenty (primery, nenaviazané oligonukleotidy). Na purifikáciu DNA bol použitý roztok obsahujúci magnetické častice SPRIselect.

Na sterilnú 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku bolo multikanálovou pipetou napipetovaných 20 µl vzorky a 16 µl roztoku s magnetickými časticami. Mikrotitračná doštička bola položená na magnetický stojan Magic Stand-96 a nechaná pri laboratórnej teplote približne 10 minút. Magnetické častice s DNA boli naviazané na magnet stojanu a opatrne bol odpipetovaný supernatant (časť bez DNA). Nasledovne bolo do každej jamky s naviazanou DNA napipetovaných 180 µl nedenaturovaného 85 % etanolu. Mikrotitračná doštička bola opäť ponechaná pri laboratórnej teplote na 10 minút. Potom bol etanol opatrne

odpipetovaný, aby nedošlo k porušeniu DNA naviazanej na magnete. Prebytok etanolu bol odparený v termobloku pri 65 °C po dobu 5 minút. Po odparení etanolu bolo pridaných do každej jamky 30 µl sterilnej PCR vody na elúciu DNA a mikrotitračná doštička bola znova položená na magnetický stojan, dokiaľ nebola kvapalina v jamkách úplne číra. Číra kvapalina s DNA bola odpipetovaná do sterilných PCR mikroskúmaviek.



Obrázok 1 Purifikácia DNA pomocou SPRIselect

6.2.7 Kontrola koncentrácie purifikovanej DNA

Po purifikácii DNA bola prevedená kontrola koncentrácie pomocou kitu od DeNovix. Pracovný roztok bol pripravený zmiešaním 30 ml pufru s 30 µl fluorescenčného farbiva. Na 1 vzorku bolo potrebných 190 µl pracovného roztoku a 2 µl purifikovanej DNA.

6.2.8 Identifikácia izolovaných mikroorganizmov sekvenciou génu pre 16S rRNA, úprava chromatogramov

Purifikované vzorky DNA boli poslané na sekvenciu génu pre 16S rRNA do firmy SEQme s.r.o. (Dobříš). Získané chromatogramy boli upravené v pomocou DNA Baser Assemblies do formátu FASTA a následne porovnané s najpodobnejšími známymi sekvenciami z medzinárodnej databázy sekvencií U.S. National Library of Medicine pomocou softwaru BLAST®, ktorý je bezplatný na adrese <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

6.3 Charakterizácia grampozitívnych baktérií

Izolované a identifikované grampozitívne baktérie boli ďalej použité v rade experimentov s cieľom testovať ich vlastnosti. Bol testovaný rast vybraných grampozitívnych baktérií pri rôznych teplotách, schopnosť tvorby biofilmu a rezistencia na antibiotiká.

6.3.1 Testovanie rastu grampozitívnych baktérií pri rôznych teplotných podmienkach

Rast vybraných izolovaných kmeňov bol testovaný pri teplotách 25 °C, 30 °C a 40 °C. Kultivácia prebiehala v osobných bioreaktoroch RTS-1C (Biosan). Inkubácia jednotlivých mikroorganizmov bola cca 48 hodín, v závislosti od rastu. Postup analýzy bol prevedený podľa odporúčenia výrobcu bioreaktorov RTS-1C (Biosan).

Vybrané izoláty boli pomnožené v NB bujóne. Po 24-hodinovej kultivácii bolo odobrané určité množstvo bakteriálnej suspenzie z NB bujónu do fyziologického roztoku tak, aby výsledný zákal meraný denzimetrom odpovedal hodnote 0,5 podľa McFarlanda. Do 50 ml sterilnej plastovej skúmavky bolo napipetovaných 30 ml NB bujónu a pridaných 50 µl bakteriálnej suspenzie vo fyziologickom roztoku. Naplnené skúmavky boli zatvorené vrchnákom, ktorý bol dôkladne dotiahnutý, aby nedošlo k vyliatiu obsahu skúmavky.

Skúmavky boli vložené na kultiváciu do bioreaktorov RTS-1C (Biosan) na približne 48 hodín. Nastavené parametre sú v tabuľke 3.

Tabuľka 3 Nastavené parametre bioreaktoru RTS-1C (Biosan)

Parameter	
Teplota kultivácie [°C]	25/30/40
Počet otáčok RPM [ot./min]	2000
Interval merania [min]	30
Frekvencia reverzných otáčok [s ⁻¹]	1
Objem vzorky [ml]	30

Vyhodnotenie rastu bolo podľa získaných dát zostavením rastových kriviek závislosti optickej hustoty kultúry (OD) pri vlnovej dĺžke 850 nm na čase (t) v závislosti na teplote.

6.3.2 Testovanie schopnosti tvorby biofilmu Christensenovou metódou

Schopnosť tvorby biofilmu bola analyzovaná u grampozitívnych izolátov pomocou modifikovanej Cristensenovej metódy s 96-jamkovou mikrotitračnou doštičkou.

Bakteriálne izoláty boli pomnožené v bujóne a kultivované pri 37 °C na 24 hodín. Potom bola pripravená suspenzia s fyziologickým roztokom na hodnotu 1,0 podľa McFarlanda. Do jamiek mikrotitračnej doštičky bolo pipetovaných vždy 10 µl bakteriálnej suspenzie vo fyziologickom roztoku a 200 µl BHI bujónu. Prvé dva riadky a stĺpce obsahovali len bujón a slúžili ako negatívna kontrola. Jednej vzorke vždy patrili 3 jamky pod sebou. Schéma obsahu mikrotitračnej doštičky je znázornená na obrázku 2. Mikrotitračná doštička bola prekrytá vrchnákom a inkubovala sa pri 30 °C po dobu 48 hodín. (Pleva et al., 2021)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	negatívna kontrola		A1	B1	B3	C5	E3	E5	H2	L3	L4	N2
B												
C												
D			O1	R1	X1	W1						
E												
F												

Obrázok 2 Schéma obsahu mikrotitračnej doštičky

Po ukončení doby kultivácie bol obsah mikrodostičky vyliaty do odpadnej nádoby a 3-krát opatrne premytý destilovanou vodou. Zvyšok vody bol jemne vyklepaný na filtračný papier. Potom bolo do každej jamky napipetovaných 200 µl kryštálovej vianoťi a mikrotitračná doštička bola ponechaná na inkubáciu pri laboratórnej teplote počas 20 minút. Následne bol obsah znova odstránený premytím destilovanou vodou a ponechaný na vysušenie. Po vysušení bolo do mikrotitračnej doštičky napipetovaných 200 µl 96 % etanolu, ktorý bol ponechaný po dobu 15 minút, aby sa vypudilo prevyšujúce farbivo. Nakoniec bol etanol z mikrodostičky odstránený. (Pleva et al., 2021)

Absorbancia bola meraná pomocou spektrofotometru Tecan Infinite M200 PRO pri vlnovej dĺžke 595 nm a ako blank bol použitý BHI bujón bez mikroorganizmu.

Pri interpretácii výsledkov boli z absorbancií negatívnych kontrol a absorbancií vzoriek vypočítané priemery absorbancií. Odčítaním priemernej hodnoty absorbancie vzorky od priemernej hodnoty absorbancie negatívnej kontroly bola vypočítaná výsledná hodnota absorbancie (A_{595}). Hraničná hodnota pre biofilm-pozitivitu – cut-off value (CV) – bola určená ako súčet trojnásobku smerodajnej odchýlky negatívnej kontroly a jej priemernej absorbancie. (Pleva et al., 2021)

Získané výsledky jednotlivých testovaných izolátov boli rozdelené do troch skupín podľa stanovenej hraničnej hodnoty:

- kmeň netvoriaci biofilm: $A_{595} \leq CV$,
- kmeň slabo tvoriaci biofilm: $CV < A_{595} \leq 2 CV$,
- kmeň silno tvoriaci biofilm: $A_{595} > 2 CV$.

6.3.3 Testovanie rezistencie na antibiotiká diskovo difúznou metódou

Izoláty boli analyzované na rezistenciu voči 14 vybraným antimikróbnym látkam pomocou fenotypového skríningu, ktorý sa uskutočnil diskovo difúznou metódou. Použité antibiotické látky boli amikacín, ciprofloxacín, clindamycín, erythromycín, gentamycín, chloramfenikol, imipenem, levofloxacín, meropenem, norfloxacín, penicilín, tetracyklín, tobramycín a vankomycín. Pre lepšiu prehľadnosť sú v tabuľke 1 rozdelené do skupín. Pracovalo sa v súlade so štandardizovanými pokynmi EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing); (EUCAST, 2024).

Bakteriálne kultúry boli pomnožené v NB bujóne a kultivované po dobu 24 hodín. Na Petriho misky s priemerom 90 mm bolo nanosených približne 20 ml MHA agaru. Po zatuhnutí MHA agaru bolo na miskú napipetovaných a rozotretých 200 μ l bakteriálnej kultúry vo fyziologickom roztoku, ktorá odpovedala hodnote 0,5 podľa McFarlanda. Následne bolo na jednu miskú sterilnou ihlou opatrne vložených 5 rôznych antibiotík v podobe papierových diskov s priemerom 6 mm (kapitola 5.5, tabuľka 1). Zaočkované Petriho misky s papierovými diskami boli kultivované pri 37 °C po dobu 20 ± 2 hodín.

Po skončení kultivácie bola, v porovnaní s tmavým pozadím, stanovená citlivosť každého izolátu pre každú antimikróbnu látku meraním inhibičných zón vzniknutá okolo

antibiotických diskov (v mm). Citlivost na testované antibiotiká bola hodnotená na základe referenčných limitných hodnôt stanovených metodikou EUCAST (EUCAST, 2024).

7 VÝSLEDKY

7.1 Identifikácia bakteriálnych izolátov sekvenciou 16S rRNA

U izolovaných bakteriálnych kmeňov bola prevedená identifikácia na úrovni druhu pomocou metódy sekvencie génu pre 16S rRNA, ktorá je popísaná v kapitole 6.2.8. V tabuľke 4 sú zaznamenané identifikované bakteriálne kmene s hodnotami zhody v percentách.

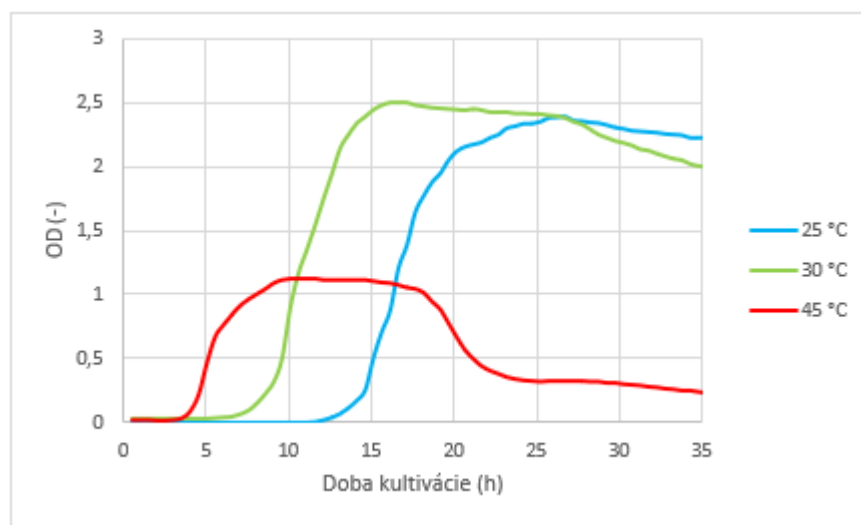
Tabuľka 4 Výsledky identifikácie baktérií sekvenciou génu pre 16S rRNA

Kód vzorky	Identifikovaná baktéria	Zhoda [%]
E3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98,4
A1	<i>Bacillus cereus</i>	99,6
L3	<i>Bacillus pumilus</i>	98,3
L4	<i>Bacillus siamensis</i>	98,2
W1	<i>Bacillus velezensis</i>	99,9
X1	<i>Bacillus velezensis</i>	99,6
B1	<i>Cytobacillus horneckiae</i>	99,6
H2	<i>Cytobacillus horneckiae</i>	94,7
O1	<i>Cytobacillus horneckiae</i>	96,0
R1	<i>Cytobacillus horneckiae</i>	96,8
B3	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	91,3
N2	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	98,8
C5	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	98,2
E5	<i>Peribacillus simplex</i>	97,2

Sekvenciou génov pre 16S rRNA bolo identifikovaných celkom 14 grampozitívnych kmeňov, medzi ktoré patrili zástupcovia rodov *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. siamensis*, *B. velezensis*), *Cytobacillus* (*C. horneckiae*), *Lysinibacillus* (*L. fusiformis*), *Paenibacillus* (*P. glucanolyticus*) a rodu *Peribacillus* (*Pe. simplex*).

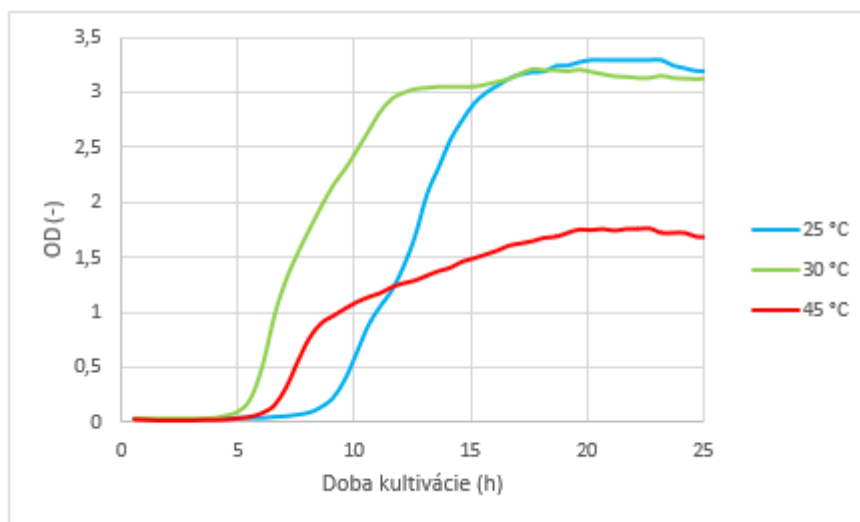
7.2 Testovanie rastu grampozitívnych baktérií pri rôznych teplotných podmienkach

Testovanie rastu grampozitívnych bakteriálnych izolátov bolo sledované pri teplotách 25 °C, 30 °C a 45 °C. U každej teploty bolo meranie prevedené 2-krát a pre výsledné vyhodnotenie boli hodnoty spriemerované. Vyhodnotenie rastu bakteriálnych kmeňov pri daných teplotách bolo prevedené zo získaných dát, ktoré boli spracované zostavením grafov rastových kriviek. Grafy znázorňujú závislosť optickej denzity (OD_{850}) na čase (t). Postup metódy je zaznamenaný v kapitole 6.3.1. Na obrázkoch 3 – 11 sú zobrazené jednotlivé rastové krivky testovaných bakteriálnych izolátov. Analýze bolo podrobených celkovo 9 izolovaných vzoriek. 8 z nich pochádzalo z mäsových konzerv, a to *Bacillus amyloliquefaciens* E3, *Bacillus cereus* A1, *Bacillus pumilus* L3, *Bacillus siamensis* X1, *Cytobacillus horneckiae* B1, *Paenibacillus glucanolyticus* C5 a *Peribacillus simplex* E5; *Lysinibacillus fusiformis* N2 bol izolovaný z taveného syra.

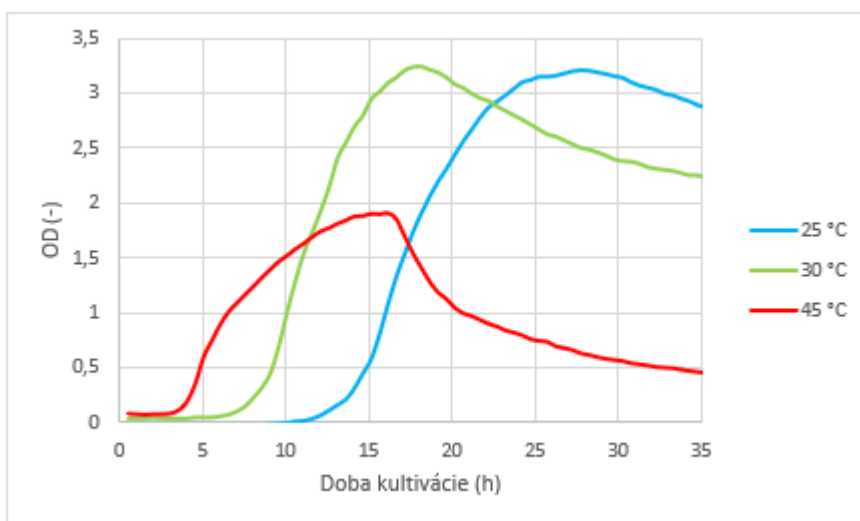


Obrázok 3 Rast *Bacillus amyloliquefaciens* E3 pri rôznych teplotách

Na obrázku 3 je možné vidieť rastovú krivku kmeňa *Bacillus amyloliquefaciens* E3 izolovaného z mäsovej konzervy. Z grafu je zrejmé, že so stúpajúcou teplotou kultivácie klesala doba lag fázy. Lag fáza pri teplote 25 °C trvala 12 hodín, pri 30 °C trvala 6,5 hodín a pri 45 °C trvala len 3,5 hodiny. Logaritmická fáza rastu pri teplote 25 °C trvala 8,5 hodín a optická denzita (OD) stúpla až na hodnotu 2,38. Pri teplote 30 °C bola exponenciálna fáza najdlhšia, trvala až 9,5 hodín a na jej konci dosiahla hodnota OD 2,5. Najkratšiu logaritmickú fázu bolo možné spozorovať pri teplote 45 °C, kedy jej dĺžka bola len 5,5 hodiny. Optická hustota dosiahnutá na konci log fázy bola 1,13.

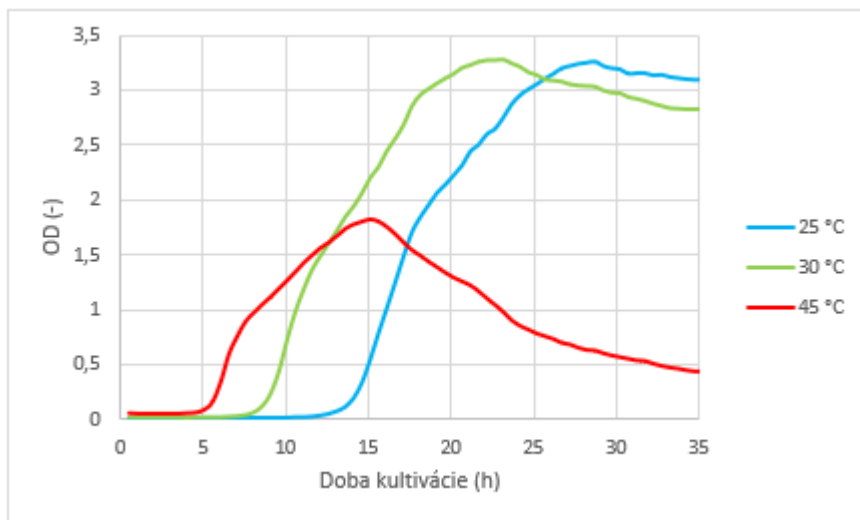
Obrázok 4 Rast *Bacillus cereus* A1 pri rôznych teplotách

Rastová krivka *Bacillus cereus* A1 je zaznamenaná na obrázku 4. Pri teplote 25 °C bola lag fáza *B. cereus* dlhá 8 hodín a exponenciálna fáza 8,8 hodín. Pri kultivačnej teplote 30 °C bola za 5 hodín dovŕšená lag fáza a potom za 7 hodín exponenciálna fáza. Najkratšia logaritmická fáza bola pri teplote 45 °C s trvaním len 3 hodín, pričom lag fáza prešla za 5,5 hodín. Najvyššia zaznamenaná hodnota optickej denzity bola 3,3 a to pri teplote 25 °C; maximálna OD pri teplote 30 °C bola len o málo nižšia – 3,2 – a pri 45 °C hodnota OD stúpala do maxima 1,755.

Obrázok 5 Rast *Bacillus pumilus* L3 pri rôznych teplotách

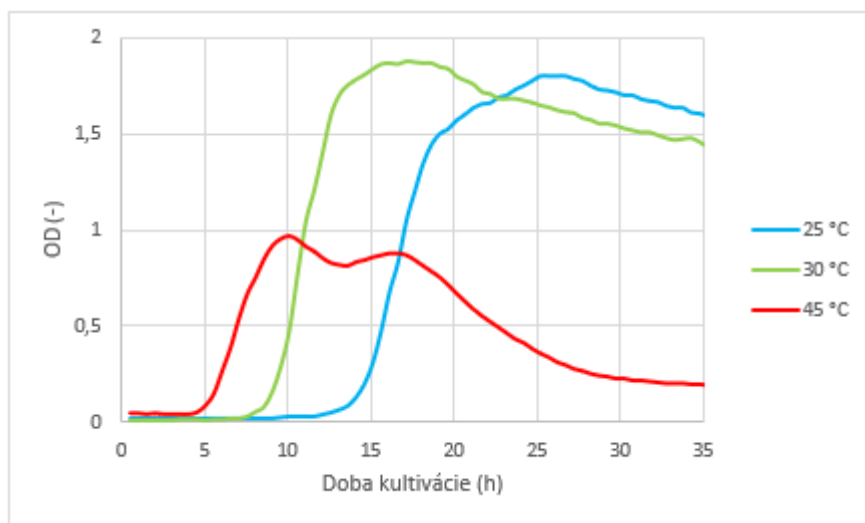
Obrázok 5 ukazuje rastovú krivku izolátu *Bacillus pumilus* L3. Z grafu je vidieť, že rastúcou teplotou kultivácie klesala dĺžka lag fázy, ktorá bola pri teplote 25 °C dlhá 11,5 hodín, pri 30 °C 5,5 hodín a pri 45 °C trvala len 3 hodiny. Taktiež so stúpajúcou teplotou klesala aj

dĺžka log fázy. Pri kultivačnej teplote 25 °C bol koniec exponenciálnej fázy po 12 hodinách, pri 30 °C po 9,5 hodinách a pri 45 °C po 8,5 hodinách od konca lag fázy. Maximálna OD bola 3,22 pri teplote 30 °C.



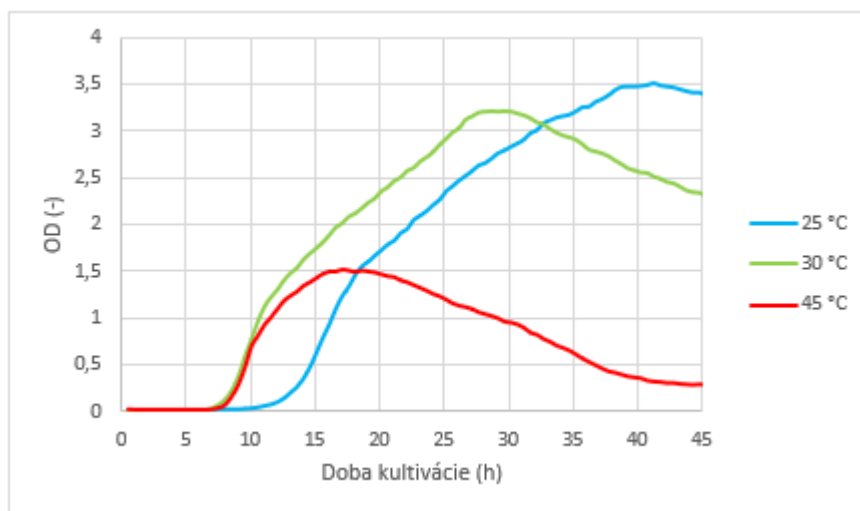
Obrázok 6 Rast *Bacillus siamensis* L4 pri rôznych teplotách

Na rastovej krivke *Bacillus siamensis* L4 (obrázok 6) je možné vidieť 12,5-hodinovú lag fázu pri teplote 25 °C a po nej 13,5-hodinovú exponenciálnu fázu s maximálnou hodnotou OD 3,255 a 8-hodinovú lag fázu a 10-hodinovú log fázu pri teplote 30 °C s najvyššou nameranou optickou denzitou 3,27. Vyššie teplotné podmienky kultivácie – 45 °C – vykazujú zníženie trvania lag fázy na 5 hodín a log fázy na 6,5 hodiny. Pri teplote 45 °C došlo k zaznamenaní hodnoty OD 1,8.



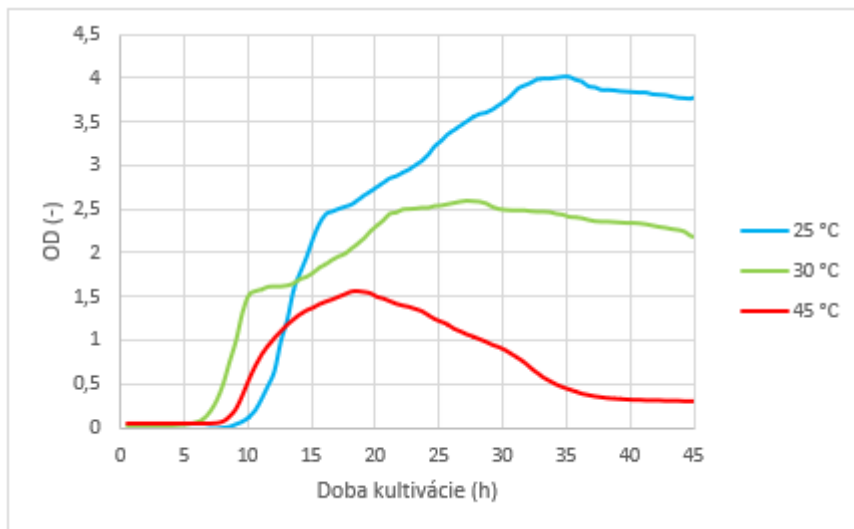
Obrázok 7 Rast *Bacillus velezensis* X1 pri rôznych teplotách

Z obrázku 7 je zřejmé, že pre *Bacillus velezensis* X1 je optimálna rastová teplota 30 °C, pretože po 8 hodinách lag fáze a 5 hodinách exponenciálnej fáze bola zaznamenaná najvyššia hodnota OD 1,88. Pri teplote nižšej – 25 °C – bola lag fáza predĺžená na 12,5 hodiny, pričom ku konci log fáze došlo po 19 hodinách od začiatku kultivácie. Teplota 45 °C vykazuje koniec lag fáze po 4,5 hodinách a po ďalších 10 hodinách aj fáze logaritmickéj.



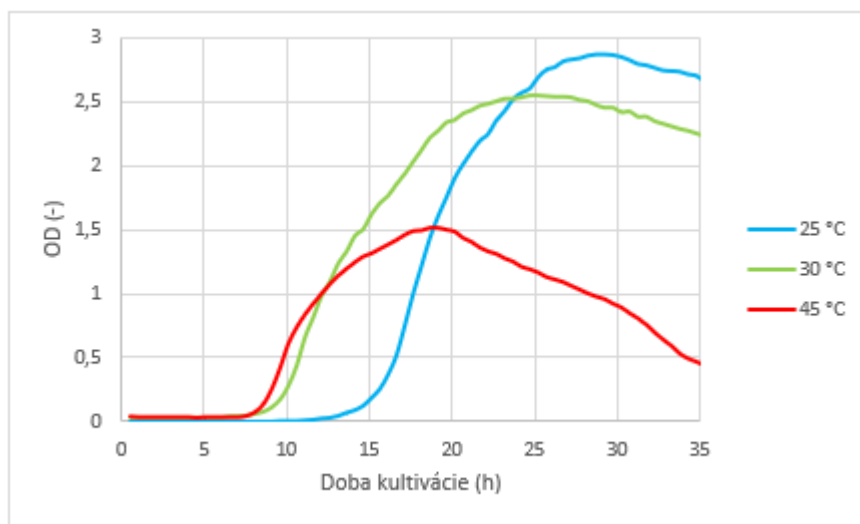
Obrázok 8 Rast *Cytobacillus horneckiae* B1 pri rôznych teplotách

Na obrázku 8 je možné pozorovať rastovú krivku *Cytobacillus horneckiae* B1. Vyplýva, že najdlhšia lag fáza bola pri teplote 25 °C s 11-hodinovým trvaním. Po 27,5 hodinách bol dosiahnutý koniec logaritmickéj fázy s najvyšším maximom OD 3,5. *C. horneckiae* pri teplotách 30 °C a 45 °C vykazoval rovnako dlhú lag fázu s trvaním 7,5 hodín, ale pri 30 °C bola exponenciálna fáza dlhá 18 hodín a pri teplote 45 °C len 5,5 hodín.



Obrázok 9 Rast *Lysinibacillus fusiformis* N2 pri rôznych teplotách

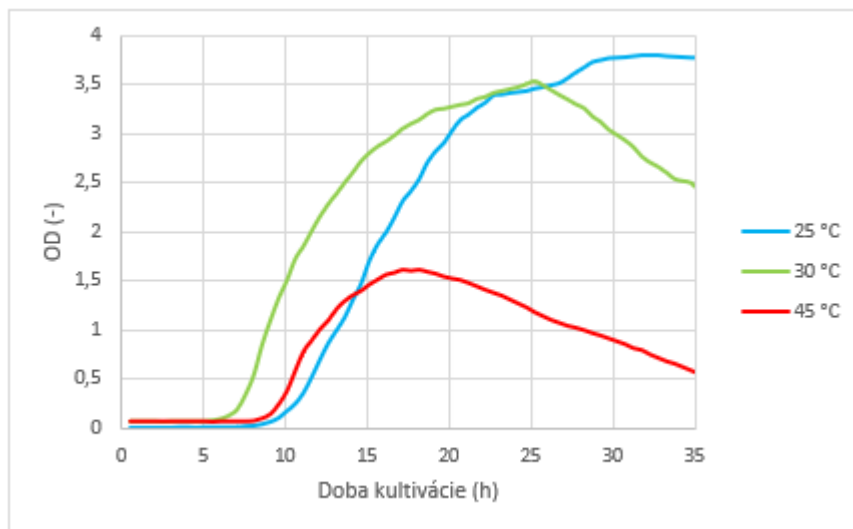
Rastová krivka *Lysinibacillus fusiformis* N2 je na obrázku 9. Najintenzívnejší rast je možné pozorovať pri teplote 25 °C, kedy lag fáza mala dĺžku 7,5 hodín a po jej skončení nasledovala logaritmická fáza s trvaním 8,5 hodín. Vo vrchole dosiahla optická denzita maximálnu hodnotu 4,01. Kultivačná teplota 30 °C zrýchlila lag fázu s trvaním 6 hodín, po ktorej nasledovala 4-hodinová exponenciálna fáza. Pri teplote 45 °C *L. fusiformis* vykazoval najdlhšiu lag fázu, ktorá trvala 8 hodín a po nej pokračovala exponenciálna fáza s dĺžkou 5 hodín.



Obrázok 10 Rast *Paenibacillus glucanolyticus* C5 pri rôznych teplotách

Obrázok 10 znázorňuje rastovú krivku kmeňa *Paenibacillus glucanolyticus* C5. Vyplýva, že s klesajúcou teplotou kultivácie sa predlžuje lag fáza, zatiaľ čo maximálna optická denzita počas logaritmickkej fázy rástla s klesajúcou teplotou. Najvyššia zaznamenaná hodnota OD

bola 2,87 pri teplote 25 °C, pričom lag fáza trvala až 12,5 hodín a log fáza 11,5 hodín. Pri teplote 30 °C bola dĺžka lag fázy 8 hodín a dĺžka log fázy 10,5 hodín. Taktiež aj pri teplote 45 °C lag fáza trvala 8 hodín, ale exponenciálna len 4,5 hodiny.



Obrázok 11 Rast *Peribacillus simplex* E5 pri rôznych teplotách

Na rastovej krivke kmeňa *Peribacillus simplex* E5 (obrázok 11) je možné pri teplote 25 °C pozorovať po 8,5-hodinovej lag fáze exponenciálnu fázu s trvaním 14,5 hodín. Pri tejto teplote bola nameraná najvyššia hodnota OD 3,9 a to v 33. hodine kultivácie. Pri teplote 30 °C bola lag fáza kratšia, s trvaním 6,5 hodín, a exponenciálna fáza trvala približne 17 hodín. Pri teplote 45 °C bola lag fáza podobne dlhá ako pri 25 °C, ale log fáza naopak trvala len 5,5 hodín.

7.2.1 Zhrnutie testovania rastu vybraných grampozitívnych baktérií

Pri kultivačnej teplote 45 °C boli zaznamenané najkratšie doby lag fáze, pričom úplne najkratšie trvala len 3 hodiny u *Bacillus pumilus* L3. U kmeňa *Bacillus amyloliquefaciens* E3 bola zistená dĺžka lag fáze 3,5 hodiny a u *Bacillus velezensis* X1 4,5 hodiny. Najdlhšou lag fázou bol charakteristický *Paenibacillus glucanolyticus* C5 s trvaním 13,5 hodín pri teplote 25 °C.

Najkratšia logaritmickej fáza bola zistená u *Bacillus cereus* A1 a trvaním len 3 hodiny pri teplote 45 °C. Naopak najdlhšia pozorovaná exponenciálna fáza bola pri 25 °C u *Cytobacillus horneckiae* B1, kedy dosiahla vrchol až po 38,5 hodine od začiatku kultivácie.

Najvyššia hodnota optickej denzity bola 4,01 a vykazoval ju kmeň *Lysinibacillus fusiformis* N2 pri kultivačnej teplote 25 °C a potom hodnota OD 3,9 u *Peribacillus simplex* E5, ktorú dosiahol pri teplote 25 °C v 33. hodine kultivácie. U rodu *Bacillus* to bola hodnota 3,3 u kmeňa *B. cereus* A1 pri 25 °C, 3,27 u *B. siamensis* L4 pri 30 °C a 3,22 u *B. pumilus* taktiež pri 30 °C.

7.3 Testovanie schopnosti tvorby biofilmu

Testovanie schopnosti tvorby biofilmu modifikovanou Christensenovou metódou v BHI bujóne je bližšie popísaná v kapitole 6.3.2. Hraničná hodnota CV rozdeľujúca biofilm-pozitivitu a biofilm-negativitu bola určená ako 0,3102. Na základe porovnania hodnoty CV s absorbanciou vzoriek (A_{595}) boli kmene rozdelené podľa schopnosti tvorby biofilmu do 3 kategórií, ktoré sú v tabuľke 5.

Tabuľka 5 Limitné hodnoty pre kategórie tvorby biofilmu testovaných izolátov

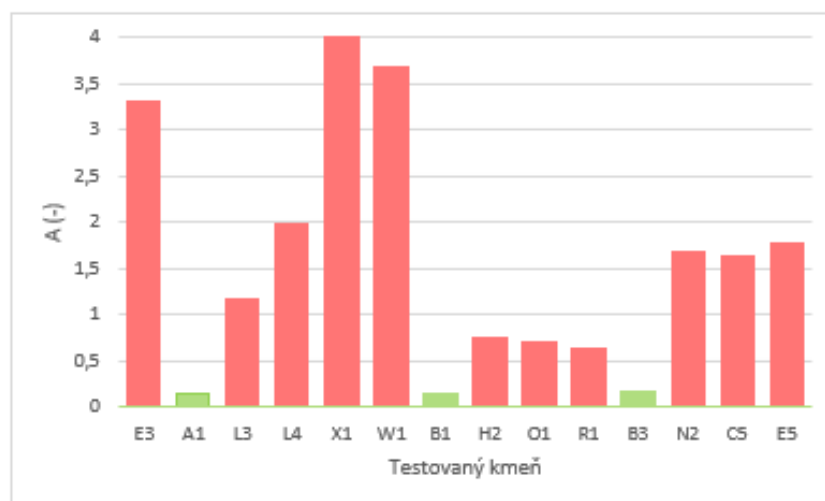
Kategória	A (-)
Biofilm netvoriace	0 – 0,310
Biofilm slabo tvoriace	0,310 – 0,621
Biofilm silno tvoriace	> 0,621

Zo 14 testovaných kmeňov, vyšlo 78,57 % ($n = 11$) biofilm-pozitívnych a ostatné ako biofilm-negatívne ($n = 3$). Silná tvorba biofilmu bola pozorovaná u všetkých biofilm tvoriacich kmeňov, konkrétne u *B. amyloliquefaciens* E3, *B. pumilus* L3, *B. siamensis* L4, *B. velezensis* X1 a W1, *C. horneckiae* H2, O1 a R1, *L. fusiformis* N2, *Paenibacillus glucanolyticus* C5 a *Peribacillus simplex* E5. K biofilm netvoriacim kmeňom boli zaradené *B. cereus* A1, *C. horneckiae* B1 a *L. fusiformis* B3. Odchýlky môžu byť spôsobené nedostatočným nanesením kultúry alebo z dôvodu prípadnej kontaminácie. V tabuľke 6 a na obrázku 12 je vyhodnotená schopnosť tvorby biofilmu jednotlivých bakteriálnych izolátov pre lepšiu predstavu.

Tabuľka 6 Vyhodnotenie schopnosti tvorby biofilmu u testovaných izolátov

Vzorka	Izolát	A (-)
E3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	3,304
A1	<i>Bacillus cereus</i>	0,134
L3	<i>Bacillus pumilus</i>	1,164
L4	<i>Bacillus siamensis</i>	1,989
X1	<i>Bacillus velezensis</i>	> 4*
W1	<i>Bacillus velezensis</i>	3,671
B1	<i>Cytobacillus horneckiae</i>	0,149
H2	<i>Cytobacillus horneckiae</i>	0,752
O1	<i>Cytobacillus horneckiae</i>	0,707
R1	<i>Cytobacillus horneckiae</i>	0,632
B3	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	0,173
N2	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	1,677
C5	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	1,638
E5	<i>Peribacillus simplex</i>	1,773

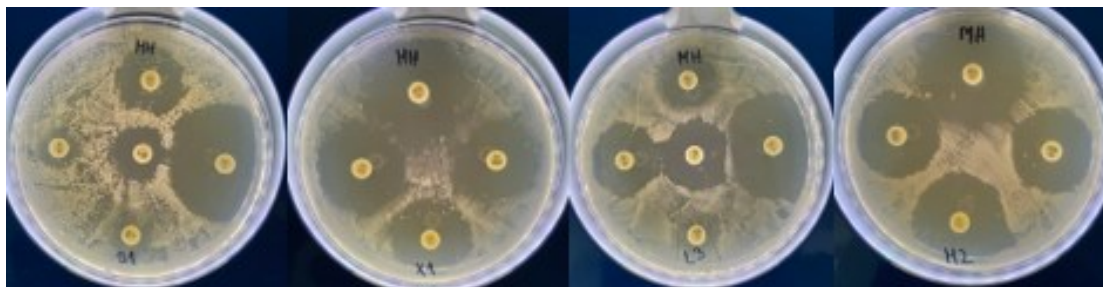
* spektrofotometer Tecan Infinite M200 PRO dokáže zmerať najvyššiu hodnotu OD 4, hodnota u *B. velezensis* X1 bola vyššia, takže ju prístroj nezaznamenal



Obrázok 12 Schopnosť tvorby biofilmu u testovaných kmeňov

7.4 Testovanie rezistencie na antibiotiká diskovo difúznou metódou

Citlivosť k 14 vybraným antimikróbnym látkam bola testovaná u bakteriálnych izolátov diskovo difúznou metódou podľa EUCAST (2024) u všetkých 14 vyšetrovaných kmeňov. Postup metódy testovania je v kapitole 6.3.3. Hodnotenie bolo na základe priemerov inhibičných zón, ktoré sú pre lepšiu predstavu na obrázku 3. Hodnoty boli porovnané s referenčnými limitmi stanovenými metodikou EUCAST (2024) pre *Bacillus* spp.. Pre zástupcov rodov *Cytobacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* a *Peribacillus* boli tiež použité referenčné limitné hodnoty pre *Bacillus* spp. z dôvodu fylogenetickej podobnosti. Zhrnutie je na obrázku 13, kedy u každého testovaného kmeňa je zobrazené množstvo antibiotík, ku ktorému je daný kmeň citlivý, intermediárny a rezistentný. Všetky testované kmene, antimikróbne látky a výsledky sú v tabuľke 7.



Obrázok 13 Testovanie antimikróbnej rezistencie diskovo difúznou metódou

7.4.1 Antibiotická rezistencia u *Bacillus* spp.

Testovanie antibiotickej rezistencie prebehlo celkovo u 6 zástupcov rodu *Bacillus* (tabuľka 5). Všetky testované kmene vykazovali vysokú rezistenciu voči antibiotiku penicilín.

Rezistencia voči skupine linkozamidov, konkrétne u clindamycínu, bola zistená u kmeňov *B. pumilus* a *B. siamensis*. *B. cereus* bol okrem spomínaného penicilínu rezistentný aj na ďalšie 3 antimikróbne látky a to na imipenem, ciprofloxacin a levofloxacin. Izoláty *B. velezensis* W1 a X1 sa líšili v citlivosti na skupinu makrolidov, konkrétne na erytromycín. *B. velezensis* W1 vyšiel ako rezistentný a izolát X1 ako citlivý.

7.4.2 Antibiotická rezistencia u *Cytobacillus horneckiae*

Na antibiotickú rezistenciu boli testované všetky izoláty *Cytobacillus horneckiae* – B1, H2, O1 a R1 – a výsledky boli rovnaké. Tieto izoláty vykazovali rezistenciu na penicilín, clindamycín a erytromycín. Výsledky sú v tabuľke 5.

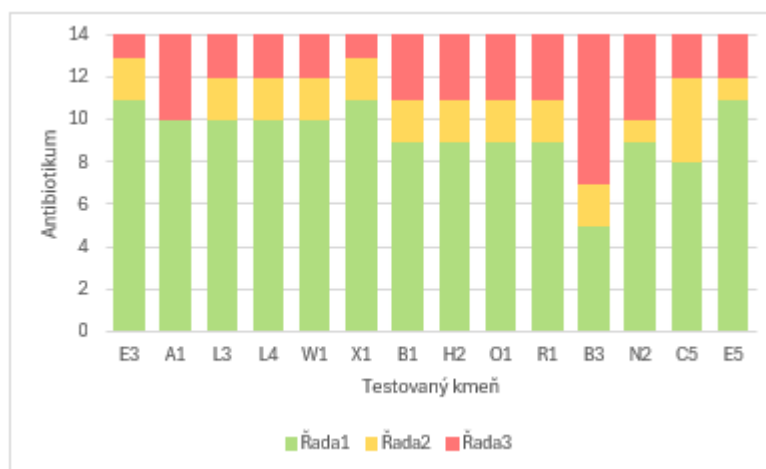
7.4.3 Antibiotická rezistencia u *Lysinibacillus fusiformis*

U *Lysinibacillus fusiformis* B3 a *L. fusiformis* N2 avšak vyšli niektoré výsledky rezistencie rozdielne, ale oba vykazovali rezistenciu voči penicilínu a erytromycinu (tabuľka 5). *L. fusiformis* B3, ktorý bol izolovaný z mäsovej konzervy vyšiel rezistentný na amikacín, imipenem, vancomycin, clindamycin a tetramycin. Na rozdiel od izolátu B3, *L. fusiformis* N2, izolovaný z taveného syra, vykazoval navyše rezistenciu na meropenem a ciprofloxacin.

7.4.4 Antibiotická rezistencia u *Paenibacillus glucanolyticus* a *Peribacillus simplex*

Kmeň identifikovaný ako *Paenibacillus glucanolyticus* C5 bola zistená rezistencia na penicilín a clindamycin. Na iné testované antimikróbne látky tento kmeň rezistenciu nevykazoval (tabuľka 5).

Peribacillus simplex E5, tak ako aj ostatné testované kmene, vykazoval rezistenciu na penicilín. Okrem toho rezistencia vyšla aj u levofloxacinu zo skupiny fluorochinilónov.



Obrázok 14 Vyhodnotenie pôsobenia antibiotík na testované kmene

Legenda: E3 – *Bacillus amyloliquefaciens*, A1 – *B. cereus*, L3 – *B. pumilus*, L4 – *B. siamensis*, W1 – *B. velezensis*, X1 – *B. velezensis*, B1 – *Cytobacillus horneckiae*, H2 – *C. horneckiae*, O1 – *C. horneckiae*, R1 – *C. horneckiae*, B3 – *Lysinibacillus fusiformis*, N2 – *L. fusiformis*, C5 – *Paenibacillus glucanolyticus*, E5 – *Peribacillus simplex*

Tabuľka 7 Antibiotická rezistencia u vybraných bakteriálnych kmeňov

Vzorka	Izolát	C	AK	HLG	TOB	IPM	MRP	P	CIP	LE	NX	VA	CD	E	TE
E3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	C	C	C	C	C	C	R	I	I	C	C	C	C	C
A1	<i>Bacillus cereus</i>	C	C	C	C	R	C	R	R	R	C	C	C	C	C
L3	<i>Bacillus pumilus</i>	C	C	C	C	C	C	R	I	I	C	C	R	C	C
L4	<i>Bacillus siamensis</i>	C	C	C	C	C	C	R	I	I	C	C	R	C	C
W1	<i>Bacillus velezensis</i>	C	C	C	C	C	C	R	I	I	C	C	C	R	C
X1	<i>Bacillus velezensis</i>	C	C	C	C	C	C	R	I	I	C	C	C	C	C
B1	<i>Cytobacillus horneckiae</i>	C	C	C	C	C	C	R	I	I	C	C	R	R	C
H2	<i>Cytobacillus horneckiae</i>	C	C	C	C	C	C	R	I	I	C	C	R	R	C
O1	<i>Cytobacillus horneckiae</i>	C	C	C	C	C	C	R	I	I	C	C	R	R	C
R1	<i>Cytobacillus horneckiae</i>	C	C	C	C	C	C	R	I	I	C	C	R	R	C
B3	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	C	R	C	C	R	C	R	I	I	C	R	R	R	R
N2	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	C	C	C	C	C	R	R	R	I	C	C	C	R	C
C5	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	I	C	C	C	C	C	R	I	I	C	C	R	C	I
E5	<i>Peribacillus simplex</i>	C	C	C	C	C	C	R	I	R	C	C	C	C	C

Legenda: C – citlivý, R – rezistentný, I – intermediárny (citlivý, zvýšená expozícia); C – chloramfenikol, AK – amikacín, HLG – gentamycín, TOB – tobramycín, IPM – imipenem, MRP – meropenem, P – penicilín, CIP – ciprofloxacín, LE – levofloxacín, NX – norfloxacín, VA – vankomycín, CD – clindamycín, E – erythromycín, TE – tetramycín

8 DISKUSIA

V rámci tejto bakalárskej práce boli charakterizované grampozitívne baktérie izolované z potravín, ktoré nepodporujú ich rast.

8.1 Izolácia a identifikácia kmeňov

Z mäsových konzerv a taveného syra boli v rámci experimentu izolované jednotlivé bakteriálne kmene rodov *Bacillus*, *Cytobacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* a *Peribacillus*. Vzhľadom na to, že väčšina z izolovaných kmeňov sú všadeprítomné, dokážeme predpokladať ich výskyt aj v potravinách.

Z oboch typov potravín boli izolované podmienene patogénne mikroorganizmy – *Bacillus cereus* z mäsovej konzervy a *Lysinibacillus fusiformis* z mäsovej konzervy a taveného syra. Vzhľadom na patogenitu *B. cereus* môže dochádzať k otravám jedlom, ktoré sa môžu prejaviť dvomi spôsobmi v závislosti od typu toxínu, ktorý daný kmeň produkuje (Jovanovic et al., 2021). Podľa štúdie Morioka et al. (2021) je možné predpokladať, že *L. fusiformis* spôsobuje tropické vredy.

Viacere kmene majú využitie v poľnohospodárstve a environmentálnej oblasti, ale treba s nimi zachádzať opatrne, lebo môžu spôsobovať horúčky alebo problémy s tráviacim traktom – bolesti brucha, hnačky. Medzi podmienene rizikové kmene patrí napr. *B. pumilus*, ktorý môže spôsobiť aj alergické reakcie (LYPHAR, 2024), *B. velezensis* (Zhong et al., 2024), *Paenibacillus glucanolyticus*, kedy bol zaznamenaný prípad infekcie (endokarditída) zo srdcového prístroja (Ferrand et al., 2013)

Medzi nerizikové kmene s využitím v poľnohospodárstve je možné zaradiť *B. siamensis*, *B. amyloliquefaciens* (Li et al., 2024) a *Peribacillus simplex* (Manetsberger et al., 2023). *Cytobacillus horneckiae* je baktéria izolovaná z čistých priestorov pre montáž kozmických lodí, ale jej účinky na ľudské zdravie nie sú známe (NTRS, 2010).

8.2 Rast kmeňov pri rôznych teplotách

Pri testovaní vplyvu 3 rôznych teplôt na vybraných zástupcov rodov *Bacillus*, *Cytobacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* a *Peribacillus* bolo zistené, že všetky testované kmene rástli dobre v teplotnom rozmedzí 25 – 45 °C.

Štúdie Logan a De Vos (2015) sa zaoberal rodom *Bacillus* a od neho odvodených rodov a do ich štúdie zahrnuli aj teplotné podmienky rastu týchto mikroorganizmov. *B. amyloliquefaciens* najlepšie rastie pri teplotách 17 – 35 °C, ale nie pri 5 °C ani 50 °C. Z obrázku 3 je možné vidieť, že rastie aj pri teplote vyššej (45 °C) ako uvádza Logan a De Vos (2015). U *B. cereus* bola pozorovaná veľmi dobrá schopnosť rastu pri všetkých 3 testovaných teplotách. Je charakteristický rastom pri minimálne 10 – 20 °C a maximálne pri 40 – 45 °C, ale jeho optimum rastu je pri teplote 37 °C (Logan a De Vos, 2015). Rast *B. pumilus* bol taktiež veľmi dobrý pri všetkých testovaných teplotách a štúdie Logan a De Vos (2015) uvádzajú, že rastie minimálne pri teplote > 5 – 15 °C a maximálne pri 40 – 50 °C. *Lysinibacillus fusiformis* má optimálne rozmedzie teplôt na rast 17 – 35 °C a nerastie pri 5 °C ani pri 50 °C (Logan a De Vos, 2015), ale slušne rástol aj pri teplote 45 °C. Štúdie Logan a De Vos (2015) popisali rast aj *Paenibacillus glucanolyticus* s optimom rastu v rozmedzí 30 – 37 °C a dokáže rásť do teploty približne 50 – 55 °C, ale aj pri teplote 25 °C (obrázok 10); *Peribacillus simplex*, a to pri teplotách 20 °C a 30 °C, ale nie pri teplote 45 °C, ale jeho rast bol dobrý aj pri tejto teplote. Podľa štúdie Vaishampayan et al. (2010) je pre *Cytobacillus horneckiae* optimálna rastová teplota 30 °C a nevykazuje rast pri teplote 4 °C ani pri 50 °C. Testovanie rastu *B. siamensis* vykazovalo veľmi dobré výsledky pri kultivačných teplotách 25 – 45 °C a podľa Dunlap (2015) dokáže rásť v rozmedzí teplôt 4 – 60 °C. Optimálny rast pre *B. velezensis* je 30 – 35 °C (Zhong et al., 2024), podľa Su et al. (2024) dokáže rásť aj pri teplote 10 °C, ale vykazoval rast aj pri teplote 45 °C.

8.3 Schopnosť tvorby biofilmu

V rámci praktickej časti bola testovaná schopnosť tvorby biofilmu vybraných grampozitívnych izolátov. Rod *Bacillus* vykazoval u 83,8 % ($n = 5/6$) testovaných kmeňov biofilm-pozitivitu. Jediný testovaný zástupca z rodu *Bacillus* nevykazujúci schopnosť tvorby biofilmu bol *Bacillus cereus*, ale je dokázané, že aj *B. cereus* je schopný tvorby biofilmu pričom môže byť pokladaný za zdroj kontaminácie na rôznych povrchoch, ako sú skladovacie nádoby, dopravné pásy a rúry z nekorodujúcej ocele (Lin et al., 2022).

Z výsledkov je možné vidieť, že *B. amyloliquefaciens* je veľmi silno biofilm-pozitívny. Podľa štúdie Zalila-Kolsi et al. (2023) je *B. amyloliquefaciens* schopný vytvárať komplexné biofilmy, ktoré predstavujú živé biologické platformy využiteľné na produkciu rôznych funkčných biomateriálov. Medzi tieto produkty patria napr. povrchové rastové faktory, antibiotiká, lyzozým a antimikrobiálne peptidy, ktoré významný potenciál v medicíne.

B. pumilus podľa Kilic a Coleri Cihan (2020) tvorí silný biofilm na 96-jamkovej polystyrénovej mikrotitračnej doštičke a na povrchoch z nekorodujúcej ocele. Z výsledkov je zrejmé, že tento kmeň naozaj biofilm silno tvorí.

Najvyšších hodnôt pri testovaní tvorby biofilmu dosiahli dva izoláty *B. velezensis*. Tento mikroorganizmus podľa Zhihui et al. (2019) dokáže vďaka tvorbe biofilmu pozitívne ovplyvňovať rast a zdravie rastlín.

Podľa NTRS (2011), ktorým sa ako prvým podarilo izolovať *Cytobacillus horneckiae*, z čistých priestorov pre montáž vesmírnej lode, je *C. horneckiae* producentom tzv. vonkajšej vrstvy, ktorá dokáže viazať jeho spóry do veľkých agregátov alebo biofilmov, čo môže poskytovať spóram odolnosť voči UV žiareniu.

Lysinibacillus fusiformis je schopný tvoriť biofilm, považuje sa za slabo biofilm-pozitívny a podľa štúdie Taieb et al. (2021) dokáže dokonca lepšie adherovať na povrchy v prítomnosti kovového stresu ako bez.

Celandroni et al. (2016) hovorí o tom, že *Paenibacillus glucanolyticus* a *Peribacillus simplex* sú schopné tvorby biofilmu. V tejto štúdii bolo dokázané, že tvorba biofilmu *P. glucanolyticus* je rozšíreným prejavom jeho virulencie, kedy dochádza k hlbokým infekciám spôsobenými týmto rodom.

8.4 Antibiotická rezistencia

Veľkú väčšinu kmeňov rodu *Bacillus* spp. je možné považovať za multirezistentné. *B. cereus* môže vykazovať rezistenciu na cefotaxamín, ampicilín, rifampicín, norfloxacin, chloramfenikol, clindamycín, vankomycín (Adamski et al., 2023), tetramycín, erythromycín a gentamycín (Lin et al., 2020). V experimentálnej časti sa podarilo dokázať rezistenciu *B. cereus* len na imipenem, penicilín, ciprofloxacín a levofloxacín. Podľa Adamski et al. (2023) štúdie je tento bakteriálny kmeň citlivý na chloramfenikol, amikacín (97,14 %) a meropenem, čo súhlasí s výsledkami našej štúdie.

Pedretti et al. (2024) testovali účinky gentamycínu, clindamycínu, erythromycínu, kanamycínu, tetracyklínu, streptomycínu a vankomycínu na *B. siamensis* a dokázali, že je citlivý na všetky testované antimikrobiálne látky. S výsledkami experimentálnej časti to zväčša súhlasí, ale *B. siamensis* vykazoval rezistenciu na clindamycín.

B. pumilus vykazuje rezistenciu voči aminopenicilínu, clindamycínu a vankomycínu (Adamski et al., 2023), čo nie úplne súhlasí s testovaním rezistencie na antibiotikách, keby výsledkom bola rezistencia na clindamycín, ale nie na vankomycín.

Štúdia Heo et al. (2022) vyvrátila časť štúdie Agersø et al. (2018), ktorá hovorila o navrhnutých hodnotách *B. velezensis* voči chloramfenikolu, clindamycínu, erytromycínu, gentamycínu, kanamycínu, streptomycínu, tetracyklínu a vankomycínu. Podľa Heo et al. (2022) neboli v súlade s fenotypovým profilom získanej rezistencie na antibiotiká, a že nie všetky kmene obsahovali potenciálne gény rezistencie na antibiotiká, takže sa z tohto pohľadu *B. velezensis* nepredstavuje také riziko antibiotickej rezistencie napr. pri fermentácii potravín alebo pri medicínskych účeloch. Tento bakteriálny kmeň vykazoval rezistenciu na penicilín a erythromycín.

Lysinibacillus fusiformis je známy tým, že si dokáže vytvárať rezistenciu na antibiotiká produkciou enzýmov, ktoré ich inaktivujú a modifikujú ich cieľové miesto (Taieb et al., 2021). Táto štúdia sa zaoberala testovaním antibiotickej rezistencie *L. fusiformis* voči penicilínu, kanamycínu, neomycínu, netilimicínu, tetracyklínu, tobramycínu a cefotaxínu. U všetkých, okrem penicilínu, kde bol intermediárny, vykazoval citlivosť. Tieto antibiotiká, s výnimkou penicilínu, tetracyklínu a tobramycínu, neboli použité pri praktickej časti. Na tetracyklín *L. fusiformis* rezistenciu vykazoval, taktiež aj na amikacín, imipenem, vankomycín, clindamycín, meropenem, ciprofloxacin a erythromycín.

Sáez-Nieto et al. (2017) testovali antibiotickú rezistenciu u rodu *Paenibacillus* a zistili, že 95,6 % izolátov vykazovalo rezistenciu na ampicilín, 44 % na kotrimoxazol, 20 až 30 % bolo rezistentných na cefotaxím a vankomycín a 13 % na rifampicín a erythromycín. V experimentálnej časti bola zistená rezistencia na penicilín a clindamycín.

Antibiotická rezistencia sa môže v závislosti od štúdie veľmi líšiť. Takisto aj rezistencia na antibiotikách u skupiny jedného kmeňa nemusí vykazovať vždy rovnaké výsledky.

ZÁVER

Cieľom bakalárskej práce bolo charakterizovať grampozitívne baktérie, ktoré boli izolované z potravín nepriaznivých pre ich rast – tavené syry a mäsové konzervy vyrobené na Ústave technológií potravín v Zlíne, Univerzite obrany v Brne alebo pochádzajú z obchodných reťazcov. V rámci experimentálnej časti bola prevedená identifikácia izolovaných kmeňov, sledovanie vplyvu 3 rôznych teplôt na ich rast, schopnosť tvorby biofilmu a citlivosť na antibiotiká.

Sekvenciou časti génu 16S rRNA bolo na úrovni druhov identifikovaných 14 bakteriálnych izolátov, z ktorých bolo 9 rôznych druhov. Identifikované kmene boli zástupcovia rodov *Bacillus*, *Cytobacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* a *Peribacillus*. Najvyššie zastúpenie mal *Cytobacillus horneckiae* (n = 4).

U 9 rôznych bakteriálnych kmeňov bol testovaný vplyv rozdielnych teplotných podmienok. Ukázalo sa, že všetky izoláty vykazovali veľmi dobrý rast pri testovaných kultivačných teplotách 25 °C, 30 °C a 45 °C.

Sledovaním schopnosti tvorby biofilmu modifikovanou Christensenovou metódou na mikrotitračnej doštičke bolo zistené, že všetky testované kmene okrem *Bacillus cereus* sú schopné biofilm tvoriť. Zo 14 testovaných mikroorganizmov bola tvorba biofilmu dokázaná u 11 mikroorganizmov.

Testovaním citlivosti na 14 vybraných antimikrobiálnych látok bolo zistené, že všetky kmene boli rezistentné voči penicilínu. Ďalej väčšia miera rezistencie bola u clindamycínu a erythrocínu. Naopak všetky testované kmene boli citlivé na gentamycín, tobramycín a norfloxacin.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

ABADOUCH, Lahsen, 2014. *HEAT TREATMENT OF FOODS - Spoilage Problems Associated with Canning*. Online. Spoilage Problems Associated with Canning - ScienceDirect. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123847300001579>. [cit. 2025-04-17].

ABOU EL-NOUR, Atef a GOUDA, A.. 2003. *CHEESES - Processed Cheese*. Online. Processed Cheese - ScienceDirect. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B012227055X002042>. [cit. 2025-04-02].

ADAMSKI, Patryk; BYCZKOWSKA-ROSTKOWSKA, Zuzanna; GAJEWSKA, Joanna; ZAKRZEWSKI, Arkadiusz Józef a KŁĘBUKOWSKA, Lucyna, 2023. *Prevalence and Antibiotic Resistance of Bacillus sp. Isolated from Raw Milk*. Online. MDPI. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/4/1065>. [cit. 2025-05-08].

AIYEGORO, Olayinka A., 2014. *MICROBIAL CONTAMINATION - Microbial Contamination of Processed Meat*. Online. Microbial Contamination of Processed Meat - ScienceDirect. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978012384731700249X>. [cit. 2025-04-17].

AUSTIN, John W.; HARRIS, Richard a OUDIT, Denise, 2024. *Encyclopedia of Meat Sciences*. Online. ScienceDirect. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com:5070/referencework/9780323851985/encyclopedia-of-meat-sciences>. [cit. 2025-04-14].

BIOLOGYINSIGHTS TEAM, 2024. *Genomic and Enzymatic Profile of Paenibacillus Glucanolyticus*. Online. BiologyInsights. Dostupné z: <https://biologyinsights.com/genomic-and-enzymatic-profile-of-paenibacillus-glucanolyticus/>. [cit. 2025-04-19].

BIOLOGYINSIGHTS TEAM, 2024. *Lysinibacillus fusiformis: Traits, Adaptations, and Industrial Uses*. Online. BiologyInsights. Dostupné z: <https://biologyinsights.com/lysinibacillus-fusiformis-traits-adaptations-and-industrial-uses/>. [cit. 2025-04-19].

BITTING, Avrill Wayne; ECKLUND, Oscar F.; FEATHERSTONE, Sam; GOLDBLITH, Samuel Abraham et al., 2015. *Introduction*. Online. ScienceDirect. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857096777020016>. [cit. 2025-04-14].

BNO, Team, 2021. *Bacillus cereus – Habitat, Morphology, Pathogenicity, Virulence Factors*. Online. Biologynotesonline.com. Dostupné z: <https://biologynotesonline.com/bacillus-cereus-habitat-morphology-pathogenicity-virulence-factors/>. [cit. 2025-04-18].

BUŇKOVÁ, Leona a BUŇKA, František, 2017. *Microflora of processed cheese and the factors affecting it*. Online. Taylor. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2015.1060939>. [cit. 2025-04-17].

BUŇKOVÁ, Leona; BUŇKA, František a DOLEŽÁLKOVÁ, Iva, 2010. *Mikrobiologie tavených sýrů*. Online. Mlékařské listy – Zpravodaj, s. 32-37. Dostupné z: <https://publikace.k.utb.cz/handle/10563/1001108>. [cit. 2025-03-28].

BOBKO, Marek; HAŠČÍK, Peter a KROČKO, Miroslav, 2018. *Technológia spracovania mäsa II*. Online. SPU. Dostupné z: <http://ves.uniag.sk/files/pdf/8bzqtwjslxml03tswp8786g75j1nik.pdf>. [cit. 2025-04-13].

CELANDRONI, Francesco; SALVETTI, Sara; AISSATOU GUEYE, Sokhna; LUPETTI, Antonella; SENESI, Sonia et al., 2016. *Identification and Pathogenic Potential of Clinical Bacillus and Paenibacillus Isolates*. Online. PLOS One. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0152831>. [cit. 2025-05-08].

DHUMAL, Gaurav; CHAUDHARI, Khushal a MOHAN, Mahalaxmi, 2021. *Bacillus amyloliquefaciens: A Review*. Online. ResearchGate. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/358633541_Bacillus_amyloliquefaciens_A_Review. [cit. 2025-04-18].

DNeasy Blood and Tissue Kits for DNA Isolation, 2024. Online. QIAGEN. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit>. [cit. 2025-04-30].

DUNLAP, Christopher A., 2015. *Phylogenomic analysis shows that 'Bacillus vanillea' is a later heterotypic synonym of Bacillus siamensis*. Online. PubMed. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26296875/>. [cit. 2025-04-19].

EL-BAKRY, Mamdouh a MEHTA, Bhavbhuti M., 2022. *Processed Cheese Science and Technology: Ingredients, Manufacture, Functionality, Quality, and Regulations*. Online. EBSCO. Dostupné z: https://research.ebsco.com/c/ubdjpj/ebook-viewer/pdf/pqs33y2t5n/page/pp_429?location=https%25253A%25252F%25252Fresearch.ebsco.com%25252F%25252Fubdjpj%25252Fsearch%25252Fdetails%25252Fpqs33y2t5n%25253Fdb%25253Dnlebk. [cit. 2025-04-01].

EPRALIMA, 2014. *Mikroorganizmy a potraviny*. Online. Vydavateľ nenájdený. Dostupné z: https://www.epralima.com/infoodquality/Documentos_eslovaco_SK/Manuais/3Mikroorganizmy_a_potraviny.pdf. [cit. 2025-04-17].

EYO, Ifiok, 2024. *Is Food Safe to Eat Out of Swollen or Bloated Packaging*. Online. Food Blog - Your No 1 Food Blog. Dostupné z: <https://foodblog.agricfood.com/is-food-safe-to-eat-out-of-swollen-or-bloated-packaging/>. [cit. 2025-04-20].

FERRAND, Janina; HADOU, Tahar; SELTON-SUTY, Christine; GOEHRINGER, François; SADOUL, Nicolas et al., 2013. *Cardiac Device-Related Endocarditis Caused by Paenibacillus glucanolyticus*. Online. Journal of Clinical Microbiology. Dostupné z: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.00864-13>. [cit. 2025-05-07].

FSIS - USDA, Food Safety and Inspection Service, 2021. *Virtual Thermal Processing - Student Handouts*. Online. FSIS.USDA.gov. Dostupné z: https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-03/VTP_Student_Handouts.pdf. [cit. 2025-04-13].

GREEN, John; JOHNSTON, Ralph W.; KRUMM, Goerge W.; LATTUADA, Charles P. a EYE, James G., 1998. *Examination of heat processed, hermetically sealed (canned) meat and poultry products*. Online. FSIS.USDA.gov. Dostupné z: https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-03/Mlgchp10.pdf. [cit. 2025-04-13].

GROMAN, Reid P., 2009. *Chapter 108 - Gram-Positive Infections*. Online. ScienceDirect. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9781416025917101080>. [cit. 2025-04-20].

GUERRERO-LEGARRETA, Isabel, 2014. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Online. ScienceDirect. Dostupné

z: <http://www.sciencedirect.com:5070/referencework/9780123847331/encyclopedia-of-food-microbiology>. [cit. 2025-04-14].

HARDIN, Margaret D. 2014. *MICROBIAL CONTAMINATION | Decontamination of Processed Meat*. Online. ScienceDirect. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123847317002464>. [cit. 2025-04-17].

HEO, Ganghun; KONG, Haram; KIM, Namwon; LEE, Sugyeong; SUL, Sooyoung et al., 2022. *Antibiotic susceptibility of Bacillus velezensis*. Online. OUP Academic. Dostupné z: <https://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnac017>. [cit. 2025-05-08].

JOVANOVIC, Jelena; MADDER, Annemieke; RAJKOVIC, Andreja a ORNELIS, Vincent F. M., 2021. *Bacillus cereus food intoxication and toxicoinfection*. Online. ISSN 1541-4337. Dostupné z: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/1541-4337.12785>. [cit. 2025-05-07].

KARKI, Gaurab, 2020. *Microbial spoilage of meat and methods of preservation*. Online. Online Biology Notes. Dostupné z: <https://www.onlinebiologynotes.com/microbial-spoilage-of-meat-and-methods-of-preservation/>. [cit. 2025-04-17].

KILIC, Tugba a COLERI CIHAN, Azru, 2020. *Biofilm Formation of the Facultative Thermophile Bacillus pumilus D194A and Affects of Sanitation Agents on Its Biofilms*. Online. SpringerLink. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1134/S0026261720010087>. [cit. 2025-05-08].

KUMAR, Prince, 2024. *Microbiology of Canned Foods: Ensuring Safety and Quality*. Online. Agriculture Institute. Dostupné z: <https://agriculture.institute/food-microbiology-fv/microbiology-canned-foods-safety-quality/>. [cit. 2025-04-17].

LAZÁRKOVÁ, Zuzana; BUŇKA, František; BUŇKOVÁ, Leona; HOLÁŇ, Felix; KRÁČMAR, Stanislav a HRABĚ, Jan, 2011. *The Effect Of Different Heat Sterilization Regimes On The Quality Of Canned Processed Cheese*. Online. Wiley Online Library. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4530.2009.00376.x>. [cit. 2025-04-03].

LI, Shijie; CHEN, Pinpin; LI, Qiuyuan; WANG, Xu; PENG, Jintao et al., 2024. *Bacillus amyloliquefaciens* TL promotes gut health of broilers by the contribution of bacterial extracellular polysaccharides through its anti-inflammatory potential. Online. Frontiers. Dostupné

z: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1455996/full>. [cit. 2025-05-07].

LIN, Long-Zhen; ZHENG, Qian-Wang; WEI, Tao; ZHANG, Zi-Qian; ZHAO, Chao-Fan et al., 2020. *Isolation and Characterization of Fengycins Produced by Bacillus amyloliquefaciens JFL21 and Its Broad-Spectrum Antimicrobial Potential Against Multidrug-Resistant Foodborne Pathogens*. Online. Frontiers. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.579621/full>. [cit. 2025-05-08].

LIN, Yicen; BRIANDET, Romain a KOVÁCS, Ákos T., 2022. *Bacillus cereus sensu lato biofilm formation and its ecological importance*. Online. ScienceDirect. Dostupné z: [Bacillus cereus sensu lato biofilm formation and its ecological importance - ScienceDirect](#). [cit. 2025-05-08]

LOGAN, Niall A. a DE VOS, Paul, 2015. *Bacillus*. Online. eISBN 9781118960608, s. 1 - 163. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/9781118960608.gbm00530>. [cit. 2025-05-07].

LUO, Lin; ZHAO, Chunzhang; WANG, Entao; RAZA, Ali a YIN, Chunying, 2022. *Bacillus Amyloliquefaciens*. Online. ScienceDirect Topics. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/bacillus-amyloliquefaciens>. [cit. 2025-04-18].

LYPHAR, 2024. *Effectiveness, side effects, and special precautions of Bacillus Pumilus*. Online. Lyphar Biotech Co., Ltd. Dostupné z: <https://www.biolyphar.com/effectiveness-side-effects-and-special-precautions-of-bacillus-pumilus/>. [cit. 2025-05-07].

MAGAR, Sanjogta Thapa, 2025. *Microbial Spoilage of Canned Foods: Causes*. Online. Microbe Notes. Dostupné z: <https://microbenotes.com/spoilage-canned-foods-preserved/>. [cit. 2025-04-17].

MANETSBERGER, Julia; CABALLERO GÓMEZ, Natacha; SORIA-RODRÍGUEZ, Carlos; BENOMAR, Nabil a ABRIOUEL, Hikmate, 2023. *Simply Versatile: The Use of*

Peribacillus simplex in Sustainable Agriculture. Online. PMC. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10608964/>. [cit. 2025-04-19].

MATHEWS, Stephanie L.; PAWLAK, Joel J. a GRUNDEN; Amy M., 2014. *Isolation of Paenibacillus glucanolyticus from pulp mill sources with potential to deconstruct pulping waste*. Online. ScienceDirect. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852414006336>. [cit. 2025-04-19].

MCDOWELL, Rachel H.; SANDS, Evan M. a FRIEDMAN, Harvey, 2023. *Bookshelf*. Online. NCBI Bookshelf. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459121/>. [cit. 2025-04-18].

MORIOKA, Hiroshi; OKA, Keisuke; YAMADA, Yosuke; NAKANE, Yoshimasa; KOMIYA, Hitoshi; MURASE, Chiaki; IGUCHI, Mitsutaka a YAGI, Tetsuya, 2021. *Lysinibacillus fusiformis bacteremia: Case report and literature review*. Online. ScienceDirect. Dostupné z: [Lysinibacillus fusiformis bacteremia: Case report and literature review - ScienceDirect](#). [cit. 2025-04-19]

MURAS, Andrea; ROMERO, Manuel; MAYER, Celia a OTERO, Ana, 2021. *Biotechnological applications of Bacillus licheniformis*. Online. PubMed. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33593221/>. [cit. 2025-04-19].

NTRS, 2011. *Assessment of Resistance of Bacillus Horneckiae Endospores to UV Radiation and Function of Their Extraneous Layer in Resistance*. Online. NASA Technical Reports Server (NTRS). Dostupné z: <https://ntrs.nasa.gov/citations/20130001788>. [cit. 2025-04-19].

PAULSEN, Peter a SMULDERS, Frans J. M., 2023. *Modeling in meat science: Microbiology*. Online. ScienceDirect. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323851251001782>. [cit. 2025-04-17].

PEDRETTI, Natalia; ISEPPI, Ramona; CONDÒ, Carla; SPAGGIARI, Luca; MESSI, Patrizia et al., 2024. *Cell-Free Supernatant from a Strain of Bacillus siamensis Isolated from the Skin Showed a Broad Spectrum of Antimicrobial Activity*. Online. MDPI. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2076-2607/12/4/718>. [cit. 2025-05-08].

PLEVA, Pavel; BARTOŠOVÁ, Lucie; MÁČALOVÁ, Daniela; ZÁLEŠÁKOVÁ, Ludmila; SEDLAŘÍKOVÁ, Jana et al., 2021. *Biofilm Formation Reduction by Eugenol and Thymol*

on Biodegradable Food Packaging Material. Online. MDPI. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/1/2>. [cit. 2025-05-01].

RABBEE, Muhammad Fazle; ALI, Md Sarafat; CHOI, Jinhee; HWANG, Buyng Su; JEONG, Sang Chul et al., 2019. *Bacillus velezensis: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes*. Online. PMC. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6470737/>. [cit. 2025-04-19].

ROGERS, Kara, 2025. *Gram-positive bacterium*. Online. Encyclopedia Britannica. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/Gram-positive-bacterium>. [cit. 2025-04-20].

SÁEZ-NIETO, Juan A.; MEDINA-PASCUAL, Maria J; CARRASCO, Gustavo; GARRIDO, Nicolás; FERNANDEZ-TORRES, Miguel A et al., 2017. *Paenibacillus spp. isolated from human and environmental samples in Spain: detection of 11 new species*. Online. ScienceDirect. Dostupné z: [Paenibacillus spp. isolated from human and environmental samples in Spain: detection of 11 new species - ScienceDirect](#). [cit. 2025-05-08].

SHLEEVA, Margarita O.; KONDRATIEVA, Daria A. a KAPRELYANTS, Arseny S., 2023. *Bacillus licheniformis: A Producer of Antimicrobial Substances, including Antimycobacterials, Which Are Feasible for Medical Applications*. Online. PMC. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10383908/>. [cit. 2025-04-19].

SONG, Bo; ZHU, Panpan; YUMENG, Zhang; NING, Ju; SI, Xin; PANG, Xiaoyang; LV, Jiaping a ZHANG, Shuwen, 2013. *Preparation and quality assessment of processed cream cheese by high hydrostatic pressure combined thermal processing and spore-induced germination*. Online. ScienceDirect. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877422003739>. [cit. 2025-04-02].

SU, Ting; SHEN, Biao; HU, Xingjuan; TENG, Yue; WENG, Peifang et al., 2024. *Research advance of Bacillus velezensis: bioinformatics, characteristics, and applications*. Online. SciOpen. Dostupné z: <https://www.sciopen.com/article/10.26599/FSHW.2022.9250148>. [cit. 2025-04-19].

SUMPAVAPOL, Punnanee; TONGYONK, Linna; TANASUPAWAT, Somboon; CHOKESAJJAWATEE, Nipa; LUXANANIL, Plearnpis VISESSANGUAN, Wonnop, 2010. *Bacillus siamensis sp. nov., isolated from salted crab (poo-khem) in Thailand*. Online. Microbiologyresearch.org. Dostupné z:

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.018879-0>. [cit. 2025-04-19].

ŠVPS, 2023. *Bacillus cereus v potravinách*. Online. Štátna veterinárna a potravinová správa. Dostupné z: <https://svps.sk/potraviny/pridavne-latky-mikrobiaalna-a-chemicka-kontaminacia/bacillus-cereus-v-potravinach/>. [cit. 2025-04-18].

TAIEB, Ines; BEN YOUNES, Sonia; MESSAI, Boutheina; MNIF, Sami; MZOUGH, Ridha et al., 2021. *Isolation, Characterization and Identification of a New Lysinibacillus fusiformis Strain ZC from Metlaoui Phosphate Laundries Wastewater: Bio-Treatment Assays*. Online. MDPI. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2071-1050/13/18/10072>. [cit. 2025-05-08].

VAISHAMPAYAN, Parag; PROBST, Alexander; KRISHNAMURTHI, Srinivasan; GHOSH, Sudeshna; OSMAN, Shariff et al., 2010. *Bacillus horneckiae sp. nov. isolated from a spacecraft assembly clean room*. Online. Microbiologyresearch.org. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/60/5/1031.pdf?expires=1745060836&id=id&accname=guest&checksum=35DF141DB539EC45DF37BDFFA401A23C>. [cit. 2025-04-19].

XU, Zhihui; ZHANG, Huihui; SUN, Xinli; LIU, Yan; YAN, Wuxia et al., 2019. *Bacillus velezensis Wall Teichoic Acids Are Required for Biofilm Formation and Root Colonization*. Online. PubMed. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30552189/>. [cit. 2025-05-08].

ZALILA-KOLSI, Imen; BEN-MAHMOUD, Afif a AL-BARAZIE, Ray, 2023. *Bacillus amyloliquefaciens: Harnessing Its Potential for Industrial, Medical, and Agricultural Applications—A Comprehensive Review*. Online. PMC. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10536829/>. [cit. 2025-04-18].

ZHAO, Nan; YU, Ting a YAN, Fujie, 2023. *Probiotic role and application of thermophilic Bacillus as novel food materials*. Online. ScienceDirect. Dostupné z: [Probiotic role and application of thermophilic Bacillus as novel food materials - ScienceDirect](#) . [cit. 2025-04-18].

ZHONG, Xianfeng; JIN, Yuying; REN, Hong; HONG, Tingting; ZHENG, Jianwei et al., 2024. *Research progress of Bacillus velezensis in plant disease resistance and growth promotion*. Online. Frontiers. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/journals/industrial-microbiology/articles/10.3389/finmi.2024.1442980/full>. [cit. 2025-05-07].

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1 Purifikácia DNA pomocou SPRIselect	40
Obrázok 2 Schéma obsahu mikrotitračnej doštičky.....	42
Obrázok 3 Rast <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> E3 pri rôznych teplotách	46
Obrázok 4 Rast <i>Bacillus cereus</i> A1 pri rôznych teplotách	47
Obrázok 5 Rast <i>Bacillus pumilus</i> L3 pri rôznych teplotách.....	47
Obrázok 6 Rast <i>Bacillus siamensis</i> L4 pri rôznych teplotách.....	48
Obrázok 7 Rast <i>Bacillus velezensis</i> X1 pri rôznych teplotách.....	48
Obrázok 8 Rast <i>Cytobacillus horneckiae</i> B1 pri rôznych teplotách	49
Obrázok 9 Rast <i>Lysinibacillus fusiformis</i> N2 pri rôznych teplotách	50
Obrázok 10 Rast <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> C5 pri rôznych teplotách.....	50
Obrázok 11 Rast <i>Peribacillus simplex</i> E5 pri rôznych teplotách.....	51
Obrázok 12 Schopnosť tvorby biofilmu u testovaných kmeňov	53
Obrázok 13 Testovanie antimikróbnej rezistencie diskovo difúznou metódou	54
Obrázok 14 Vyhodnotenie pôsobenia antibiotík na testované kmene	55

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1 Zoznam použitých antimikrobiálnych látok a ich koncentrácie.....	35
Tabuľka 2 Program pre amplifikáciu DNA pre sekvenciu génu pre 16S rRNA	38
Tabuľka 3 Nastavené parametre bioreaktoru RTS-1C (Biosan).....	41
Tabuľka 4 Výsledky identifikácie baktérií sekvenciou génu pre 16S rRNA	45
Tabuľka 5 Limitné hodnoty pre kategórie tvorby biofilmu testovaných izolátov	52
Tabuľka 6 Vyhodnotenie schopnosti tvorby biofilmu u testovaných izolátov	53
Tabuľka 7 Antibiotická rezistencia u vybraných bakteriálnych kmeňov	56

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

a_w	aktivita vody
BHI	Brain Heart Infusion
bp	párov bází
CV	cut-off value
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EUCAST	Európsky výbor pre testovanie antimikrobiálnej citlivost (ang. European Committee on antimicrobial susceptibility testing)
MHA	Mueller Hinton Agar
n	počet
NB	Nutrient Broth
OD	optická denzita
PCA	Plate Count Agar
PCR	polymerázová reťazová reakcia
rRNA	ribozomálna ribonukleová kyselina