

Izolace a charakterizace gramnegativních tyčinek z mléčných potravin s podílem kozího mléka se sníženou vodní aktivitou

Iveta Blahová



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:	Iveta Blahová
Osobní číslo:	T22200
Studijní program:	B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin
Specializace:	Potravinářské biotechnologie a aplikovaná mikrobiologie
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Izolace a charakterizace gramnegativních tyčinek z mléčných potravin s podílem koziho mléka se sníženou vodní aktivitou

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši zaměřenou na výskyt gramnegativních tyčinek v potravinách mléčného původu s nízkou vodní aktivitou vyrobených z koziho mléka. Zaměřte se na gramnegativní tyčinky a faktory, které mohou ovlivňovat jejich růst.
- 2) Dostupnými metodami identifikujte gramnegativní tyčinky izolované z testovaných vzorků potravin se sníženou vodní aktivitou.
- 3) Provedte charakterizaci vybraných kmenů bakterií.
- 4) Výsledky vyhodnotte, diskutujte a formulujte závěry práce.

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

Seznam doporučené literatury:

CHITRAKAR, B., ZHANG, M., ADHIKARI, B. Dehydrated foods: Are they microbiologically safe? Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 59: 2734-2745. 2019
SERT, D., MERCAN, E. Production and characterisation of goat milk powder made from sonicated whole milk concentrates. International Dairy Journal, 129. 2022
WANG, H., GUO, M. Microbiological profiles, physiochemical properties and volatile compounds of goat milk kefir fermented by reconstituted kefir grains. LWT – Food Science and Technology, 183. 2023
BOURDICHON, F., BETTS, R. et al. Processing environment monitoring in low moisture food production facilities: Are we looking for the right microorganisms? Food Microbiology. 356: 109351. 2021
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 autora

ABSTRAKT

Cílem bakalářské práce byla charakterizace gramnegativních tyčinek izolovaných z potravin s nízkou aktivitou vody. V rámci práce byla provedena identifikace izolovaných bakterií sekvenací genu 16S rRNA. Byla hodnocena citlivost k vybraným antibiotikům za účelem detekce antibiotické rezistence, dále byl sledován růst izolátů při různých teplotách a byla zjišťována tvorba biofilmu pomocí modifikované Christensenovy metody. Bylo zjištěno, že izolované kmeny gramnegativních bakterií patří do rodů *Cronobacter*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* a *Pseudescherichia*. U všech izolátů byl pozorován růst při teplotách 25 °C a 30 °C. Izoláty z čeledi *Moraxellaceae* vykazují sníženou citlivost na většinu testovaných antibiotik a všechny izoláty vykazovaly rezistenci na cefalosporinová antibiotika. Tvorba biofilmu byla prokázána u izolátů *Acinetobacter* a *Cronobacter sakazakii*. Tato práce ukázala, že gramnegativní bakterie se mohou vyskytovat i v potravinářských výrobcích, které jsou běžně považovány za mikrobiologicky bezpečné.

Klíčová slova: gramnegativní bakterie, sušené mléko, antibiotická rezistence, biofilm, sekvenace

ABSTRACT

The aim of the thesis was to characterize gramnegative rods isolated from food products with low water activity. Bacterial isolates were identified by 16r RNA gene sequencing. The susceptibility of the isolates to selected antibiotics was tested to detect resistance, the growth of the isolates was monitored at three different temperatures and biofilm formation was analysed using a modified Christensen method. Bacteria isolates were identified as genera of *Cronobacter*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* and *Pseudescherichia*. All tested isolates showed growth at the 25 °C and 30 °C. Isolates from the *Moraxellaceae* family showed reduced susceptibility to most tested antibiotics, and all isolates were resistant to cephalosporins. Biofilm production was confirmed in *Acinetobacter* and *Cronobacter sakazakii*. This work showed that gramnegative bacteria can be find in food products that are known to be microbiologically safe.

Keywords: gramnegative rods, powdered milk, antibiotic resistance, biofilm, sequencing

Ráda bych poděkovala vedoucí mé práce paní prof. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za cenné rady a možnost pracovat v mikrobiologické laboratoři. Ráda bych poděkovala Ing. Pavlíně Píšové, která mně poskytla izoláty, se kterými jsem mohla pracovat. Dále abych chtěla poděkovat laborantkám mikrobiologické laboratoře Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí Ing. Veronice Kučabové a Mgr. Markétě Havlišové za pomoc při práci na praktické části bakalářské práce.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, která mně byli velikou oporou během celého studia.

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

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 POTRAVINY SE SNÍŽENOU VODNÍ AKTIVITOU	13
1.1 VLASTNOSTI POTRAVIN S NÍZKOU AKTIVITOU VODY	13
1.2 MOŽNOSTI SNÍŽENÍ VODNÍ AKTIVITY POTRAVIN	15
1.2.1 Sušené potraviny	15
1.2.2 Lyofilizované potraviny	16
1.2.3 Změna osmotické koncentrace	17
2 MIKROORGANISMY NACHÁZEJÍCÍ SE V POTRAVINÁCH S NÍZKÝM OBSAHEM VODY.....	19
2.1 VYBRANÉ GRAMNEGATIVNÍ TYČINKY PŘÍTOMNÉ V POTRAVINÁCH S NÍZKÝM OBSAHEM VODY	19
2.1.1 <i>Enterobacter</i> spp.	19
2.1.2 <i>Cronobacter</i> spp.....	19
2.1.3 <i>Pseudescherichia vulneris</i>	20
2.1.4 <i>Acinetobacter</i> spp.....	20
2.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ RŮST MIKROORGANISMŮ V POTRAVINÁCH S NÍZKOU VODNÍ AKTIVITOU	21
2.2.1 Aktivita vody.....	21
2.2.2 pH.....	22
2.2.3 Složení atmosféry	22
2.2.4 Teplota.....	23
2.2.5 Oxidačně redukční potenciál	24
2.2.6 Teorie překážek	25
II PRAKTICKÁ ČÁST	26
3 CÍLE PRÁCE	27
4 MATERIÁL	28
4.1 MIKROORGANISMY	28
4.2 POMŮCKY, ZAŘÍZENÍ A POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	28
5 METODIKA	31
5.1 IDENTIFIKACE BAKTERIÍ SANGEROVOU METODOU SEKVENOVÁNÍ	31
5.1.1 Kontrola čistoty kolonií.....	31
5.1.2 Izolace DNA.....	31
5.1.3 Amplifikace genu	32
5.1.4 Vizualizace DNA	33
5.1.5 Purifikace	34
5.1.6 Identifikace izolovaných mikroorganismů sekvenací produktů PCR	34
5.2 SLEDOVÁNÍ RŮSTU GRAMNEGATIVNÍCH TYČINEK	35
5.3 STANOVENÍ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE DISKOVOU DIFÚZNÍ METODOU	35

5.4	STANOVENÍ SCHOPNOSTI TVORBY BIOFILMU CHRISTENSENOVOU METODOU.....	36
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
6.1	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ METODOU SEKVENOVÁNÍ GENU PRO 16 rRNA	38
6.2	RŮST KMENŮ PŘI RŮZNÝCH TEPLITÁCH	40
6.3	ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE TESTOVANÝCH KMENŮ	46
6.4	SCHOPNOST TVORBY BIOFILMU	49
6.5	SOUHRNNÁ DISKUZE.....	51
	ZÁVĚR.....	54
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	55
	SEZNAM OBRÁZKŮ	61
	SEZNAM TABULEK.....	62
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	63

ÚVOD

Mezi potraviny se sníženou vodní aktivitou můžeme zařadit sušené potraviny, které mají hodnotu aktivity vody v rozmezí od 0,03 do 0,7. Tento typ potravin je mylně považován za bezpečné před patogenními bakteriemi přenášenými potravinami. Nejčastější kontaminace bývají způsobeny bakteriemi *Salmonella* spp., *Cronobacter* spp., *Styphylococcus* spp. a *Escherichia coli* (Chitrakar et al., 2019).

V posledních letech roste počet onemocnění způsobených patogeny v potravinách s nízkou aktivitou vody, mezi které lze zařadit koření, ořechy, čokoládu, cereálie nebo sušené mléko. Tyto potraviny vznikají sušením nebo přirozeně obsahují málo vody a často jsou považovány za bezpečné díky předpokladu dlouhé trvanlivosti. Zvýšený výskyt potenciálních patogenů však ukazuje, že i tyto potraviny mohou být rizikové (Ijabadeniyi a Pillay, 2017).

Mnoho mikroorganismů přežívá proces sušení, a v důsledku nedodržení pokynů výrobce (nevhodné skladování či způsob konzumace) může dojít k opětovnému růstu bakterií a zvýšení rizika infekce (Beuchat et al., 2013).

Tvorba biofilmu u izolátů z potravin může představovat základní faktor enviromentální kontaminace, která může významně přispívat k přenosu bakterií. Tyto bakterie jsou schopny dlouhodobě přežívat na různých površích, přičemž přítomnost organických zbytků na kontaktních plochách podporuje jejich růst a může vést k riziku křížové kontaminace (Carvalheira et al., 2021).

Nesprávné zacházení s antibiotiky je považováno za jednu z hlavních příčin a přenosu alimentárních patogenů rezistentních vůči antibiotikům, a proto by mělo docházet k častému testování rezistomu v prostředí rostlinné a živočišné výroby a potravinářských závodů (Grudlewska-Buda et al., 2023).

I TEORETICKÁ ČÁST

1 POTRAVINY SE SNÍŽENOU VODNÍ AKTIVITOU

Potraviny, které by před desítkami let byly považovány za „bezpečné“ kvůli své neschopnosti podporovat růst mikroorganismů, jsou nyní stále častěji předmětem zájmu. V současnosti některé alimentární patogeny nemusí v potravině růst, aby představovaly riziko, protože jejich samotná přítomnost už může být potenciálním rizikem pro lidské zdraví (Bourdichon et al., 2021). Existuje rozšířená představa pravděpodobně mylná, že bakterie nejsou schopny přežít a růstu v potravinách s nízkou aktivitou vody, tedy v prostředí s vodní aktivitou nižší než 0,7 (Chitrakar et al., 2019). Některé patogeny v potravinách s nízkou aktivitou vody často vykazují zvýšenou toleranci vůči teplu a dalším úpravám (Beuchat et al., 2013).

Voda se významně podílí na hodnotách vodní aktivity. V potravinách má vliv na fyzikální vlastnosti, chování potravin při zpracování, mikrobiální růst, stabilitu, fázové přechody a organoleptické vlastnosti (Rifna et al., 2022). Voda usnadňuje transport látek do buňky a z buňky, včetně živin a odpadních látek. Mikrobiální buňky také mezi sebou soutěží a komunikují s buňkami svého druhu a dalšími mikroorganismy prostřednictvím rozpustných a hydrofobních látek uvolňovaných do vodného extracelulárního prostředí (Hallsworth, 2022).

Ke snížení vodní aktivity potravin se používají metody zahřívání, sušení, lyofilizace nebo změna osmotické koncentrace. Snížení aktivity vody v potravinách zabraňuje růstu vegetativních mikrobiálních buněk, klíčení spor a produkci toxinů plísněmi a bakteriemi. Snížení aktivity vody prodlužuje lag fázi mikroorganismů a snižuje rychlost růstu (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016).

1.1 Vlastnosti potravin s nízkou aktivitou vody

Aktivita vody (a_w) potraviny popisuje stupeň „váznosti“ obsažené vody v potravině a je měřítkem její dostupnosti působit jako rozpouštědlo a podílet se na chemické působení nebo biochemických reakcích. Aktivita vody je i hlavním faktorem v prevenci nebo omezování mikrobiálního růstu. V několika případech je a_w primární parametr zodpovědný za stabilitu potravin, modulující mikrobiální odezvu, a určení typu mikroorganismů vyskytujících se v potravinách (Barbosa-Cánovas et al., 2007).

Mezi potraviny s nízkou aktivitou vody patří zejména sušené ovoce a zelenina, čaj, káva, sušené houby, sušené masné výrobky, sušené rybí výrobky, sušená vejce, obilná zrna

a mouka, koření a byliny (celé a v prášku), sušené luštěniny, sušené ořechy, sušené mléko a prášky pro kojeneckou výživu (Chitrakar et al., 2019).

Obecně se uznává, že v sušených potravinách mikroorganismy nerostou kvůli nedostatku vody k udržení růstu. Mikroorganismy však mohou být stále životaschopné a schopné reprodukce při dehydrataci, což představuje potenciální riziko pro lidské zdraví a zaměření pozornosti na dekontaminační procesy pro sušené produkty, jako jsou prášky, které mají být rehydratovány na vysoký obsah vody (např. sušené mléko) (Barbosa-Cánovas et al., 2007).

Minimální hodnoty a_w , při které mohou mikroorganismy růst (tj. hodnota a_w , pod kterou jsou narušeny fyziologické aktivity nezbytné pro buněčné dělení je 0,60. Minimální a_w pro růst většiny bakterií je přibližně 0,87, ačkoliv halofilní bakterie mohou růst i při a_w 0,75 (Beuchat et al., 2013).

Tabulka 1: Aktivita vody různých potravin a minimální požadavky na a_w mikrobiálních skupin.

Potravina	A_w	Mikroorganismy	Minimální a_w
Ovoce, zelenina, maso a ryby	≥ 0.98	Většina bakterií	>0.91
Vařené maso a chleba	0.98–0.95	Většina kvasinek	0.88
Nasolené maso a sýr	0.95–0.91	Většina plísní	0.80
Párky	0.91–0.87	Halofilní bakterie	0.75
Mouka, rýže, fazole a hrách	0.87–0.90	Xerofilní plísně	0.71
Džemy a marmelády	0.80–0.75	Osmofilní kvasinky	0.62–0.60
Cukrovinky	0.75–0.65		
Sušené ovoce	0.65–0.20		
Koření a sušené mléko	0.60–0.20		

Zdroj: (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016)

Většina potravin má aktivitu vody vyšší než 0,95 a to zajišťuje dostateční množství využitelné vody pro růst bakterií, kvasinek a plísní. Například patogenní bakterie zpravidla nemůžou růst při a_w pod 0,85 (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016). Kvasinky a plísně jsou tolerantnější ke snížené a_w , ale obvykle nerostou pod hodnotou a_w 0,62 (Barbosa-Cánovas et al., 2007).

Potraviny s vysokým obsahem vody (jako ovoce, zelenina, maso a ryby) mají hodnotu a_w 0,98 nebo vyšší (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016). Mezi tuhle skupinu spadají potraviny podléhající rychlé zkáze (Barbosa-Cánovas et al., 2007). Mikrobiologická stabilita mnoha potravin s hodnotami a_w 0,7–0,85 (džemy, klobásy atd.) závisí i na dalších

konzervačních zákrocích (nízké pH, konzervační látky, pasterizace atd.). Potraviny s nízkým obsahem vody mají a_w ještě nižší než 0,60 (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016).

1.2 Možnosti snížení vodní aktivity potravin

Pro odstranění vody z potraviny (tj. snížení vodní aktivity) se používají různé metody. Odstranění vody má negativní vliv na růst a přežití různých mikroorganismů v potravinách a zpomaluje kazivost potravin. Jak už bylo zmíněno, některé mikroorganismy mohou přežívat v prostředí s nízkou a_w , eliminace takových mikroorganismů je kritickým krokem pro bezpečnost potravinářských výrobků. Nejběžnější metodou používanou k dosažení vysokého obsahu sušiny v potravinách je odpařování části vody působením tepla. Jiné metody pro sušení potravin jsou lyofilizace, membránová separace, osmotická dehydratace (pomocí cukru nebo soli), sušení horkým vzduchem, mechanické sušení, sušení pěnou a uzením (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016). Mezi nejstarší techniky, které se používaly ke konzervaci potravin, patří sušení na slunci nebo přidání cukru a soli (Barbosa-Cánovas et al., 2007).

Předúprava potravin před vstupem do kroku snížení a_w může inaktivovat mikroorganismy a enzymy. Třídění, praní s nebo bez dezinfekčních prostředků, loupání, krájení nebo řezání na požadovanou velikost a tvar a blanšírování může změnit zastoupení a počet přítomných mikroorganismů (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016).

1.2.1 Sušené potraviny

Sušení je proces konzervace potravin, při kterém se snižuje množství volné vody. Mezi používané dehydratační techniky patří zahušťování a sušení. Dehydratace znamená odstření vody prostřednictvím přenosu teplota a hmoty během ohřevu, přičemž klíčovými faktory jsou teplota, vlhkost a proudění vzduchu (Barbosa-Cánovas et al., 2007).

Během sušení není klesající aktivita vody jediný stres působící na mikroorganismy. V závislosti na použité technologii mohou být mikroorganismy vystaveny změně teploty a tlaku, změně atmosféry, jako je např. zvýšení koncentrace CO_2 a N_2 nebo elektromagnetickým vlnám (Chitrakar et al., 2019).

Mechanické sušení je řízený proces trvající od několika sekund po několik hodin. Používané metody zahrnují tunelové sušení, při němž potraviny procházejí tunelem proti proudění horkého vzduchu; válcové sušení, kde se tekuté potraviny nanášejí v tenké vrstvě na vyhřívaný buben a rychle schnout; a sušení rozprašováním, při kterém jsou kapaliny

rozstříkovány do proudu horkého vzduchu o teplotě až 260 °C. Tato metoda se využívá k sušení zeleniny, ovoce, ovocných šťáv, mléka, kávy, čaje a masa. Mikroorganismy mohou být během sušení usmrceny nebo subletálně poškozeny, přičemž podmínky skladování ovlivňují jejich další přežití. Spory zůstávají životaschopné a přeživší mikroorganismy bývají často termodurické, jsou schopné přežít pasterizaci. Přesto i některé gramnegativní bakterie mohou přežít a následně působit kažení potravin. (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016).

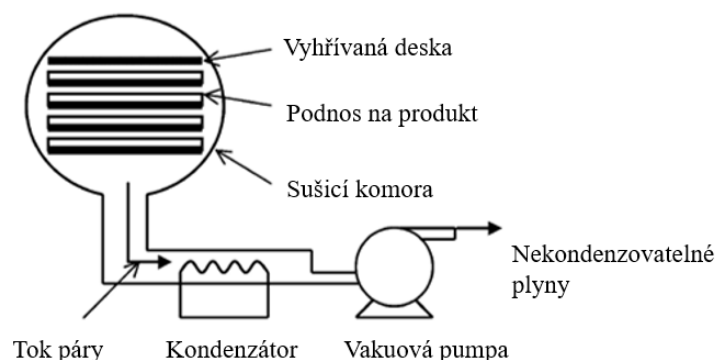
Konvenční sušení vzduchem spočívá v zahřívání potravin horkým vzduchem, čímž se odstraňuje vodní pára. Parametry zahrnují teplotu vzduchu mezi 50 °C a 95 °C, relativní vlhkost 10–40 % a rychlost vzduchu 1–4 m/s. Mezi používání systémů patří rotační sušárny pro granulované pevné látky, kontinuální tunelové a pásové sušárny či parní sušárny využívající přehřátou páru (Barbosa-Cánovas et al., 2007).

Během sušení může odstranění vody znehodnotit DNA a zároveň způsobit rozpad RNA, denaturaci proteinů, změny cytoplazmatické membrány a poškození buněčné stěny. Nicméně mnoho sloučenin obsažených v ovoci a zelenině může zvýšit přežití mikroorganismů. Cukry, polypeptidy, polyalkoholy, aminokyseliny, glycerol a karboxylové kyseliny prokazatelně ochraňují bakterie během sušení (Chitrakar et al., 2019).

1.2.2 Lyofilizované potraviny

Lyofilizace je metoda konzervace potravin, která kombinuje rychlé zmrazení s následným sušením ve vakuu. Tento proces umožňuje odstranění vody sublimací, čímž se zachovává původní tvar, velikost a struktura potravin. Povrch lyofilizovaných potravin je náchylný k poškození a chemickým reakcím, proto je důležité jejich skladování v parotěsných obalech a inertní atmosféře pro zpomalení oxidace (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016).

Tři hlavní kroky při lyofilizaci jsou zamrazení produktu, sublimace ledu a odstranění vodní páry. V lyofilizátorech (obr. 1) jsou zmrazené potraviny umístěny na vyhřívané police ve vakuové komoře. Aplikované teplo umožňuje sublimaci vody bez jejího tání, čímž se předchází deformaci a smrštění. Konečný obsah vody v produktu dosahuje přibližně 2–8 %, ale produkty jsou náchylné k oxidaci, proto se často používá vakuové nebo inertní balení. Komerčně se lyofilizují například káva, ovoce, mořské plody a maso (Barbosa-Cánovas et al., 2007).



Obrázek 1: Schéma systému lyofilizace (Barbosa-Cánovas et al., 2007)

Vakuové sušení využívá nízký tlak ke snížení bodu varu vody, čímž umožňuje sušení při nižších teplotách (50–100 °C). Sušení se uskutečňuje vedením tepla z vyhřívaných desek (obr. 1), přičemž rychlost procesu se postupně zpomaluje vlivem izolační vrstvy suchého materiálu. Výsledkem je produkt s minimálními změnami ve struktuře, což umožňuje rychlou a téměř úplnou rehydrataci, což je klíčové například pro instantní potraviny (Barbosa-Cánovas et al., 2007).

Nevýhodou procesu lyofilizace je vysoká energetická náročnost, což omezuje její využití na dražší potraviny. Proces vyžaduje 3–8krát více energie než jiné metody. Současný výzkum se zaměřuje na zefektivnění procesu, například pomocí mikrovlnného ohřevu nebo cyklické lyofilizace s inertními plyny, které urychlují sublimaci ledu. Zlepšení rehydratačních technik by mohlo dále zvýšit její potenciál, neboť některé produkty rehydratují snadno, zatímco jiné vyžadují optimalizaci složení rehydratačního roztoku a rychlosti zmrazování (Troller, 2012).

1.2.3 Změna osmotické koncentrace

Intracelulární vodní aktivita buněk je o něco nižší než u vnějšího média, takže buňky jsou schopny udržet tlak turgoru. Je-li vodní aktivita externího média snížena, buňky jsou vystaveny osmotickému šoku a rychlá ztráta vody způsobí proces zvaný plazmolýza (Sperber, 1983).

Konzervace potravinářských produktů pomocí ponoření produktu do hypertonického roztoku (tj. roztok cukru, soli, sorbitolu nebo glycerolu) je známá jako osmotická dehydratace. Osmotické dehydratační systémy se skládají především ze skladovací nádrže,

kde je připraven roztok a čerpadlo pro řízení průtoku. Produkt je umístěn v nádrži, kde je osmotický roztok čerpán konstantní rychlostí. (Barbosa-Cánovas et al., 2007).

Osmotická dehydratace potravin má výhody při zpracování ovoce a zeleniny. Tato metoda produkuje potraviny trvanlivé s nízkým obsahem vody. Rozpuštěná látka není schopna difundovat přes membránu do buněk. Osmotické dehydratace buněk lze dosáhnout přidáním solutů do potravin. Látky, jako jsou NaCl, sacharóza, glukóza a invertovaný cukr se používají k úpravě potravin. Osmoticky dehydratovaný potravinářský produkt může být dále zpracováván za účelem získání stabilního produktu pro skladování nebo slouží jako předúprava pro konzervování, zmrazení a další zpracování (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016).

Po solení masných výrobků zpravidla následuje sušení a zrání, čímž se snižuje obsah vody a a_w , což ovlivňuje enzymatickou aktivitu, mikrobiální růst a stabilitu produktu. Suché solení se používá i u zeleniny, např. kysaného zelí, kde sůl podporuje rozklad buněk a následnou fermentaci mléčnými bakteriemi. Mokré solení spočívá v ponoření produktů (maso, sýry, zelenina) do solného roztoku o koncentraci 2–25 % (w/v), dle požadovaných vlastností. Konečná koncentrace soli závisí na typu suroviny, velikosti, době solení produktů a teplotě, stejně jako vlastnosti soli, včetně velikosti jejích částic (Prakash et al., 2016).

Cukry se využívají ke konzervaci zejména ovocných produktů, zlepšují organoleptické vlastnosti a slouží jako substrát pro fermentaci. Džemy a ovocné konzervy vyžadují cukernou koncentraci 65 % nebo tepelně ošetření pro stabilitu. Kandované ovoce vzniká postupnou impregnací cukerným roztokem, čímž se zabrání mikrobiálnímu růstu. Cukry mohou být součástí solných roztoků pro podporu fermentace (Prakash et al., 2016).

Proces osmotické dehydratace v potravinářském průmyslu má několik výhod, a to zlepšení kvality produktu (pokud jde o barvu, chuť a texturu), snížení nákladů na balení a distribuci, odstranění potřeby chemického ošetření, stabilitu a zadržení živin během skladování (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016).

2 MIKORORGANISMY NACHÁZEJÍCÍ SE V POTRAVINÁCH S NÍZKÝM OBSAHEM VODY

2.1 Vybrané gramnegativní tyčinky přítomné v potravinách s nízkým obsahem vody

2.1.1 *Enterobacter* spp.

Enterobacter je rod v rámci čeledi *Enterobacteriaceae*. Bakterie rodu *Enterobacter* jsou gramnegativní tyčinky, obvykle pohyblivé (bičíkaté), fakultativně anaerobní, netvoří spory a jsou oxidáza negativní. *Enterobacter* spp. byl nalezen v široké škále potravin. Bakterie nepřežívají pasterizaci, ale byly nalezeny v pasterizovaném mléce a smetaně, což naznačuje, že došlo ke kontaminaci po procesu. Nejčastěji izolované druhy *Enterobacter* jsou ze sušených mléčných výrobků (Iversen, 2014).

Přítomnost β -laktamáz u *Enterobacter* spp. je primární mechanismus antimikrobiální rezistence. β -laktamázy mohou hydrolyzovat β -laktamový kruh v penicilinu a cefalosporinech (Ramirez a Giron, 2023).

2.1.2 *Cronobacter* spp.

Cronobacter patřící rovněž do čeledi *Enterobacteriaceae* je gramnegativní fakultativní anaerob, který může produkovat adenosintrifosfát (ATP) v přítomnosti kyslíku prostřednictvím aerobního dýchání a může přejít na fermentaci za vzniku ATP v nepřítomnosti kyslíku (Bourdichon et al., 2021). Je pohyblivý, jelikož má peritrichální bičíky, je oxidáza negativní a netvoří spory. *Cronobacter* spp. mají široký teplotní rozsah růstu, který se pohybuje od 6 do 45 °C, s optimálním rozsahem 37–43 °C (Abdesselam a Pagotto, 2014). Byla zjištěna rezistence na mnoho klinicky významných antibiotik, včetně penicilinu, klindamycinu, cefalosporinu, vankomycinu a tetracyklinu (Ling et al., 2022).

Cronobacter sakazakii, dříve známý jako *Enterobacter sakazakii*, je podmíněně patogenní organismus. Tento mikroorganismus byl poprvé charakterizován v roce 1929. V 80. letech 20. století byl tento patogen klasifikován jako nový druh, a bylo zjištěno, že může způsobovat onemocnění kojenců a novorozenců (Abdesselam a Pagotto, 2014).

Patogen byl izolován z celé řady dalších potravin s nízkou hodnotou vodní aktivity a složek potravin, včetně sušeného mléka, cereálií, semen, ořechů, bylinek, koření, mouky nebo kakaového prášku (Beuchat et al., 2013). Prášková kojenecká výživa je vehikulum,

které je převážně spojováno s propuknutím infekcí u kojenců a novorozenců. Možné zdroje kontaminace zahrnují i složky, které se přidávají do výživy bez předchozího tepelného ošetření (Abdesselam a Pagotto, 2014).

Cronobacter může způsobit bakteriémii a sepsi, hromadění mozkomíšního a peritoneálního moku, mozkové abscesy, tvorbu cyst, meningitidu a nekrotizující enterokolitidu. Kojenci, kteří přežijí infekci, často trpí opožděnými neurologickými příznaky (opožděným vývoje mozku, mozkovými abscesy nebo hydrocefalem) (Feeney et al., 2015).

Cronobacter je dle ICMSF (2001) uveden mezi patogeny v kategorii „vážné nebezpečí pro omezené skupiny populace, život ohrožující nebo způsobující chronické či dlouhodobé infekce“, což znamená, že představuje závažné riziko zejména pro kojence, seniory a osoby s oslabenou imunitou (Chitrakar et al., 2019).

2.1.3 *Pseudescherichia vulneris*

Pseudescherichia vulneris (dříve *Escherichia vulneris*) je gramnegativní, oxidáza negativní, fermentativní, pohyblivá tyčinka náležící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Mezi charakteristické pozitivní biochemické reakce lze zařadit testy na methylovou červen, malonát a lysindekarboxylázu. Produkuje kyseliny z D-mannitolu, L-arabinózy, rafinózy, L-ramnózy, D-xylózy, trehalózy, celobiózy a melibiózy. Negativní testy byly pozorovány na Voges-Proskauer (detekci acetoinu), indol, močovinu, H₂S, citrát, ornitindekarboxylázu, fenylalanindeaminázu a DNázu. Většina kmenů dává negativní nebo opožděné pozitivní reakce v testech na laktózu, sacharózu a KCN (Cabral et al., 2025). Optimální růst nastává při teplotách mezi 35–37 °C (Podstawka, 2024).

2.1.4 *Acinetobacter* spp.

Acinetobacter jsou glukóza-nefermentativní, aerobní gramnegativní kokobacily, obvykle se vyskytující v diploidní formaci nebo v řetízcích různé délky náležící do čeledi *Moraxellaceae*. Jsou nepohyblivé, kataláza-pozitivní a oxidáza-negativní (Van Looveren a Goossens, 2004). Optimální teplota růstu pro většinu kmenů je 30-35 °C. Většina kmenů roste dobře i při 37 °C. Potravinové izoláty dokážou růst i při teplotě 5 °C (Kämpfer, 2014).

Acinetobacter je heterogenní skupina organismů, které jsou typicky volně žijícími saprofyty. Různé druhy rodu jsou však obecně spojeny s různými stanovišti (půda, voda, člověk, potraviny a zvířata). *Acinetobacter* spp. je uznáván jako důležitý podmíněný patogen především u imunokompromitovaných pacientů (Van Looveren a Goossens, 2004).

A. baumannii je součástí komplexu *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii*, který zahrnuje *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* a *A. calcoaceticus*. První tři jsou spojeny s infekcemi, zatímco čtvrtý je zřídka prokázán jako virulentní. Komplex roste při teplotách mezi 35 °C a 37 °C. Jediným druhem skupiny schopným přežít i při 44 °C je *A. baumannii* (Milani et al., 2021).

Nedostatečná pozornost věnovaná hygienickým postupům během výroby nebo zpracování potravin může způsobit kontaminaci různými patogenními nebo kažení způsobujícími bakteriemi, mezi nimi i zástupci rodu *Acinetobacter*. Některé studie naznačují, že proteolytické a lipolytické enzymy produkované *Acinetobacter* spp. a dalšími bakteriemi izolovanými z mléčných potravin by mohly příznivě přispívat k chuti, vůni nebo struktuře produktu. Jiné studie však popisují druhy *Acinetobacter* jako potenciální patogeny v potravinách, včetně vzorků kravského a kozího mléka a mléčných výrobků (Malta et al., 2020). Lze je zachytit i v dalších potravinách jako je ovoce nebo syrová zelenina (Elbehiry et al., 2021). Běžně se vyskytují v chlazených čerstvých produktech. Jejich hlavními zdroji jsou půda a voda. V syrovém mléce bývá často vysoké množství *Acinetobacter* spp., přičemž některé kmeny tvoří kapsulární polysacharidy a způsobují slizovatění mléka. Tyto bakterie mohou tvorbou slizu na povrchu negativně ovlivnit i sýry a tvarohy (Kämpfer, 2014).

2.2 Faktory ovlivňující růst mikroorganismů v potravinách s nízkou vodní aktivitou

Faktory ovlivňující mikrobiální růst v potravinách určují povahu znehodnocení a případných zdravotních rizik. Manipulace s více faktory k inhibici růstu mikroorganismů se používá jako technologie při konzervaci potravin (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016).

2.2.1 Aktivita vody

Voda je přítomna buď ve „volné“ nebo „vázané“ formě. Aktivita vody (a_w) je měřítkem dostupnosti vody pro biologické funkce a týká se vody ve volné formě (Prakash et al., 2016).

Aktivitu vody v potravině lze vyjádřit pomocí poměru parciálního tlaku vodní páry potravin (p) k parciálnímu tlaku čisté vodní páry (p_0) při stejné teplotě dle vztahu: (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016)

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

Čistá voda má hodnotu aktivity vody (a_w) rovnu 1,0. Pokud se množství vody dostupné pro mikroorganismy v potravině sníží, klesne i hodnota a_w pod 1,0 (Bursová et al., 2014).

Aktivita vody ovlivňuje mnoho fyzikálně-chemických procesů v potravinách, například neenzymatické hnědnutí, oxidace lipidů a degradaci vitamínů rozpustných ve vodě. Hraje také roli v enzymatických reakcích, denaturaci proteinů a ovlivňuje texturní vlastnosti potravin (Bursová et al., 2014).

Vliv aktivity vody na růst mikroorganismů v potravinách je popsán v kapitole 1.1.

Mezi faktory ovlivňující růst mikroorganismů patří také změna osmotické koncentrace tzv. osmotická dehydratace, která úzce souvisí s aktivitou vody (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016). Tento jev je popsán v kapitole 1.2.3.

2.2.2 pH

pH ovlivňuje stabilitu makromolekul, funkci enzymů a buněčnou aktivitu. Odpovídá zápornému logaritmu koncentrace vodíkových iontů: $\text{pH} = -\log H^+$ (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016).

Každý mikroorganismus má optimální pH pro růst. Mnoho mikroorganismů roste optimálně blízko pH 7 a většina roste dobře i mezi pH 5 a 8 (Silliker et al., 1980).

Buňky se před nevyhovujícími hodnotami pH chrání třemi mechanismy: homeostatickou odpovědí (odčerpání protonů), acidotoleranční odpovědí (produkce ochranných proteinů) a syntézou acidických šokových proteinů. Většina potravin obsahuje slabé organické kyseliny, které částečně disociují a ovlivňují mikrobiální růst. Nedisociované kyseliny pronikají do buněk, kde uvolněné protony snižují pH cytoplazmy a inhibují tím mikroorganismy (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016).

Kyselost hraje roli při konzervaci fermentovaných potravin nebo může být doplňkovým faktorem kombinovaným s jinými faktory (konzervační látky, teplota, vodní aktivita.) (Silliker et al., 1980).

2.2.3 Složení atmosféry

Modifikovaná atmosféra a řízená atmosféra se změnou složení plynů v obalu – snižuje se O_2 , zvyšuje se CO_2 nebo se přidávají další plyny (např. dusík, etylen, etanol), ovlivňují růst mikroorganismů a zvýší se tím trvanlivost potraviny. CO_2 brání množení aerobních mikrobů,

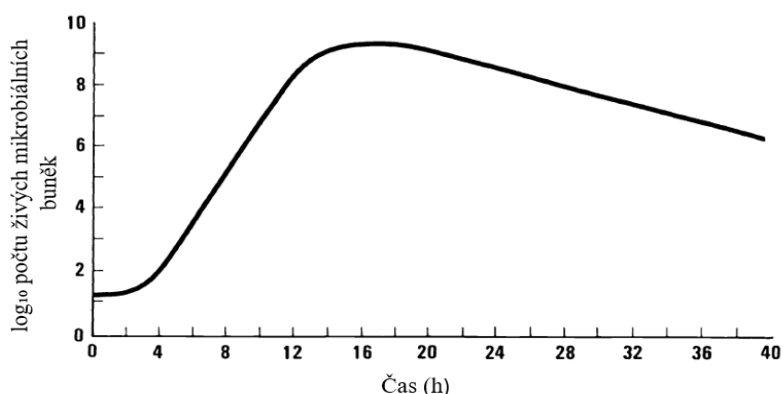
jako jsou plísně, kvasinky či některé bakterie – využívá se hlavně u ovoce a zeleniny (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016).

Vakuové balení omezuje růst aerobních mikroorganismů (např. *Pseudomonas*, *Bacillus*, plísně) tím, že se odstraňuje kyslík. V takovém prostředí se ale může dařit anaerobním a mikroaerofilním bakteriím, včetně toxigenních *Clostridium*, což může být rizikem při delším skladování (Bursová et al., 2014).

2.2.4 Teplota

Každý jednotlivý mikroorganismus má také své definované rozmezí teploty růstu, a to – teplotní maximum, minimum a optimum. Když teplota, při které organismus roste, stoupá, rychlost chemických reakcí v buňce se zvyšuje, růst se zrychluje a dosahuje maxima při optimální růstové teplotě. Když teplota překročí optimum, metabolické reakce se začnou zpomalovat v důsledku poškození enzymů a membrán buňky. Optimální teplota pro růst je tedy teplota, při které je mikrobiální růst maximální za převládajících podmínek (Bhat et al., 2012).

V příznivém prostředí růst bakterií normálně probíhá tak, jak je znázorněno obrázku 2. Po krátké adaptační fázi (lag fáze) dochází k rychlému, exponenciálnímu růstu, který se nazývá logaritmická růstová fáze. Vyčerpání živin a jejich hromadění toxických metabolitů nakonec zpomalí rychlost růstu do bodu, kdy buněčné dělení a buněčná smrt jsou v rovnováze. Populace zůstává nehybná určitou dobu, této fázi se říká stacionární. Poté následuje období, kdy populace postupně klesá v důsledku smrti buněk (Silliker et al., 1980).



Obrázek 2: Optimální růstová křivka bakterií (Silliker et al., 1980)

S ohledem na jejich základní růstovou teplotu lze mikroorganismy rozdělit do skupin. Psychrofilní mikroorganismy mají optimální teplotou pro růst 10–15 °C. Tato skupina má

vliv na kažení potravin skladovaných při chladírenských a mrazírenských teplotách. Psychrotrofní mikroorganismy rostou rovněž při chladírenských teplotách, ale jejich teplotní optimum je v rozmezí 20–40 °C a maximum kolem 43 °C. (Bhat et al., 2012). Mezi psychrotrofy řadíme rody *Pseudomonas* a *Enterococcus*, které znehodnocují chlazené výrobky jako například maso, drůbež a zelenina (Demirci et al., 2020).

Mezofilní mikroorganismy se přizpůsobily životu v tělech člověka a teplokrevných živočichů. Optimální teplota růstu je 30–40 °C. Většina mikroorganismů, které způsobují kažení potravin a alimentární onemocnění, patří do této kategorie (Bhat et al., 2012).

U termofilní bakterií je optimální teplota pro růst obvykle mezi 55–65 °C s maximem pro některé až 75–90 °C a minimem asi 35 °C (Silliker et al., 1980). Tyto bakterie jsou často spojovány s kažením tepelně ošetřených konzerv (Demirci et al., 2020).

Existují další mikroorganismy, které mohou optimálně růst při teplotách mezi 80 a 110 °C, označované jako hypertermofilní. Jejich enzymy mají jedinečnou strukturu a funkční vlastnosti, které poskytují vysokou tepelnou stabilitu a optimální aktivita při teplotách nad 70 °C (Demirci et al., 2020).

Vysoká teplota, jenž má smrtící účinek mikroorganismy se nazývá letální teplota. Vegetativní buňky jsou zničeny při 100 °C během 10 minut. Naproti tomu bakteriální spory jsou mnohem odolnější vůči teplu. Tepelné zpracování potravin při teplotách do 100 °C se obecně označuje jako pasterace, je-li potravina vystavena teplotě nad 100 °C, proces se nazývá sterilizace. Odolnost mikroorganismů vůči teplotě závisí i na pH potraviny, a proto kyselé potraviny lze ošetřit i při nižších teplotách než potraviny s neutrálním pH. (Bursová et al., 2014).

Smrtící účinek ochlazení nebo zmrazení závisí na organismu. Některé mikroorganismy zůstávají životaschopné po dlouhou dobu po zamrazení. Obecně platí, že grampozitivní bakterie jsou odolnější vůči zmrazení než gramnegativní. Nejcitlivější na mrazení jsou buňky v exponenciální fázi růstu (Silliker et al., 1980).

2.2.5 Oxidačně redukční potenciál

Oxidačně-redukční potenciál (E_h) substrátu je schopnost substrátu získávat nebo ztrácet elektrony. Přenosem elektronů vzniká potenciálový rozdíl mezi sloučeninami, je měřený v jednotkách milivoltů (mV) (Bhat et al., 2012).

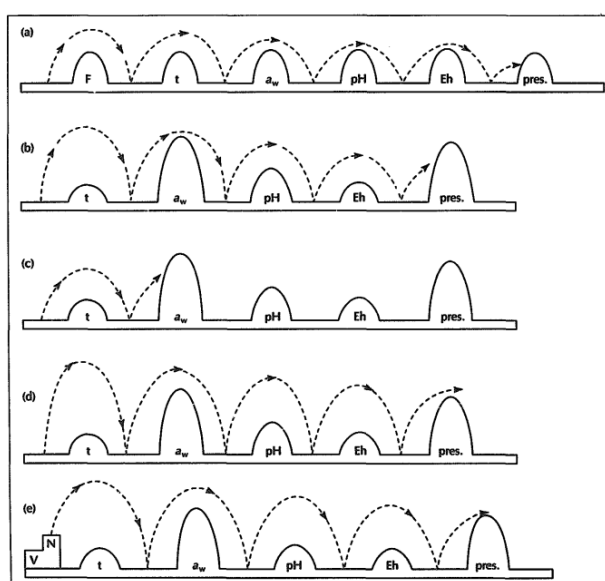
Oxidace je ztráta elektronů, zatímco redukce je zisk elektronů. Když je jedna látka oxidována (tj. ztrácí elektrony), jiná je vždy současně redukována (tj. přijímá elektrony). Tyto reverzibilní oxidačně-redukční procesy jsou životně důležité pro živé buňky (Silliker et al., 1980). Oxidace může být způsobena také přidáním kyslíku, ale přítomnost kyslíku není nutná pro redoxní reakce. (Bhat et al., 2012).

Mikroorganismy se liší svou závislostí na kyslíku, což ovlivňuje i jejich požadavky na redoxní potenciál. Aerobní mikroorganismy potřebují rozpuštěný kyslík a vysoké hodnoty E_h (pozitivní potenciál). Naproti tomu fakultativně anaerobní mikroorganismy snášejí jak pozitivní, tak negativní hodnoty redoxního potenciálu (Bursová et al., 2014).

2.2.6 Teorie překážek

K zajištění bezpečnosti a trvanlivosti potravin se využívá řada metod konzervace, které regulují růst mikroorganismů. Mezi hlavní faktory ovlivňující mikrobiální aktivitu patří teplota, aktivita vody, pH, oxidačně-redukční potenciál nebo přídavek konzervačních látek. Každý z těchto faktů má specifickou úroveň, při níž dochází k účinnému potlačení růstu mikroorganismů (Erkmen a T. Faruk Bozoglu, 2016).

Teorie překážek (obr.3) představuje důležitý přístup k výrobě bezpečných, trvanlivých a výživných potravin. Spočívá v cílené kombinaci vnitřích a vnějších faktorů, které společně působí na mikroorganismy a tím zajišťují účinnou konzervaci (Bursová et al., 2014).



Obrázek 3: Teorie překážek (t – teplota, a_w – snížená aktivita vody; pH – snížená hodnota pH; Eh – snížená oxidoredukční potenciál; $pres$ – konzervační látky; V – vitamíny; N – nutrienty) (Leistner a Gorris, 1995)

II PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍLE PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši zaměřenou na výskyt gramnegativních tyčinek v potravinách mléčného původu s nízkou vodní aktivitou vyrobených z kozího mléka. Práce byla zaměřená na gramnegativní tyčinky a faktory ovlivňující jejich růst.

Cílem praktické části bakalářské práce bylo identifikovat gramnegativní tyčinky izolované z testovaných vzorků potravin se sníženou vodní aktivitou. Následně u vybraných izolovaných tyčinek popsat následující vlastnosti:

- růst v závislosti na teplotě (25 °C, 30 °C a 45 °C),
- antibiotickou rezistenci,
- schopnost tvorby biofilmu.

4 MATERIÁL

4.1 Mikroorganismy

Mikroorganismy, které byly použity v bakalářské práci, byly izolovány z mléčných potravin s podílem kozího mléka se sníženou vodní aktivitou. Izolaci bakterií provedla v rámci probíhající studie Ing. Pavlína Pišová.

4.2 Pomůcky, zařízení a použité chemikálie

Přístroje a pomůcky:

- Biohazard box (Faster S.R.L, Itálie)
- Inkubátor (Memmert, Německo)
- Mikrovlnná trouba (Electrolux, Švédsko)
- Centrifuga (Eppendorf, Německo)
- Biologický termostat BT 120 (Laboratorní přístroje Praha, ČR)
- Váhy KERN 440-45N (KERN, Německo)
- Binokulární mikroskop (Olympus, Japonsko)
- Vortex Mixer (Labnet, USA)
- Vortex V-1 (Biosan, Lotyšsko)
- Termoblok Bio TDP-100 (BioSan, Lotyšsko)
- Spektrofotometr Tecan Infinite M200 PRO (Tecan, Švýcarsko)
- Aura PCR box (BioAir, Itálie)
- PCR termocykler (Aeris™, Singapur)
- Elektroforetická vana s víkem (Multi SUB, Velká Británie)
- UV transiluminátor InGenius (Syngene, Velká Británie)
- Fluorometr DeNovix QFX (DeNovix, USA)
- Denzitometr (Densi-La-Meter, ČR)
- Osobní bioreaktor RTS–1C (Biosan, Lotyšsko)

- Automatické pipety – 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, a 10 ml (Eppendorf, Německo)
- Sterilní plastové zkumavky 50 ml (TubeSPin® Bioreactor, TPP, Švýcarsko)
- 96jamkové mikrotitrační destičky s víčky (GAMA, ČR)
- Magnetická destička (SPRI Plate 384, Beckman Coulter, USA)
- Sterilní 15ml polystyrenové zkumavky se zátkou (GAMA, ČR)
- Běžné laboratorní vybavení: sterilní Petriho misky $\varnothing$ 60 mm a $\varnothing$ 90 mm, pipetovací špičky bez filtru a s filtrem různé velikosti, eppendorfové mikrozkušavky, laboratorní sklo, kahan, sterilní mikrobiologické kličky a hokejky, rukavice, pinzeta, skleněné a plastové zkumavky, stojánek na zkumavky, podložní a krycí skla, lžice, jehla

Chemikálie:

- Destilovaná voda
- Fyziologický roztok (4,3 g rozpuštěno ve 500 ml vody)
- Etanol 85% (PENTA, ČR)
- Krystalová violet (PENTA, ČR)
- Lugolův roztok (5 g jódu, 10 g jodidu draselného a 85 ml destilované vody)
- Safranin
- Imerzní olej
- Komerční izolační kit DNeasy® Blood and Tissue Kit 250 (Qiagen, Německo)
 - Obsah kitu: PBS, proteinaza K, Buffer AL, pufr W1, pufr W2, eluční pufr
- Red Taq 2x Master Mix (VWR®, USA)
- Forward primer FD1 (Metabion international AG, Německo)
- Reverse primer RD1 (Metabion international AG, Německo)
- Sterilní PCR voda
- Gel red barvivo (Biotium, USA)
- Agaróza (SeaKem® LE)

- 1x TAE pufr (Tris-acetát-EDTA)
- 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)
- SPRISelect (Beckman Coulter, USA)
- Mueller Hinton Broth (HIMEDIA, Indie)
- BHI agar (HIMEDIA, Indie)
- Agar Type I (HIMEDIA, Indie)
- Antimikrobní látky (ampicilin, amikacin, aztreonam, cefepime, ceftazidim, ciprofloxacin, doripenem, imipenem, levofloxacin, piperacilin, tikarcilin, tobramycin) (všechny HIMEDIA, Indie)

5 METODIKA

5.1 Identifikace bakterií Sangerovou metodou sekvenování

5.1.1 Kontrola čistoty kolonií

Mikrobiální kultury, které byly použity v bakalářské práci izolovala z potravin Ing. Pavlína Pišová v rámci své disertační práce. Kultury byly izolovány ze sušených dětských mlék a kaší s podílem koziho mléka.

Ke správné identifikaci a následující práci s bakteriemi bylo potřeba, aby kultury nebyly kontaminované. Bakterie byly křížovým roztěrem naočkovány na Petriho misky, kde se po 24hodinovém růstu zhodnotila jejich morfologie. Bylo důležité, aby všechny kolonie izolované křížovým roztěrem měly stejný charakteristický vzhled. Dalším krokem ke zjištění, zda jsou kultury čisté, bylo Gramovo barvení.

Vybrané kolonie byly přeneseny na podložní sklíčko, kde se nacházela kapka destilované vody a byly ponechány na vzduchu zaschnout. Následně došlo k fixaci, kdy bylo sklíčko protáhnuto plamenem kahanu. Na zafixovanou kolonii byla kápnuta krystalová violet, která byla nechána působit 60 sekund. Sklíčko bylo krátce opláchnuto destilovanou vodou. Preparát byl převrstven Lugolovým roztokem, který též působil 60 sekund. Po rychlém oplachu došlo k odbarvení acetonem, který byl na preparát aplikován po dobu 30 sekund. Následně byl preparát dobarven barvivem safraninem, který působil jednu minutu. Osušené sklíčko s preparátem bylo vloženo pod mikroskop, kde pod imerzním objektivem bylo možné vyhodnotit čistotu daných mikrobiálních kultur. Mikroorganismy zbarvené červeně byly gramnegativní, zatímco zbarvené modře byly grampozitivní.

5.1.2 Izolace DNA

DNA z testovaných bakteriálních kultur byla izolována pomocí komerčního kitu určeného pro rychlou extrakci (DNeasy Blood & Tissue Kit).

Nejprve bylo do eppendorfkové mikrozkušavky napipetováno 1,5 ml bakteriální kultury. Obsah byl následně po dobu 3 minut centrifugován (14 500 ot./min.). Supernatant byl pečlivě odstraněn tak, aby nedošlo ke ztrátě peletky. Peleta byla resuspendována ve 200 µl PBS pufru a následně bylo přidání 20 µl proteinázy K a 200 µl AL pufru. Aby došlo k důkladnému promíchání, byl obsah promíchán na vortexu a zkumavky byly vloženy do termobloku, kde došlo k inkubaci při teplotě 56 °C po dobu 10 minut.

Po inkubaci bylo ke směsi přidáno 200 µl 96% ethanolu a opět promícháno. Celý objem byl přenesen na kolonku s membránou a podroben centrifugaci (8 000 ot./min., 1 minuta). Sběrná kolonka byla vyprázdněna a vrácena pod kolonku s membránou.

Následovalo promytí kolonky 500 µl AW1 pufru, odstředění (8 000 ot./min., 1 minuta) a vylití sběrné kolonky. Poté bylo převedeno další promytí 500 µl AW2 pufru, následované odstředění (14 500 ot./min., 3 minuty) a vyprázdnění sběrné kolonky.

Kolonka byla přenesena do sterilní 1,5ml eppendorfkové mikrozkušavky a eluce DNA byla provedena přidáním 100 µl AE pufru na střed membrány, přičemž bylo dbáno na to, aby se pipetovací špička nedotkla membrány. Po 10 minutové inkubaci při pokojové teplotě byla kolonka opět odstředěna na centrifuze (8 000 ot./min., 1 minuta) a eluát obsahující DNA byl zachycen do sterilní 1,5ml mikrozkušavky.

Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200 PRO. Nejprve bylo na spektrofotometrickou destičku pipetováno 2 µl elučního pufru (blank). Po změření absorbance a následném očištění destičky etanolem bylo aplikováno 2 µl vzorku DNA. Tímto způsobem byla absorbance vzorků stanovena vůči blanku. Měření absorbance probíhalo při vlnových délkách 260 nm a 280 nm. Pro ideální čistotu platí poměr $A_{260}/a_{280} = 1,7 - 1,8$.

5.1.3 Amplifikace genu

V PCR boxu byla v 1,5ml eppendorfkové zkumavce připravena PCR směs, tzv. mastermix, který obsahoval $MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, Tween 20, Tris-HCl, dNTPs a Taq polymerázu. Celkový objem reakce byl 25 µl a při přípravě se postupovalo dle návodu výrobce. Složení směsi je shrnuto v tabulce 2.

Tabulka 2: Složení PCR směsi pro amplifikaci jednoho vzorku DNA na sekvenaci genu pro 16S rRNA

Reakční složka	Množství [µl]
Taq DNA Polymerase Master Mix	12,5
Sterilní PCR voda	10,5
Reverse primer RD1	1
Forward primer FD1	1
Templátová DNA	1

Množství jednotlivých složek potřebných pro jednu reakci bylo vynásobeno celkovým počtem vzorků, včetně rezervy a negativní kontroly, která místo templátové DNA obsahovala 1 μ l PCR vody. Tímto způsobem bylo určeno celkové množství reakční směsi i jednotlivých složek pro všechny PCR reakce. Aby nedošlo ke kontaminaci, směs byla připravována v dekontaminovaném PCR boxu.

Před rozpipetováním do jednotlivých mikrozkušavek byla směs důkladně promíchána na vortexu. Do připravených a popsanych mikrozkušavek spojených do stripů bylo pipetováno 24 μ l směsi a 1 μ l templátové DNA. Při přípravě negativní kontroly byla templátové DNA nahrazena PCR vodou. Vzorky byly následně promíchány a umístěny do PCR termocykleru. Průběh PCR je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3: Průběh PCR pro amplifikaci 16S rRNA genu

Fáze	Teplota [°C]	Čas [s]
Počáteční denaturace	95	180
Denaturace	95	30
Annealing primerů	63	30
Elongace	72	90
Závěrečná extenze	72	360
Chlazení pro PCR	4	neomezeně

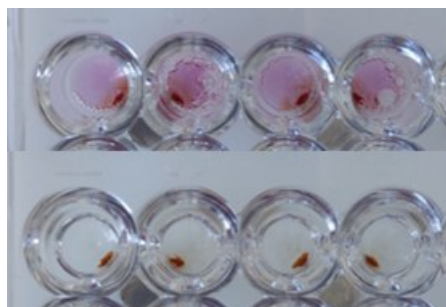
5.1.4 Vizualizace DNA

Vizualizace amplifikované DNA z předešlého kroku byla provedena pomocí agarózové elektroforézy. Pro detekci bylo potřeba připravit 1,5% (w/v) gel. Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 3,75 g agarózy, která byla rozpuštěna zalitím 250 ml 1x koncentrovaného TAE pufru. Po úplném rozvaření v mikrovlnné troubě bylo do rozpuštěné agarózy přidáno 5 kapek Gel Red barviva. Po promíchání byl roztok vylit do předem připravené nádoby s hřebínkem. Bylo důležité, aby byl gel bez bublin.

Po zatuhnutí při pokojové teplotě byl hřebínek opatrně vyjmut a gel byl vložen do elektroforetické vany naplněné 1x TAE pufrem tak, aby byl gel ponořen. Do první a poslední jamky gelu byly napipetovány 3 μ l hmotnostního standardu (100 bp DNA Ladder), následně bylo do dalších jamek pipetováno 5 μ l vzorku včetně negativní kontroly. Po uzavření víkem byla vana připojena k stejnosměrnému proudu. Separace probíhala pod napětím 90 V po dobu 45 minut. Produkty elektroforézy byly vizualizovány pomocí transiluminátoru InGenius a počítače se softwarem GeneSnap.

5.1.5 Purifikace

Získaná DNA z předchozích kroků byla purifikována pomocí kitu na bázi magnetických kuliček (SPRIselect Bead-Based Reagent.). Do plastového stojánku bylo pipetováno 20 μ l vzorku, ke kterému přidáno 16 μ l roztoku SPRIselect. Suspenze byla důkladně promíchána automatickou pipetou. Stojánek byl umístěn na magnetickou destičku, kde se magnetické kuličky s navázanou DNA usadily v blízkosti magnetu (obr.4). Po usazení částic s navázanou DNA byl supernatant odstraněn tak, aby nedošlo k odstranění magnetických kuliček. Následně byl do jamek pipetován 85% etanol o objemu 180 μ l. Destička byla vložena do termobloku (65 °C, 5 minut), kde došlo k odpaření etanolu. Aby došlo k eluci DNA, bylo do jamek destičky pipetováno 30 μ l PCR vody a destička byla znovu umístěna na magnetickou destičku po dobu, dokud kapalina uvnitř jamek nebyla zcela vyčerpána. Čirý roztok s DNA byl pipetován do čistých sterilních mikrozkušavek.



Obrázek 4: Průběh purifikace DNA (horní řada – vzorek s roztokem SPRIselect, dolní řada – vzorek s PCR vodou)

Opět byla zkontrolována koncentrace a čistota vzorku pomocí fluorometru DeNovix. Nejprve byl připraven pracovní roztok přidáním 10 μ l fluorescenční barvy do 1 ml pufru. Pro každý vzorek bylo zapotřebí 190 μ l této směsi, na základě čehož bylo vypočítáno celkové množství potřebného roztoku. Ke 190 μ l pufru byly následně přidány 2 μ l purifikované DNA. Před měřením ve fluorometru byla výsledná směs důkladně promíchána pomocí vortexu.

5.1.6 Identifikace izolovaných mikroorganismů sekvenací produktů PCR

Purifikované vzorky byly důkladně popsány a odeslány na sekvenaci do společnosti SEQme s. r. o. Výsledky byly dodány v elektronické podobě v souboru fasta. Získané sekvence byly vyhodnoceny pomocí programu DNA Baser Assembler, kde bylo možné upravovat nukleotidovou sekvenci. Vzorky byly porovnány s mezinárodní databází sekvencí U.S. National Library of Medicine dle algoritmu BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool).

5.2 Sledování růstu gramnegativních tyčinek

U vybraných kmenů bakterií byl sledován růst v závislosti na teplotě. Byly zvoleny tři teploty – 20 °C (simulace pokojové teploty), 30 °C (předpokládaná optimální teplot) a 45 °C (pro zajištění případné termorezistence izolátů).

Vybrané kmeny byly přeočkovány do BHI bujónu, kde došlo k pomnožení buněk při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Za aseptických podmínek byla připravena suspenze buněk overnight kultury ve fyziologickém roztoku odpovídající hodnotě 0,5 podle McFarlandovy stupnice. Odpovídající hodnota byla ověřena pomocí denzitometru.

Do sterilní centrifugační zkumavky byl přidán nutrient bujon o objemu 30 ml, která byl inokulován 50 µl výše uvedené bakteriální suspenze. Zkumavka byla uzavřena víček s membránovým filtrem propustným pro plyny. Následně byly zkumavky umístěny do bioreaktoru RTS-1C, kde byl v programu RTS-1 nastaven kultivační proces a zahájena 48 hodinová kultivace. Parametry kultivace jsou popsány v tabulce 4.

Tabulka 4: Parametry kultivace testovaných izolátů v bioreaktoru RTS-1

Parametry	
Intervaly měření (min)	30
Počet otáček za minut (ot/min ⁻¹)	2000
Teploty kultivace (°C)	20/30/45
Celkový objem média	30
Frekvence reverzních otáček	1

Přístroj kontinuálně měřil optickou hustotu (OD) bakteriální suspenze během kultivace ve stanovených časových intervalech při vlnové délce 850 nm. Na základě získaných dat byla sestavena růstová křivka. Růst mikroorganismů byl při každé teplotě testován ve dvou opakováních.

5.3 Stanovení antibiotické rezistence diskovou difúzní metodou

Disková difúzní metoda je jedním z několika fenotypových testů, které lze použít k určení antimikrobiální rezistence. Stanovení rezistence bylo provedeno dle organizace EUCAST (European Committee on antimicrobial susceptibility testing). Přehled použitých antibiotik s jejich koncentrací, zkratkou a testovaného rodu se nachází v tabulce 5.

Tabulka 5: Použitá antibiotika pro testování rezistence

Antibiotikum	Zkratka	Koncentrace [μg]	Testovaná čeleď
Amikacin	AK	30	<i>Moraxellaceae</i>
Ampicilin	AMP	25	<i>Enterobacteriaceae</i>
Aztreonam	ATM	30	<i>Enterobacteriaceae</i>
Cefepime	FEP	30	<i>Enterobacteriaceae, Moraxellaceae</i>
Ceftazidim	CAZ	10	<i>Enterobacteriaceae, Moraxellaceae</i>
Ciprofloxacin	CIP	5	<i>Enterobacteriaceae, Moraxellaceae</i>
Doripenem	DOR	10	<i>Moraxellaceae</i>
Imipenem	IPM	10	<i>Enterobacteriaceae, Moraxellaceae</i>
Levofloxacin	LE	5	<i>Enterobacteriaceae, Moraxellaceae</i>
Piper-tazobaktam	PIT	10	<i>Enterobacteriaceae, Moraxellaceae</i>
Tikarcilin	TI	75	<i>Moraxellaceae</i>
Tobramycin	TOB	10	<i>Enterobacteriaceae, Moraxellaceae</i>

Pomnožené mikroorganismy v nutrient bujonu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin byly zředěny ve fyziologickém roztoku tak, aby byla získána bakteriální suspenze o zákalu 0,5 McFarland.

Na plotnu s Mueller Hinton agarem bylo naočkováno 200 μl naředěné suspenze buněk. Inokulum bylo pomocí skleněné hokejky rozprostřeno krouživými pohyby tak, aby bylo rovnoměrně rozmístěno po celém jejím povrchu. Papírové disky o průměru 0,6 cm napuštěné antibiotiky byly na povrch média pokládány sterilní jehlou. Misky byly kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 24 ± 2 hodin.

Po kultivaci byly měřeny průměry inhibičních zón vytvořené v okolí antibiotického disku. Citlivost mikroorganismů vůči různým antibiotikům byla vyhodnocena dle referenčních limitních hodnot stanovených organizací EUCAST pro *Enterobacteriaceae* nebo *Acinetobacter* spp. (EUCAST, 2024). Zóny antibiotika tikarcilinu byly vyhodnoceny dle hraničních hodnot pro *Pseudomonas* spp. dle metodiky EUCAST z roku 2022. Zóny antibiotika ceftazidimu byly vyhodnoceny dle hraničních hodnot pro *Pseudomonas* spp. dle metodiky EUCAST z roku 2023.

5.4 Stanovení schopnosti tvorby biofilmu Christensenovou metodou

Biofilm je společenství, na kterém se podílejí mikroorganismy a jimi produkované biotické látky. Mikrobiální biofilmová společenství jsou problémem i v potravinářském průmyslu, kde patogenní mikroorganismy uvolněné z biofilmové struktury mohou způsobovat

kontaminace potravin nebo surovin. Problémem je také jejich zvýšená resistance vůči sanitačním a dezinfekčním prostředkům (Schlegelová a Karpíšková, 2007).

Po stanovení schopnosti tvorby biofilmu byla zvolena Christensenova metoda, kde se tvorba biofilmu zkoumala v mikrotitrační destičce.

V rámci metody byla nejprve provedena kultivace mikroorganismů v BHI bujonu při 37 °C po dobu 24 hodin. Následně bylo do jamek sterilní 96jamkové mikrotitrační destičky pipetováno 200 µl BHI bujonu a 10 µl narostlé bakteriální suspenze, která byla připravena tak, aby odpovídala zákalu o hodnotě 1,0 McFarlandovy stupnice.

Každý mikroorganismus byl testován ve třech opakováních. Současně s testovanými vzorky byla připravena negativní kontrola, která obsahovala pouze bujon bez bakteriální kultury. Destička byla inkubována při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Po inkubaci byl obsah jamek odstraněn a jamky byly dvakrát promyty destilovanou vodou. Biofilm byl následně fixován 200 µl 96% etanolu. Poté byly vzorky obarveny 200 µl krystalové violeti. Destička byla ponechána 20 minut při pokojové teplotě. Přebytný barvicí roztok byl vylit a jamky několikrát promyty destilovanou vodou. Po posledním promytí byla krystalová violet rozpuštěna v 200 µl 96% etanolu. Absorbance byla následně měřena spektrofotometrem Tecan Infinite M200 PRO při vlnové délce 595 nm. BHI bujon byl použit jako blank (Pleva et al., 2022)

Následně byla určena hraniční hodnota (OD_c), definovaná jako součet průměrně hodnoty OD u negativních kontrol a trojnásobku směrodatné odchylky (SD). Na základně porovnání naměřených hodnot OD s vypočtenou hraniční hodnotou byly výsledky rozděleny do tří kategorií: (Stepanović et al., 2007)

- Kmen netvořící biofilm: $OD \leq OD_c$
- Kmen slabě tvořící biofilm: $OD_c < OD \leq 2 OD_c$
- Kmen silně tvořící biofilm: $OD > 2 OD_c$

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Identifikace bakterií metodou sekvenování genu pro 16 rRNA

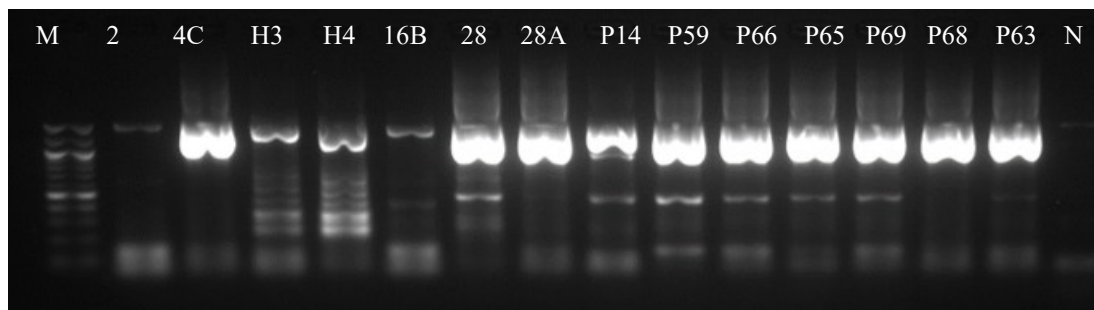
Izolované bakteriální kmeny byly identifikovány s použitím sekvenace genu pro 16S rRNA. Mezi důležitý krok patří ověření čistoty a koncentrace izolované DNA, která byla dále amplifikována pomocí PCR.

Tabulka 6: Koncentrace a čistota DNA izolované z testovaných kmenů bakterií

Izolát	Koncentrace [ng/μl]	Čistota	Izolát	Koncentrace [ng/μl]	Čistota
P14	33,7	1,93	H3	29,5	1,88
P58	12,03	2,02	H4	26,1	1,91
P59	14,8	1,97	28	12,2	1,88
P63	17,3	1,89	28A	12,6	1,88
P65	2,8	2,02	4C	11	2,08
P66	49,2	1,97	16B	10,6	1,93
P68	25	1,87	2	12,11	1,55

Z tabulky 6 vyplývá, že izolace DNA byla téměř u všech vzorků úspěšná, jelikož čistota vzorků odpovídala hodnotám nad 1,8. Pouze vzorek 2 disponoval menší čistotou o hodnotě 1,55; to mohlo být způsobeno přítomností proteinů.

Pro posouzení čistoty DNA se používá poměr absorbance při 260 a 280 nm. Poměr 1,8 je obecně akceptován jako čistá DNA. Pokud je poměr znatelně nižší ($\leq 1,6$), může to znamenat přítomnost proteinů nebo jiných kontaminantů (Lucena-Aguilar et al., 2016).



Obrázek 5: Výsledek elektroforézy s amplifikovaným genem pro 16S rRNA

Legenda: M – marker velikosti fragmentů, Číslo 2 - P63 – označení izolátu; N – negativní kontrola

Po amplifikaci genu *in vitro* byla provedena vizualizace pomocí gelové elektroforézy. Z obrázku 5 je patrné, že amplifikace genu byla úspěšná u všech vzorků kromě vzorku 2 a 16B. U vzorku 2 ani opakovaná PCR nevedla k amplifikaci. Ostatní vzorky byly porovnány s markerem (M), kde očekávaná velikost produktu byla okolo 1500bp. Negativní kontrola (N) neobsahovala žádné produkty, což potvrzuje dodržení aseptických podmínek. Následovala purifikace získaného produktu a následně byla znovu stanovena koncentrace a čistota získané DNA. Amplifikovaná DNA měla dostatečnou koncentraci a čistotu a byla následně odeslána k sekvenaci do firmy SEQme s. r. o

V tabulce 7 jsou zaznamenány výsledky hodnoty shody v procentech s identifikovanými bakteriální kmeny dle Sangerova sekvenování.

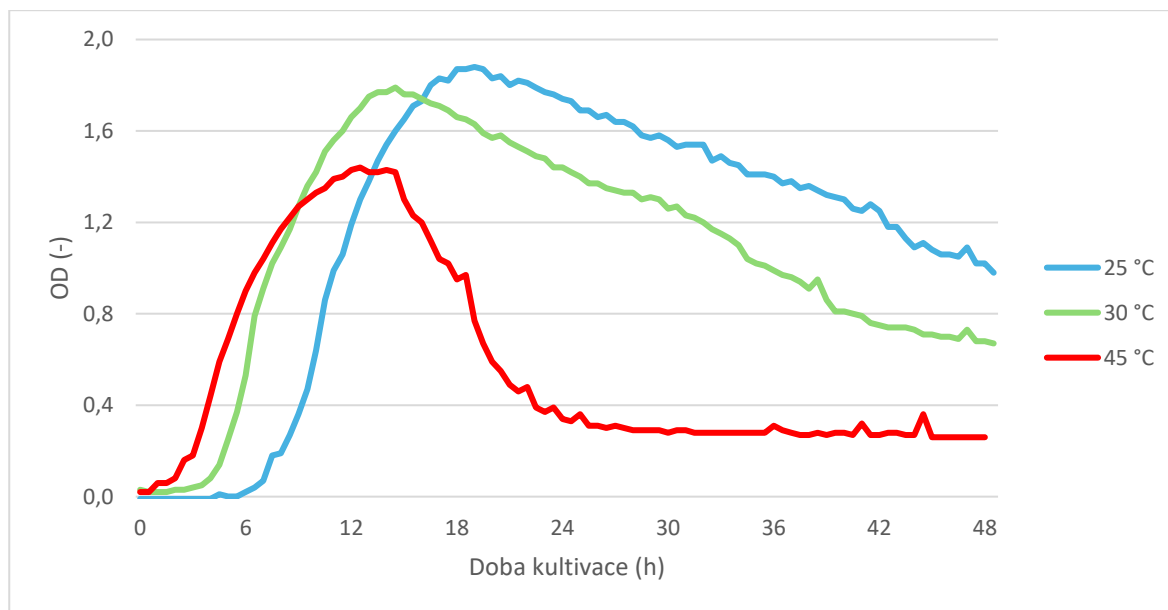
Tabulka 7: Výsledky identifikace bakterií sekvenací genů pro 16S rRNA

Testované bakterie	Identifikovaný mikroorganismus	Shoda (%)
P14	<i>Cronobacter sakazakii</i>	99,39
P58	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	91,62
P59	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99,53
P63	<i>Acinetobacter baumannii</i>	98,02
P65	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99,47
P66	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99,56
P68	<i>Bacillus subtilis</i>	99,85
H3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,03
H4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,24
28	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	98,21
28A	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	97,40
4C	<i>Bacillus stratosphericus</i>	99,63
16B	<i>Enterobacter sp.</i>	99,67

Z celkových 13 izolátů bylo identifikováno 11 bakterií jako gramnegativních. Dvě bakterie byly identifikovány jako grampozitivní (*Bacillus subtilis* a *Bacillus stratosphericus*), a proto s nimi nebylo dále pracováno. Většina izolátů dosáhla shody vyšší než 99 %, což naznačuje velmi vysokou pravděpodobnost správné identifikace.

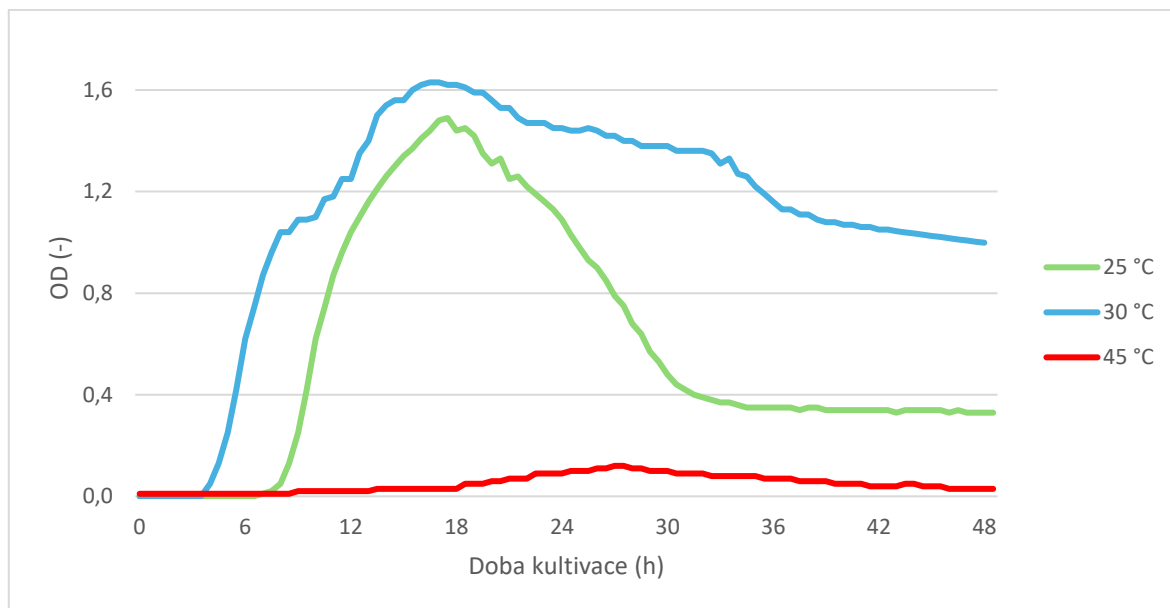
6.2 Růst kmenů při různých teplotách

Růst bakteriálních kultur byl vyhodnocen na základě měření optické hustoty (OD_{850}) v závislosti na čase, přičemž z naměřených dat byly sestaveny růstové křivky. Na obrázcích jsou znázorněny růstové křivky jednotlivých testovaných bakteriálních kmenů, které byly kultivovány při teplotách 25 °C, 30 °C a 45 °C.



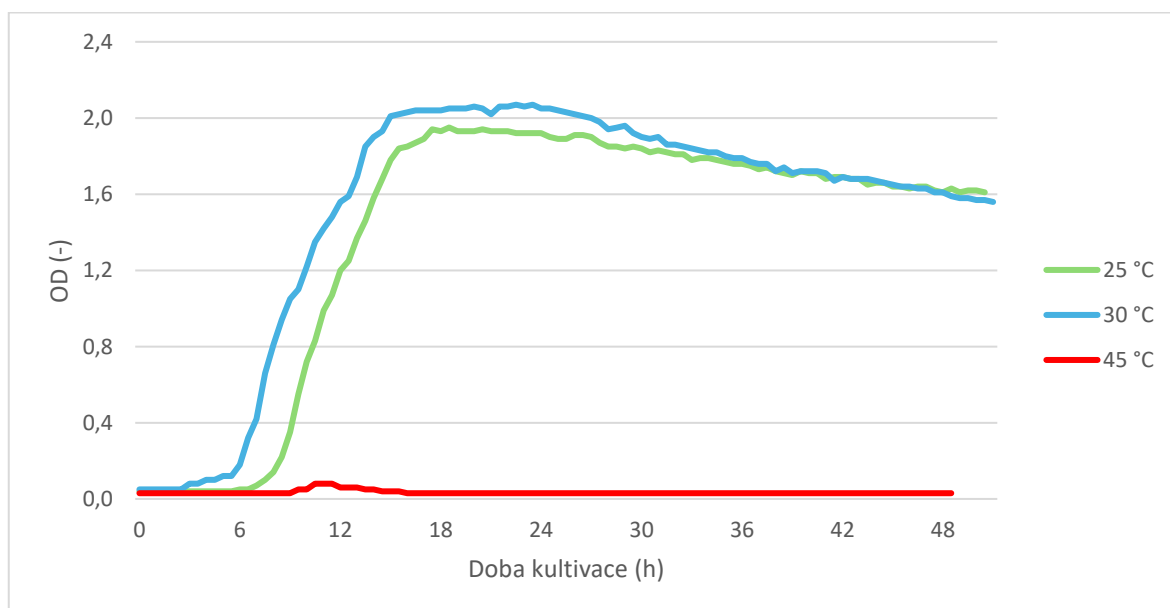
Obrázek 6: Růst *Cronobacter sakazakii* P14 při různých teplotách

Na obrázku 6 je znázorněn průběh růstové křivky *Cronobacter sakazakii* při různých teplotách. Nejkratší fáze byla zaznamenána při 45 °C a trvala přibližně 3 hodiny. Následovala strmá log fáze, která dosáhla vrcholu kolem 12. hodiny kultivace, kde hodnota optické denzity (OD) měla hodnotu 1,40. Po krátké stacionární fázi došlo po 16. hodině kultivace k postupnému odumírání buněk. Při 30 °C trvala lag fáze zhruba 4 hodiny, přičemž exponenciální fáze začala po 5 hodinách kultivace a vrcholu dosáhla v 16. hodině při OD 1,8. Opět následovala krátká stacionární fáze, po které následoval pokles počtu živých buněk. Naopak nejdelší úvodní fáze byla pozorována při 25 °C, která trvala přibližně 6 hodin, kde exponenciální růst následoval až po 6. hodině a vrcholu dosáhl kolem 20. hodiny kultivace, přičemž hodnota OD byla 1,8. Celkově je z grafu patrné, že při teplotách 20 °C a 30 °C má bakterie podobný růst, zatímco při 45 °C byl nejrychlejší, ale trval nejkratší dobu a buňky dosáhly nejmenší hustoty.

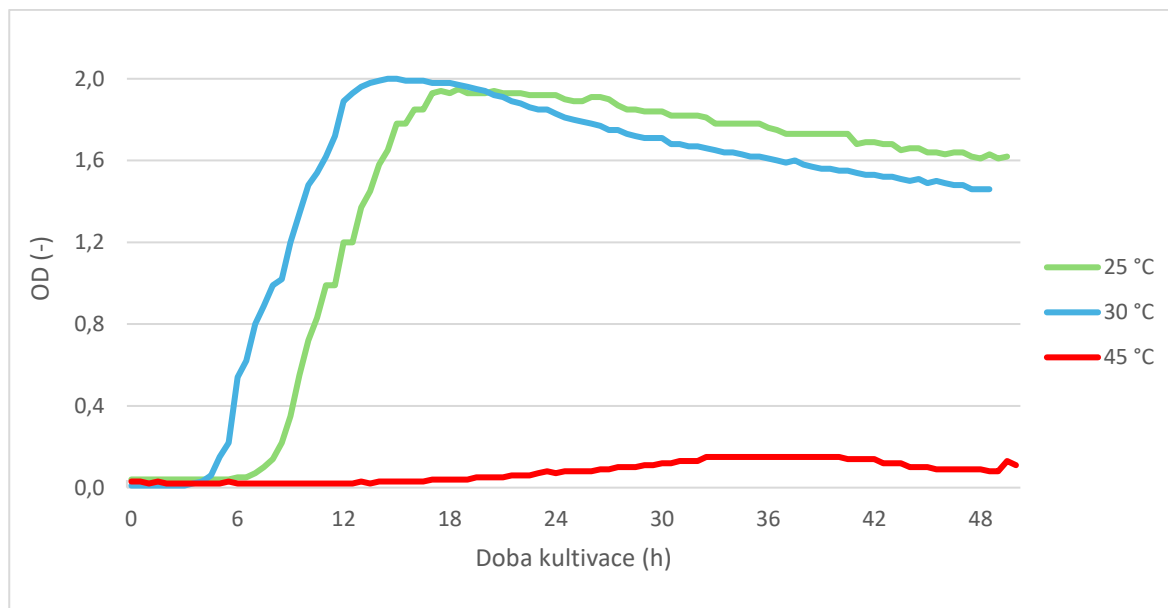


Obrázek 7: Růst *Acinetobacter nosocomialis* P58 při různých teplotách

Na obrázku 7 je znázorněn průběh růstové křivky bakterie *Acinetobacter nosocomialis* a na první pohled je patrné, že nejlepší růst nastal při teplotě 30 °C, kde lag fáze trvala přibližně 5 hodin a poté nastala exponenciální fáze, která trvala do 18. hodiny kultivace výsledná OD byla přes 1,6. Následně od 20. hodiny docházelo k úmrtí buněk. Nejstrmější exponenciální fáze se projevila při kultivaci při teplotě 25 °C, kde exponenciální fáze nastala po 6. hodině kultivace a skončila kolem 16. hodiny, kdy se OD rovnalo 1,5. Po 18. hodině kultivace došlo k fázi úmrtí buněk. Při teplotě 45 °C není pozorován růst.

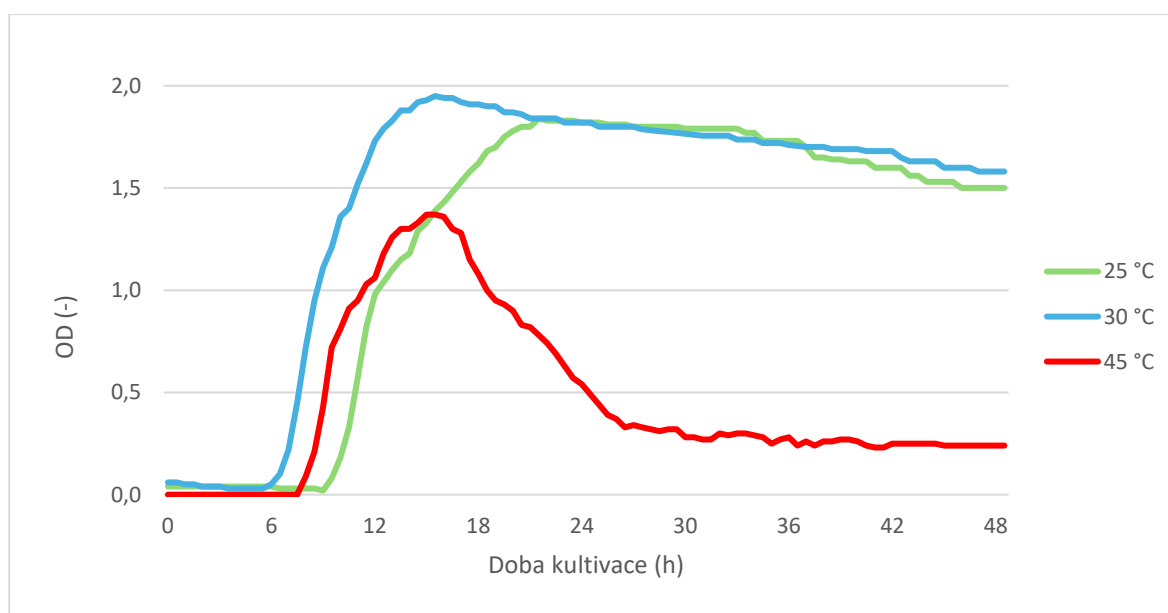


Obrázek 8: Růst *Acinetobacter nosocomialis* P59 při různých teplotách



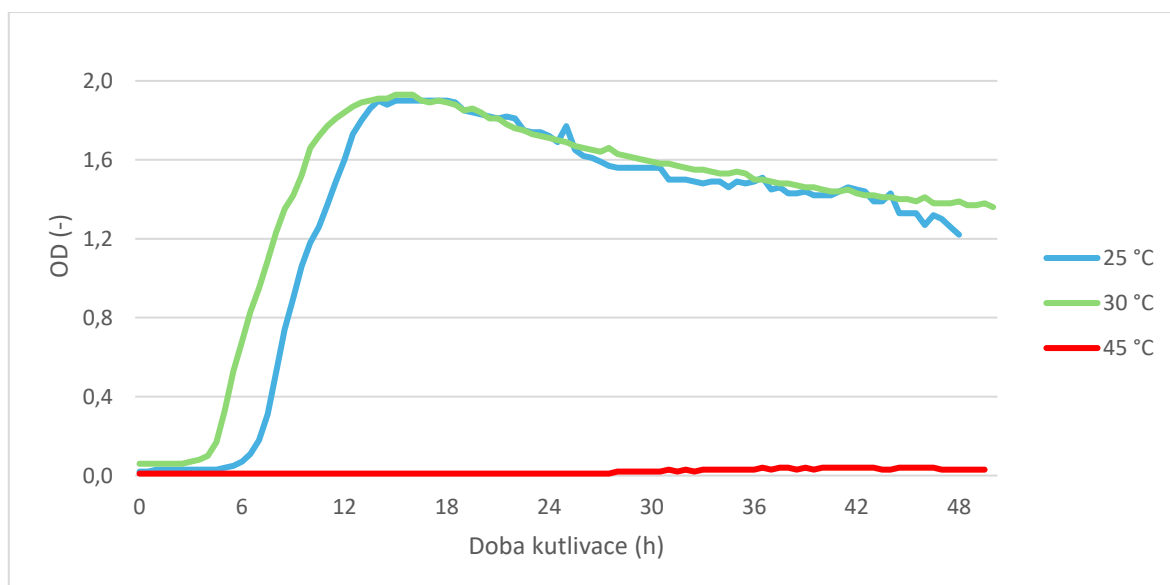
Obrázek 9: Růst *Acinetobacter nosocomialis* P65 při různých teplotách

Obrázky 8 a 9 též zaznamenávají růst bakterie *Acinetobacter nosocomialis*. U obou kmenů lze vidět lepší růst při teplotě 30 °C, kde lag fáze trvala nejkratší dobu a to přibližně 5 hodin. Následně nastal strmý exponenciální růst, který trval asi 6 hodin a výsledná OD u obou kmenů se po 12 hodinách rovnala 2,0. U izolátu P59 trvala stacionární fáze asi 8 hodin, zatímco u izolátu P65 trvala stejná fáze jen 6 hodin. U teploty 25 °C docházelo k obdobnému růstu jako při teplotě 30 °C, ale lag fáze trvala delší čas a to přibližně 7 hodin. Po strmé exponenciální fázi, kde se OD rovnalo 1,8, došlo k fázi úmrtí buněk, která trvala až do konce kultivace. Při teplotě 45 °C nedošlo k téměř žádnému růstu ani u jednoho z kmenů.



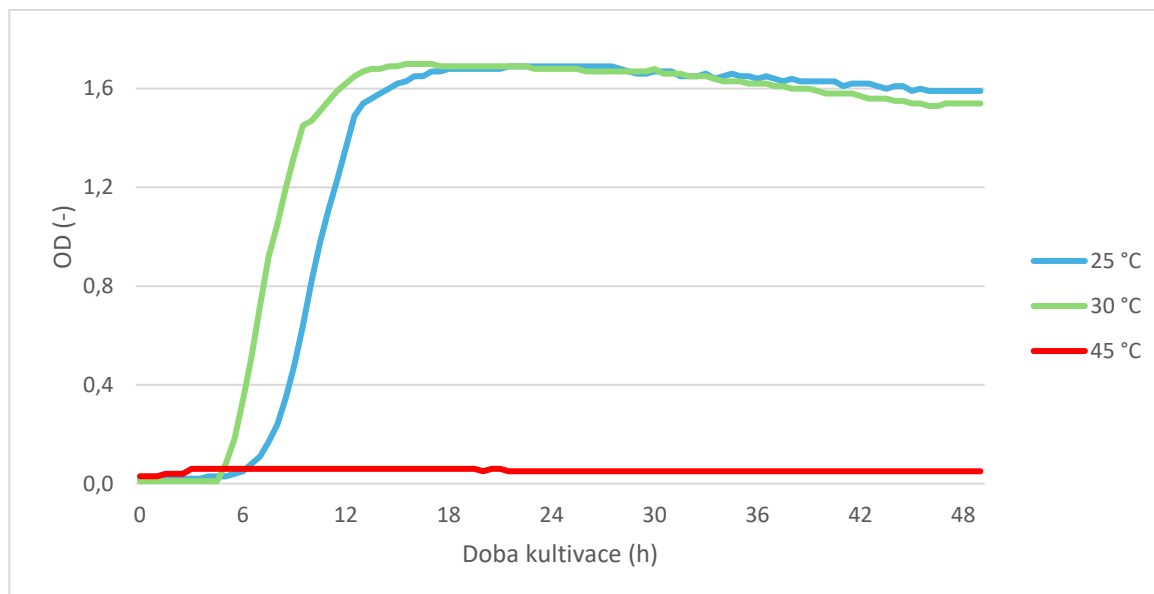
Obrázek 10: Růst *Acinetobacter nosocomialis* P66 při různých teplotách

Na obrázku 10 je znázorněn růst kmene *Acinetobacter nosocomialis* P66 sledovaný při tech různých teplotách: 25 °C, 30 °C a 45 °C po dobu 48 hodin. Při 30 °C mikroorganismus vykazoval nejrychlejší nástup růstu a dosáhl nejvyšší maximální OD (2,0), která odpovídá nejvyšší biomase. Po dosažení této hodnoty se růst stabilizoval ve stacionární fázi, což naznačuje, že šlo o optimální teplotu pro růst daného organismu. Naopak při 25 °C byl růst pomalejší, maximální OD byla nižší (1,6) a stacionární fáze nastala později. To značí, že nižší teplota růst zpomalila, ale mikroorganismu byl schopen růst bez výrazných problémů. Nejvýraznější rozdíl byl pozorován při 45 °C. Ačkoliv růst začal poměrně rychle, OD dosáhla nižší hodnoty (1,3) a následně prudce klesla. To může indikovat buněčný stres a úhyn buněk nebo autolýzu, kdy došlo k narušení buněčných struktur vysoké teploty.

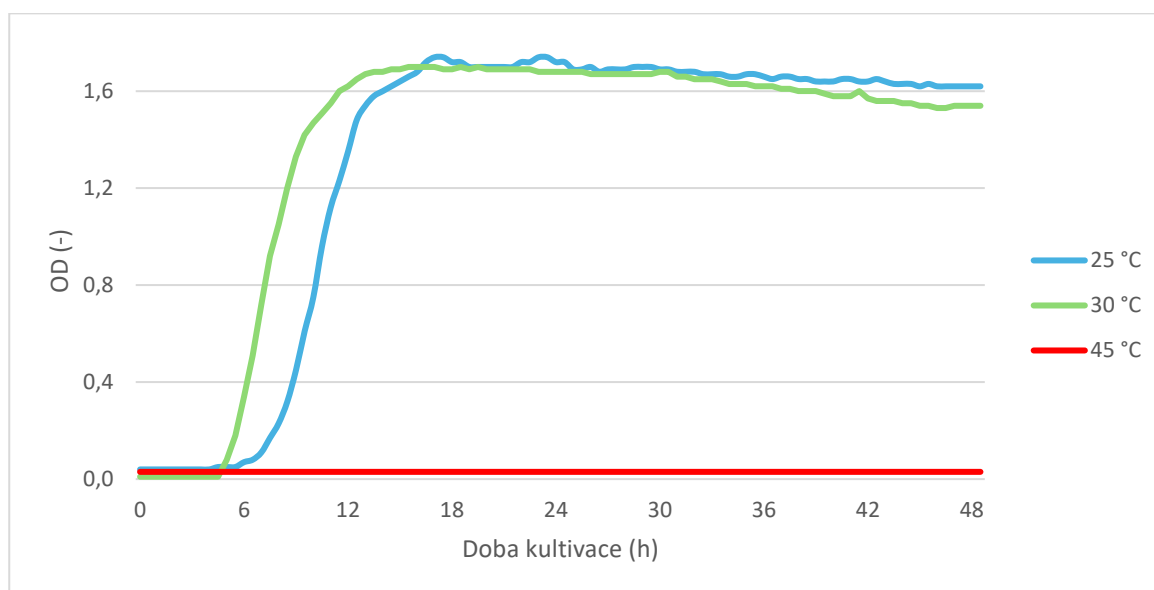


Obrázek 11: Růst *Acinetobacter baumannii* P63 při různých teplotách

Acinetobacter baumannii P63 (obr. 11) měl při teplotě 25 °C pomalejší nástup růstu (lag fáze trvající přibližně do 6. hodiny). Následovala exponenciální fáze s prudkým nárůstem OD do přibližně 13. hodiny, kdy OD dosáhla maxima, a to 1,9. Poté nastoupila stacionární fáze a postupně fáze úhynu, kdy OD pozvolna klesala. Růst při 30 °C byl výrazně rychlejší. Lag fáze byla kratší a exponenciální růst začal již kolem 4. hodiny. Maximální OD bylo dosaženo kolem 10. hodiny a jeho hodnota byla 1,9. Následná stacionární fáze byla o něco delší pro růst dané bakteriální kultury. Ale jak z obrázku vyplývá, růstové křivky při těchto teplotách mají podobný průběh. Při teplotě 45 °C nebyl zaznamenán žádný významný růst. OD zůstávala po celou dobu kultivace téměř neměnná a blízká nule. To svědčí o tom, že tato teplota je pro daný mikroorganismus inhibiční nebo letální.

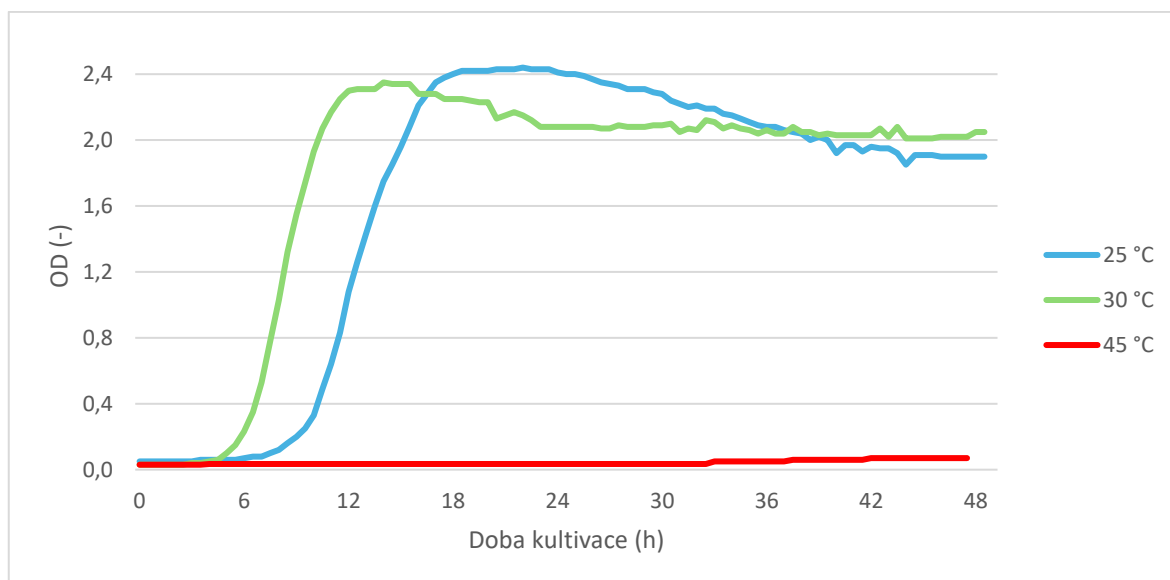
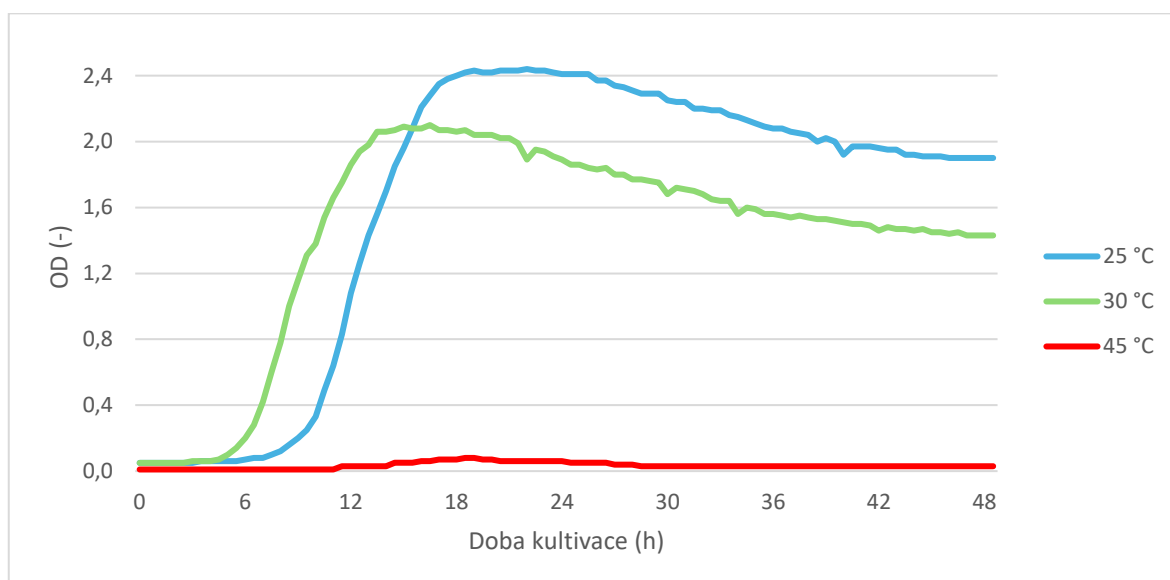


Obrázek 12: Růst *Acinetobacter radioresistens* 28 při různých teplotách



Obrázek 13: Růst *Acinetobacter radioresistens* 28A při různých teplotách

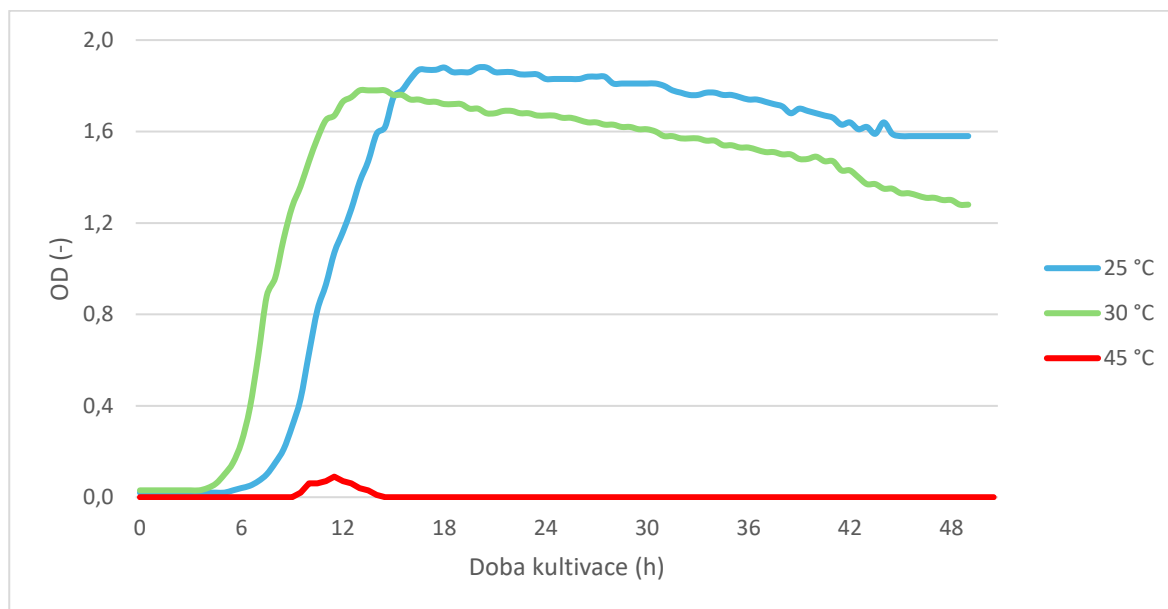
Na obrázcích 12 a 13 lze pozorovat růst kmenů *Acinetobacter radioresistens* 28 a 28A. Výsledky ukázaly, že oba kmeny mají velmi podobné růstové chování. Nejvýraznější a nejrychlejší růst nastal při teplotě 30 °C. Lag fáze trvala přibližně 5 hodin a následovala exponenciální fáze, kdy bakterie dosáhly maximální OD přibližně 1,7 během prvních 10 hodin kultivace. Růst při 25 °C byl mírně pomalejší, lag fáze trvala asi 6 hodin a od této hodiny nastal strmý růst a konečné hodnoty OD byly téměř totožné s těmi při 30 °C, což byla hodnota 1,7. Po dosažení hodnoty OD došlo ke stabilizaci růstu a OD mírně klesalo až do 30. hodiny kultivace. Naopak při teplotě 45 °C se u žádného z kmenů neprojevil prakticky žádný růst.

Obrázek 14: Růst *Pseudomonas aeruginosa* H3 při různých teplotáchObrázek 15: Růst *Pseudomonas aeruginosa* H4 při různých teplotách

Růstové křivky bakterií *Pseudomonas aeruginosa* byly sledovány při těchto různých teplotách: 25 °C, 30 °C a 45 °C. Výsledky jsou zobrazeny na obrázcích 14 a 15.

Při teplotě 25 °C byla pozorována lag fáze přibližně do 6 hodin kultivace, po které následovala rychlá exponenciální fáze. Maximální optická hustota (OD) dosáhla kolem 2,4, přičemž stacionární fáze nastala přibližně mezi 12–30 hodinami. Po této době docházelo k pozvolnému poklesu OD, což značí přechod do fáze úhynu buněk. Při 30 °C začal růst dříve, lag fáze byla velmi krátká, trvala přibližně do 3. hodiny kultivace. Exponenciální fáze byla velmi strmá a maximální OD bylo dosaženo již kolem 10–12 hodin, a to na hodnotě přibližně 2,1. Stacionární fáze byla patrná, následovala mírným poklesem optické hustoty.

I když maximální OD bylo nižší než při 25 °C, bakteriální kultura dosáhla téhle hodnoty rychleji, což svědčí o rychlejším růstu při teplotě 30 °C. Naopak při 45 °C nebyl téměř žádný růst pozorován. OD zůstávala po celou dobu kultivace nízká (pod 0,2), což naznačuje, že tato teplota je pro růst bakterií nevhodná.



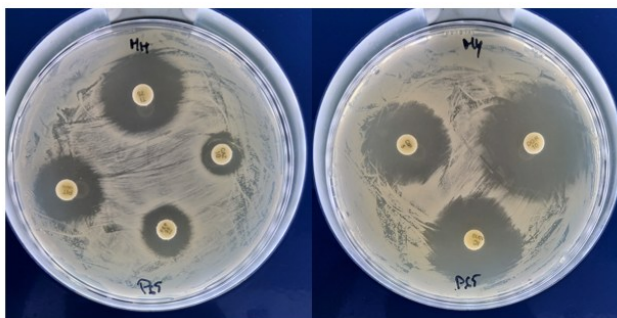
Obrázek 16: Růst *Enterobacter* sp. 16B při různých teplotách

Růst *Enterobacter* sp. 16B je znázorněn na obrázku 16. Optimálních růstových parametrů bylo dosaženo při teplotě 25 °C, kdy kultivace vedla k nejvyšší dosažené hodnotě optické denzity a zároveň k dlouhodobě stabilní stacionární fázi. Lag fáze trvala přibližně 6 hodin, po které následoval strmý růst mezi 6. a 12. hodinou kultivace s výsledným OD 1,9. Od 14. hodiny do konce kultivace se křivka ustaluje (stacionární fáze) a později dochází k mírnému poklesu. Při 30 °C byl sice pozorován rychlejší nástup růstu (lag fáze trvala pouze 5 hodin), nicméně maximální optická denzita byla nižší (1,7) a následně došlo k pozvolnému poklesu buněčné hustoty, což může poukazovat na částečné stresové působení této teploty nebo urychlené stárnutí buněk. Kultivace při 45 °C byla neúspěšná, jelikož nedošlo k významnému množení buněk, což naznačuje, že tato teplota překračuje teplotní toleranci daného mikroorganismu.

6.3 Antibiotická rezistence testovaných kmenů

Cílem bylo zjistit citlivost izolátů k daným antibiotikům. Pro testování rezistence izolovaných gramnegativních tyčinek byla použita standardizovaná difuzní disková metoda dle EUCAST (2024). Postup metody a použitá antibiotika jsou popsána v kapitole 5.3.

Hodnocení probíhalo na základě průměru inhibičních zón (obr. 17). Hodnoty byly porovnány s limitními hodnotami stanovenými metodikou dle referenčních limitních hodnot stanovených organizací EUCAST pro čeleď *Enterobacteriaceae* nebo *Acinetobacter* spp. (EUCAST, 2024). Zóny antibiotika tikarcilinu byly vyhodnoceny dle hraničních hodnot pro *Pseudomonas* spp. dle metodiky (EUCAST, 2022). Zóny antibiotika ceftazidimu byly vyhodnoceny dle hraničních hodnot pro *Pseudomonas* spp. dle metodiky (EUCAST, 2023).



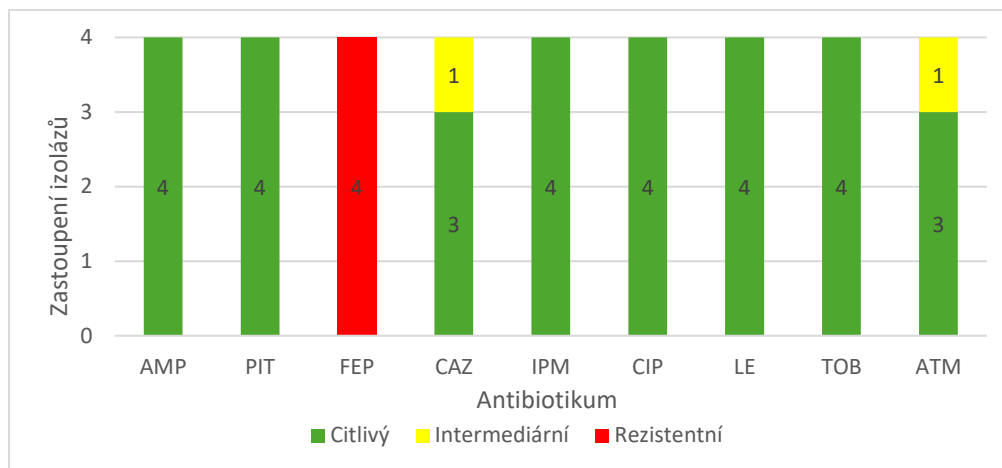
Obrázek 17: Výsledky diskové difuzní metody pro *Acinetobacter nosocomialis* P65

V tabulkách 8 a 9 jsou zelenou barvou označeny bakteriální kmeny citlivé (S) k danému antibiotiku, žlutou barvu kmeny vykazují citlivost při zvýšené expozici (I) a červenou barvou kmeny, které vykazovaly rezistenci (R) pro dané antibiotikum. Výsledky jsou pro lepší představu zaznamenány i na obrázcích 18 a 19.

Tabulka 8: Hodnocení antibiotické rezistence kmenů z čeledi *Enterobacteriaceae*

Antibiotikum	Průměr inhibiční zóny [mm] (disky 6 mm)			
	P14	H3	H4	16B
Ampicilin	25	20	21	21
Piper-tazobaktam	27	25	23	23
Cefepim	24	21	20	20
Ceftazidim	26	23	22	22
Imipenem	34	36	35	35
Ciproflaxacin	36	35	34	34
Levoflaxacin	35	31	32	32
Tobramycin	21	23	26	26
Aztreonam	25	28	26	26

Legenda: P14 = *Cronobacter sakazakii*, H3, H4 = *Pseudoesherichia vulneris*, 16B = *Enterobacter* spp.



Obrázek 18: Zastoupení citlivých, intermediárních a rezistentních izolátů z čeledi *Enterobacteriaceae*

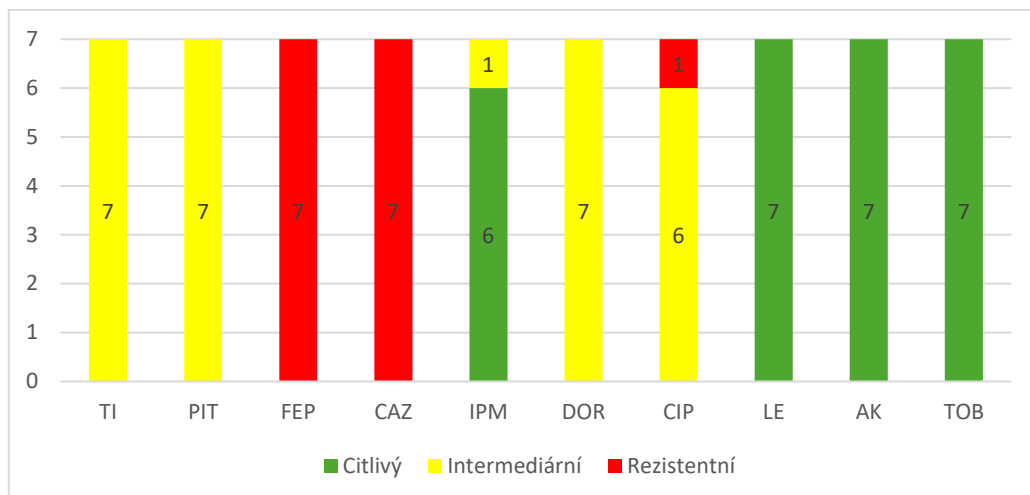
Legenda: AMP = ampicilin, PIT= piper-tazobaktam, FEP = cefepim, CAZ = ceftazidim, IPM = imipenem, CIP = ciproflaxacin, LE = levoflaxacin, TOB = tobramycin, ATM = aztreonam

Výsledky ukázaly značnou rezistenci k cefalosporinovým antibiotikům, a to hlavně k antibiotiku cefepimu, kde 4 ze 4 vyšetřovaných kmenů byly vůči antibiotiku rezistentní. Mezi další antibiotikum řadící se mezi cefalosporinové antibiotika patří ceftazidim, na které jsou všechny, kromě jednoho kmenu citlivé. U monobaktamových antibiotik byl zaznamenán jeden kmen jako intermediární. Jinak u zbylých skupin antibiotik (peniciliny, karbapenemy, fluorochinolony a aminoglykosidy) byla pozorována citlivost u všech 4 testovaných kmenů.

Tabulka 9: Hodnocení antibiotické rezistence kmenů rodu *Acinetobacter*

Antibiotikum	Průměr inhibiční zóny [mm] (disky 6 mm)						
	P58	P59	P65	P66	P63	28	28A
Ticarcilin	24	25	25	25	25	27	21
Piper-tazobaktam	19	23	20	19	21	26	22
Cefepim	16	16	15	16	16	20	21
Ceftazidim	14	11	12	13	14	15	15
Imipenem	26	30	31	26	29	29	22
Doripenem	34	35	34	32	33	32	29
Ciproflaxacin	27	25	25	24	26	27	22
Levoflaxacin	26	27	25	26	27	32	25
Amikacin	22	21	21	20	20	25	24
Tobramycin	23	19	22	21	20	24	23

Legenda: P58, P59, P65, P66 = *Acinetobacter nosocomialis*; P63 = *Acinetobacter baumannii*; 28, 28A = *Acinetobacter radioresistens*



Obrázek 19: Zastoupení citlivých, intermediárních a rezistentních izolátů rodu *Acinetobacter*

Legenda: TI = titraciklin, PIT= piper-tazobaktam, FEP = cefepim, CAZ = ceftazidim, IPM = imipenem, DOR = doripenem, CIP = ciproflaxacin, LE = levoflaxacin, AK= amikacin, TOB = tobramycin

Další výsledky též naznačují rezistenci vůči cefalosporinovým antiblokům. Ze 7 vyšetřovaných kmenů bylo vůči cefalosporinovým antibiotikům cefepimu a ceftazidimu rezistentních všech 7 testovaných. U penicilinových antibiotik byly všechny kmeny intermediární. Z vyšetřovaných kmenů bylo vůči karbapenemovým antibiotikům imipenem 6 kmenů citlivých a 1 kmen intermediární, vůči doripenemu bylo všech 7 kmenů intermediárních. Mezi testovaná fluorochinolonová antibiotika byl na ciprofloxacin rezistentní jeden kmen a zbylých 6 bylo intermediárních a na levofloxacin byly všechny kmeny citlivé. Naopak při testování aminoglykosidových antibiotik amikacinu a tobramycinu byly shledány pouze citlivé kmeny.

6.4 Schopnost tvorby biofilmu

Tvorba biofilmu byla u všech bakteriálních izolátů zkoumána v BHI bujonu Christensenovou metodou v 96jamkové mikrotitrační destičce. Pro zjištění hraniční hodnoty (OD_c) určující, zda je daný kmen biofilmopozitivní, byly vypočítány limitní hodnoty, které jsou uvedeny v tabulce 10. Na základě následného porovnání hodnoty OD_c s absorbancí vzorků (A₅₉₅) byly izoláty rozděleny do tří kategorií, a to kmen netvoří biofilm: OD ≤ OD_c, kmen slabě tvoří biofilm: OD_c < OD ≤ 2 OD_c a kmen silně tvoří biofilm: OD > 2 OD_c. Výsledky tvorby biofilmu jsou uvedeny v tabulce 11 a na obrázku 20.

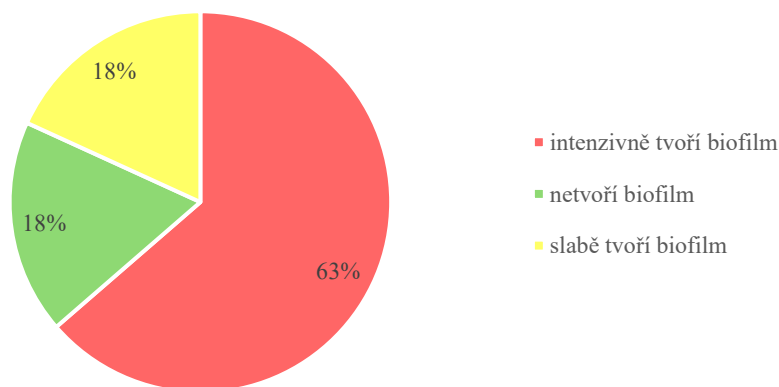
Tabulka 10: Limitní hodnoty pro hodnocení tvorby biofilmu

A (-)	Kategorie
0-0,406	Netvoří biofilm
0,406 - 0,812	Slabě tvoří biofilm
> 0,812	Intenzivně tvoří biofilm

Tabulka 11: Vyhodnocení tvorby biofilmu u testovaných gramnegativních tyčinek

Kmen	Identifikace	A (-)
H3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,223
H4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,286
P14	<i>Cronobacter sakazaki</i>	1,936
16B	<i>Enterobacter sp.</i>	1,009
P58	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	1,679
P59	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	1,550
P65	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	1,608
P66	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	1,353
P63	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,747
28	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	0,452
28A	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	0,555

Z celkových 11 testovaných kmenů bylo 7 kmenů hodnoceno jako biofilm pozitivní, 2 kmeny netvořily biofilm a 2 kmeny spadaly do kategorie slabě tvořící biofilm. Nejvyšší tvorba biofilmu ze všech testovaných kmenů byla pozorována u izolátu *Cronobacter sakazakii* P14 s hodnotou absorbance 1,936.



Obrázek 20: Vyhodnocení podílu testovaných kmenů podle schopnosti tvorby biofilmu

Nejvyšší počet kmenů s tvorbou biofilmu byl zaznamenán u bakterií rodu *Acinetobacter*, kde pět ze sedmi kmenů tvořilo intenzivně biofilm. Největší naměřená hodnota absorbance

byla u kmene *Acinetobacter baumannii* P63, a to 1,747. Mezi slabě tvořící biofilm patří kmeny *A. radioresistens* 28 a 28A, kde se hodnota absorpance pohybovala kolem hodnoty 0,5. Mezi izoláty netvořící biofilm lze zařadit kmeny *Pseudomonas aeruginosa* H3 a H4.

6.5 Souhrnná diskuze

Potraviny s nízkou aktivitou vody ($a_w < 0,70$), včetně sušených výrobků, byly tradičně považovány za mikrobiologicky bezpečné. Nové studie však prokázaly jejich potenciální kontaminaci alimentárními patogeny. Klíčovými faktory jsou mikrobiologická kvalita surovin, podmínky zpracování a samotný sušící proces. Bezpečnost sušených potravin by měla být podpořena systematickou kontrolou surovin, správným řízením výroby, zavedením HACCP a dodržováním správné výrobní praxe, včetně hygieny provozu a personálu. Vzhledem k novým poznatkům již nelze sušené potraviny považovat za bezpečné pouze na základě jejich nízké vodní aktivity (Chitrakar et al., 2019).

V práškové kojenecké výživě byly identifikovány bakterie rodu *Acinetobacter*, *Cronobacter* a *Enterobacter* (Juma et al., 2016).

Při sledování vlivu kultivační teploty na růst gramnegativních bakterií byly sledovány tři teploty (25 °C, 30 °C a 45 °C). Izoláty rodu *Acinetobacter* vykazovaly velmi dobrý růst při teplotách v rozmezí 25–30 °C. Zajímavostí je, že kmen *Acinetobacter nosocomialis* P66 byl schopen růstu i při 45 °C. Optimální růstové teploty většiny kmenů se pohybují mezi 33 a 35 °C (Betts, 2006). Tyto poznatky odpovídají i zjištěním, podle nichž kmeny *Acinetobacter nosocomialis* a *A. baumannii* dosahovaly nejintenzivnějšího růstu při teplotě 30 °C.

Kmen *Cronobacter sakazakii* P14 rostl při všech třech testovaných teplotách. Tyto výsledky potvrzuje i studie (Bursová et al., 2025), kde byl sledován růst bakterie po dobu 30 hodin při teplotách 24 °C, 30 °C a 44 °C.

Bakterie rodu *Enterobacter* obvykle rostou optimálně při teplotách mezi 30 a 37 °C, přičemž jsou schopné růstu i při teplotách až do 44 °C (Rogers et al., 2016). Přesto však izolát *Enterobacter* sp. 16B vykazoval nejlepší růst při 25 °C. Podobně u izolátů *Pseudomonas aeruginosa* H3 a H4 byl pozorován nejintenzivnější růst rovněž při teplotě 25 °C, a to navzdory tomu, že optimální růstová teplota této bakterie se běžně pohybuje mezi 35 až 37 °C (Podstawka, 2024).

V rámci testování antibiotické rezistence byla u všech izolátů zjištěna rezistence vůči cefalosporinovým antibiotikům, což potvrzuje i studie, která upozorňovala na nárůst rezistence gramnegativních bakterií vůči antibiotiku cefepimu (Najafi et al., 2012).

Ve studii (Parra-Flores et al., 2018) byly ve Spojených státech testovány bakterie *Cronobacter* a *Enterobacter* spp., izolované z práškové kojenecké výživy. Jeden z kmenů *Enterobacter* vykazoval rezistenci vůči antibiotiku cefepimu, zatímco *Cronobacter sakazakii* byl citlivý na všechna testovaná antibiotika. Naopak novější studie provedená v Teheránu (Pakbin et al., 2022), kde byl *Cronobacter sakazakii* izolován z běžně dostupné kojenecké výživy, ukázala, že až 92 % izolátů bylo rezistentních na cefepim. Tento výsledek podporuje závěry uvedené v bakalářské práci.

Ve výzkumu (Shobrak a Abo-Amer, 2014) byla sledována antibiotická rezistence u *Pseudecherichia vulneris* izolované z tažných ptáků. Vzhledem k tomu, že kmeny pocházely z volně žijících zvířat, vznikají obavy z potencionálního rozvoje multirezistence a snadného přenosu genů rezistence. Přesto však byla u testovaných antibiotik (ampicilin, ciprofloxacin, piperacilin) prokázána citlivost, což je v souladu s výsledky bakalářské práce. Novější studie zabývající se rezistencí kmenů *Pseudomonas aeruginosa* izolovaných z potravin bohužel dosud chybí.

U testovaných antibiotik došlo ke zjištění, že všechny izoláty rodu *Acinetobacter* jsou rezistentní vůči testovaným cefalosporinovým antibiotikům (cefepimu a ceftazidimu). Ve studii (Cho et al., 2018), která se zabývala kmeny *Acinetobacter* izolovanými ze sušeného mléka vyrobeného v Německu, bylo 21 kmenů (z celkových 47) rezistentních vůči antibiotiku cefepimu.

Přítomnost antibioticky rezistentních kmenů *Acinetobacter* spp. může být rizikem pro veřejné zdraví (Carvalho et al., 2021). Zatímco některé studie (Marí-Almirall et al., 2019) uvádějí nízkou míru rezistence izolátů *Acinetobacter baumannii* na klinicky významná antibiotika, jiné zjistily, že komplex *Acinetobacter baumannii* byl nejčastějším druhem rezistentním na cefalosporiny třetí generace (Carvalho et al., 2021).

Tvorba biofilmů alimentárních patogenů na površích přicházejících do styku s potravinami může vést k vážným rizikům pro lidské zdraví. Buňky v biofilmu je obtížné zcela eliminovat, často perzistují a slouží jako důležitý zdroj trvalé kontaminace v potravinářských produktech (Ye et al., 2015). Tato kompaktní struktura zároveň ztěžuje pronikání látek, jako jsou biocidy a dezinfekční prostředky, dovnitř a zastavení jejich růstu.

Vzhledem k tomu, že biofilm obsahuje vysoký podíl vody, chrání také buňky před vysycháním. Nedostatečná hygiena zařízení a ploch, které přicházejí do kontaktu s potravinami, může formování biofilmu výrazně napomáhat.

V rámci praktické části bylo provedeno testování schopnosti tvorby biofilmu u bakteriálních izolátů gramnegativních tyčinek náležících do čeledi *Enterobacteriaceae* a rodu *Acinetobacter*. Nejvyšší počet biofilm-pozitivních izolátů byl zjištěn u rodu *Acinetobacter*, kde tvorba byla prokázána u všech izolátů. Největší tvorbu biofilmu vykazoval izolát *Acinetobacter baumannii*. Ve studii (Ababneh et al., 2022) zkoumali tvorbu biofilmu u *Acinetobacter baumannii* izolovaného z různých potravin, kde zjistili, že skoro všechny izoláty tvoří intenzivně biofilm. Několik studií (Lee et al., 2008) ukázalo, že *Acinetobacter* spp. tvoří silné biofilmy ve srovnání s ostatními bakteriemi. Tahle studie může mít i spojitost mezi antibiotickou rezistencí a tvorbou biofilmu. (Roy et al., 2022).

Tvorba biofilmu u bakterie *Acinetobacter radioresistens* je ve srovnání s jinými druhy *Acinetobacter*, zejména *Acinetobacter baumannii*, omezená. Některé studie (Clay S. Crippen et al., 2018) však zkoumaly jeho genetické vlastnosti a potenciál pro tvorbu biofilmu.

Studie (Nyenje et al., 2013) se zabývala tvorbou biofilmu kmenem *Enterobacter* izolovaným z potravin (zelenina, brambory, rýže, koláče, hovězí a kuřecí guláš). Ve studii potvrdili tvorbu biofilmu, což též koresponduje s výsledky bakalářské práce.

Největší tvorba biofilmu byla zaznamenána u bakterie *Cronobacter sakazakii*, hodnota absorbance byla 1,936. *Cronobacter* je známý tvorbou biofilmu, ve studii (Ye et al., 2015) byly při kultivaci 28 °C všechny izoláty biofilm pozitivní. Ve studii (Mořková et al., 2015), kde též zkoumali tvorbu biofilmu Christensenovou metodou patřil *Cronobacter sakazakii* mezi intenzivní producenty biofilmu v BHI bujónu.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se věnovala charakterizaci vybraných gramnegativních tyčinek izolovaných z mléčných potravin s podílem koziho mléka se sníženou vodní aktivitou. V rámci charakterizačních studií byl sledován vliv kultivační teploty na růst těchto mikroorganismů, analyzována byla schopnost tvorby biofilmu, bylo provedeno testování citlivosti na antibiotika pomocí diskové difúzní metody.

Identifikace izolátů byla provedena pomocí sekvenace genu pro 16S rRNA, Metodou byly identifikovány bakterie patřící do rodů *Cronobacter*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* a *Pseudodescherichia*. Největší zastoupení měl *Acinetobacter nosocomialis*.

U všech izolátů byl pozorován růst při teplotách 25 °C a 30 °C. U kmene *Cronobacter sakazakii* P14 a jednoho kmene *Acinetobacter nosocomialis* P66 bylo možno sledovat růst i při teplotě 40 °C.

U izolátů byla provedena disková difúzní metoda v rámci testování antibiotické rezistence. Bylo zjištěno, že všechny kmeny vykazují rezistenci vůči testovanému antibiotiku cefepimu. U izolátů *Acinetobacter* byla zjištěna snížená citlivost na většinu testovaných antibiotik. Naopak zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* projeví citlivost k většině použitých antibiotik.

Tvorba biofilmu byla ověřena Christensenovou metodou, kde z 11 testovaných mikroorganismů byla silná tvorba biofilmu prokázána u 7 izolátů a nejvíc vykazovala tvorbu bakterie *Cronobacter sakazakii* P14.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABABNEH, Qutaiba; AL-ROUSAN, Ekhlas a JARADAT, Ziad, 2022. Fresh produce as a potential vehicle for transmission of *Acinetobacter baumannii*. Online. *International Journal of Food Contamination*. Roč. 9, č. 1, s. 5. ISSN 2196-2804. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40550-022-00092-7>. [cit. 2025-04-22].

ABDESSELAM, K. a PAGOTTO, F., 2014. *Cronobacter* (Enterobacter) *sakazakii* and Other *Cronobacter* spp. Online. In: *Encyclopedia of Food Safety*. 2nd. Elsevier, s. 148-156. ISBN 9780128225202. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822521-9.21086-1>. [cit. 2025-04-04].

BARBOSA-CÁNOVAS, Gustavo V.; FONTANA, Anthony J.; SCHMIDT, Shelly J. a LABUZA, Theodore P. (ed.), 2007. *Water Activity in Foods*. Online. Wiley. ISBN 9780813824086. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9780470376454>.

BETTS, G., 2006. Other spoilage bacteria. Online. In: *Food Spoilage Microorganisms*. Elsevier, s. 668-693. ISBN 9781855739666. Dostupné z: <https://doi.org/10.1533/9781845691417.5.668>. [cit. 2025-04-21].

BEUCHAT, LARRY R.; KOMITOPOULOU, EVANGELIA; BECKERS, HARRY; BETTS, ROY P.; BOURDICHON, FRANÇOIS et al., 2013. Low--Water Activity Foods: Increased Concern as Vehicles of Foodborne Pathogens. Online. *Journal of Food Protection*. Roč. 76, č. 1, s. 150-172. ISSN 0362028X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-211>. [cit. 2025-02-21].

BHAT, Rajeev; KARIM ALIAS, Abd a PALIYATH, Gopinadhan (ed.), 2012. *Progress in Food Preservation*. Online. Wiley. ISBN 9780470655856. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781119962045>. [cit. 2025-03-23].

BOURDICHON, François; BETTS, Roy; DUFOUR, Christophe; FANNING, Séamus; FARBER, Jeffrey et al., 2021. Processing environment monitoring in low moisture food production facilities: Are we looking for the right microorganisms? Online. *International Journal of Food Microbiology*. Roč. 2021, č. 356, s. 109351. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109351>. [cit. 2025-02-21].

BURSOVÁ, Šárka; HARUŠTIAKOVÁ, Danko; NECIDOVÁ, Lenka; VAŇKOVÁ, Iveta; ČUREČKOVÁ, Veronika et al., 2025. Assessment of the *Cronobacter sakazakii* risk in reconstituted infant formula. Online. *Acta Veterinaria Brno*. Roč. 94, č. 1, s. 67-75. ISSN 0001-7213. Dostupné z: <https://doi.org/10.2754/avb202594010067>. [cit. 2025-04-21].

BURSOVÁ, Šárka; NECIDOVÁ, Lenka a DUŠKOVÁ, Marta, 2014. *Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody. Obecná mikrobiologie*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-742-8.

CABRAL, Stella; BALLABEN, Anelise S.; RAMOS, Carolina A.; FERREIRA, Joseane Cristina; CHANDLER, Mick et al., 2025. Complex resistance mechanisms in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from a Healthy Cat: Unveiling genomic architecture and public health implications. Online. *The Microbe*. Roč. 2025, č. 6, s. 100268. ISSN 29501946. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100268>. [cit. 2025-04-06].

CARVALHEIRA, Ana; SILVA, Joana a TEIXEIRA, Paula, 2021. *Acinetobacter* spp. in food and drinking water – A review. Online. *Food Microbiology*. Roč. 2021, č. 95, s. 103675. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103675>. [cit. 2025-04-21].

CLAY S. CRIPPEN, Steven Huynh; HUYNH, Steven; MILLER, William G.; PARKER, Craig T. a SZYMANSKI, Christine M., 2018. *Complete Genome Sequence of Acinetobacter radioresistens Strain LH6, a Multidrug-Resistant Bacteriophage-Propagating Strain*. Online. Microbiology Resource Announcements. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/mra.00929-18>. [cit. 2025-05-05].

DEMIRCI, Ali; FENG, Hao a KRISHNAMURTHY, Kathiravan (ed.), 2020. *Food Safety Engineering*. Online. Food Engineering Series. Cham: Springer International Publishing. ISBN 978-3-030-42659-0. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-42660-6>. [cit. 2025-03-23].

ELBEHIRY, Ayman; MARZOUK, Eman; MOUSSA, Ihab M.; DAWOUD, Turki M.; MUBARAK, Ayman S. et al., 2021. *Acinetobacter baumannii* as a community foodborne pathogen: Peptide mass fingerprinting analysis, genotypic of biofilm formation and phenotypic pattern of antimicrobial resistance. Online. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Roč. 28, č. 1, s. 1158-1166. ISSN 1319562X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.052>. [cit. 2025-04-05].

ERKMEN, Osman a T. FARUK BOZOGLU, Bozoglu, 2016. Food Microbiology: Principles into Practice. In: *Food Microbiology*. John Wiley & Sons, s. 13-106. ISBN 9781119237761. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119237860.ch30>.

FEENEY, Audrey; KROPP, Kai A; O'CONNOR, Roxana a SLEATOR, Roy D, 2015. *Cronobacter sakazakii*: stress survival and virulence potential in an opportunistic foodborne pathogen. Online. *Gut Microbes*. 2015-01-07, roč. 5, č. 6, s. 711-718. ISSN 1949-0976. Dostupné z: <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.983774>. [cit. 2025-04-04].

GRUDLEWSKA-BUDA, Katarzyna; BAUZA-KASZEWSKA, Justyna; WIKTORCZYK-KAPISCHKE, Natalia; BUDZYŃSKA, Anna; GOSPODAREK-KOMKOWSKA, Eugenia et al., 2023. Antibiotic Resistance in Selected Emerging Bacterial Foodborne Pathogens—An Issue of Concern? Online. *Antibiotics*. Roč. 12, č. 5, s. 880. ISSN 2079-6382. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050880>. [cit. 2025-05-06].

HALLSWORTH, John E., 2022. Water is a preservative of microbes. Online. *Microbial Biotechnology*. Roč. 15, č. 1, s. 191-214. ISSN 1751-7915. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13980>. [cit. 2025-02-21].

CHITRAKAR, Bimal; ZHANG, Min a ADHIKARI, Benu, 2019. Dehydrated foods: Are they microbiologically safe? Online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019-09-25, roč. 59, č. 17, s. 2734-2745. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1466265>. [cit. 2025-02-22].

CHO, Gyu-Sung; LI, Bo; ROSTALSKY, André; FIEDLER, Gregor; RÖSCH, Niels et al., 2018. Diversity and Antibiotic Susceptibility of *Acinetobacter* Strains From Milk Powder

Produced in Germany. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2018-3-27, roč. 2018, č. 9. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00536>. [cit. 2025-04-21].

IJABADENIYI, O. A. a PILLAY, Y., 2017. Microbial Safety of Low Water Activity Foods: Study of Simulated and Durban Household Samples. Online. *Journal of Food Quality*. Roč. 2017, č. 1, s. 1-7. ISSN 0146-9428. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2017/4931521>. [cit. 2025-04-04].

IVERSEN, C., 2014. ELECTRICAL TECHNIQUES | Enterobacter. Online. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2nd. Elsevier, s. 653-658. ISBN 9780123847331. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00095-1>. [cit. 2025-04-23].

JUMA, Noha A.; MANNING, Georgina a FORSYTHE, Stephen J., 2016. Desiccation survival of *Acinetobacter* spp. in infant formula. Online. *Food Control*. Roč. 2016, č. 68, s. 162-166. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.043>. [cit. 2025-05-05].

KÄMPFER, P., 2014. *Acinetobacter*. Online. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2nd. Elsevier, s. 11-17. ISBN 9780123847331. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00002-1>. [cit. 2025-04-23].

LEE, H.-W.; KOH, Y.M.; KIM, J.; LEE, J.-C.; LEE, Y.-C. et al., 2008. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. Online. *Clinical Microbiology and Infection*. Roč. 14, č. 1, s. 49-54. ISSN 1198743X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01842.x>. [cit. 2025-04-22].

LEISTNER, Lothar a GORRIS, Leon G.M., 1995. Food preservation by hurdle technology. Online. *Trends in Food Science & Technology*. Roč. 6, č. 2, s. 41-46. ISSN 09242244. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)88941-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)88941-4). [cit. 2025-04-19].

LING, Na; JIANG, Xiuting; FORSYTHE, Stephen; ZHANG, Danfeng; SHEN, Yizhong et al., 2022. Food Safety Risks and Contributing Factors of *Cronobacter* spp. Online. *Engineering*. Roč. 2022, č. 12, s. 128-138. ISSN 20958099. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.03.021>. [cit. 2025-04-05].

LUCENA-AGUILAR, Gema; SÁNCHEZ-LÓPEZ, Ana María; BARBERÁN-ACEITUNO, Cristina; CARRILLO-ÁVILA, José Antonio; LÓPEZ-GUERRERO, José Antonio et al., 2016. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. Online. *Biopreservation and Biobanking*. Roč. 14, č. 4, s. 264-270. ISSN 1947-5535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>. [cit. 2025-04-12].

MALTA, Rogerio Caldeira Rodrigues; RAMOS, Gustavo Luis de Paiva Anciens a NASCIMENTO, Janaina dos Santos, 2020. From food to hospital: we need to talk about *Acinetobacter* spp. Online. *Germs*. Roč. 10, č. 3, s. 210-217. ISSN 22482997. Dostupné z: <https://doi.org/10.18683/germs.2020.1207>. [cit. 2025-04-05].

MARÍ-ALMIRALL, Marta; COSGAYA, Clara; PONS, Maria J.; NEMEC, Alexandr; OCHOA, Theresa J. et al., 2019. Pathogenic *Acinetobacter* species including the novel *Acinetobacter dijkshoorniae* recovered from market meat in Peru. Online. *International*

Journal of Food Microbiology. Roč. 2019, č. 305, s. 108248. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2019.108248>. [cit. 2025-04-21].

MILANI, E.S.; HASANI, A.; VARSCHOCHI, M.; SADEGHI, J.; MEMAR, M.Y. et al., 2021. Biocide resistance in *Acinetobacter baumannii*: appraising the mechanisms. Online. *Journal of Hospital Infection*. Roč. 2021, č. 117, s. 135-146. ISSN 01956701. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.09.010>. [cit. 2025-04-05].

MOŤKOVÁ, Petra; VYTŘASOVÁ, Jarmila a ŠILHA, David, 2015. Hodnocení tvorby biofilmu vybraných patogenů vyskytujících se v potravinářském průmyslu. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*. Roč. 63, č. 3, s. 169-174.

NAJAFI, Narges; BABAMAHOUDI, Farhang; DAVOUDI, AliReza; GHASEMIYAN, Roya; ALIYAN, Shahriar et al., 2012. *Increased cefepime MIC for enterobacteriaceae clinical isolates*. Online. PMC. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3755821/>. [cit. 2025-04-13].

NYENJE, Mirriam; GREEN, Ezekiel a NDIP, Roland, 2013. Evaluation of the Effect of Different Growth Media and Temperature on the Suitability of Biofilm Formation by *Enterobacter cloacae* Strains Isolated from Food Samples in South Africa. Online. *Molecules*. Roč. 18, č. 8, s. 9582-9593. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules18089582>. [cit. 2025-04-22].

PAKBIN, Babak; BRÜCK, Wolfram Manuel; ALLAHYARI, Samaneh; ROSSEN, John W. A. a MAHMOUDI, Razzagh, 2022. Antibiotic Resistance and Molecular Characterization of *Cronobacter sakazakii* Strains Isolated from Powdered Infant Formula Milk. Online. *Foods*. Roč. 11, č. 8, s. 1093. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods11081093>. [cit. 2025-04-13].

PARRA-FLORES, Julio; AGUIRRE, Juan; JUNEJA, Vijay; JACKSON, Emily E.; CRUZ-CÓRDOVA, Ariadna et al., 2018. Virulence and Antibiotic Resistance Profiles of *Cronobacter sakazakii* and *Enterobacter* spp. Involved in the Diarrheic Hemorrhagic Outbreak in Mexico. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2018-9-27, roč. 2018, č. 9, s. 2206. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02206>. [cit. 2025-04-13].

PLEVA, Pavel; BARTOŠOVÁ, Lucie; MÁČALOVÁ, Daniela; ZÁLEŠÁKOVÁ, Ludmila; SEDLAŘÍKOVÁ, Jana et al., 2022. Biofilm Formation Reduction by Eugenol and Thymol on Biodegradable Food Packaging Material. Online. *Foods*. Roč. 11, č. 1. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods11010002>. [cit. 2025-02-14].

PODSTAWKA, Adam, 2024. *Pseudescerichia vulneris* 875-72, 580. Online. BacDiveID: 4928. Dostupné z: <https://bacdive.dsmz.de/strain/4928>. [cit. 2025-04-06].

POKHAREL, Khilasa; DAWADI, Bishwa Raj a SHRESTHA, Lok Bahadur, 2022. Role of Biofilm in Bacterial Infection and Antimicrobial Resistance. Online. *Journal of Nepal Medical Association*. 2022-09-01, roč. 60, č. 253, s. 836-840. ISSN 1815-672X. Dostupné z: <https://doi.org/10.31729/jnma.7580>. [cit. 2025-04-23].

PRAKASH, Vishweshwaraiah; MARTÍN-BELLOSO, Olga; KEENER, Larry; ASTLEY, Siân; BRAUN, Susanne et al., 2016. *Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods*.

Online. Elsevier. ISBN 9780128006054. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800605-4.00002-5>.

RAMIREZ, Darnelle a GIRON, Mariana, 2023. *Enterobacter Infections*. Online. NCBI Bookshelf. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559296/>. [cit. 2025-04-06].

RIFNA, E. J.; DWIVEDI, Madhuresh a CHAUHAN, O. P., 2022. Role of Water Activity in Food Preservation. Online. In: CHAUHAN, O. P. (ed.). *Advances in Food Chemistry*. Singapore: Springer Nature Singapore, s. 39-64. ISBN 978-981-19-4795-7. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-981-19-4796-4_2. [cit. 2025-02-20].

ROGERS, L.; POWER, K.; GAORA, P.Ó. a FANNING, S., 2016. Escherichia coli and Other Enterobacteriaceae: Occurrence and Detection. Online. In: *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, s. 545-551. ISBN 9780123849533. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00259-2>. [cit. 2025-04-21].

ROY, Subhasree; CHOWDHURY, Goutam; MUKHOPADHYAY, Asish K.; DUTTA, Shanta a BASU, Sulagna, 2022. Convergence of Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in Acinetobacter baumannii Infection. Online. *Frontiers in Medicine*. 2022-3-24, roč. 2022, č. 9, s. 793615. ISSN 2296-858X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.793615>. [cit. 2025-04-22].

SHOBRAK, Mohammed Y. a ABO-AMER, Aly E., 2014. Role of wild birds as carriers of multi-drug resistant Escherichia coli and Escherichia vulneris. Online. *Brazilian Journal of Microbiology*. Roč. 45, č. 4, s. 1199-1209. ISSN 1517-8382. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000400010>. [cit. 2025-04-21].

SCHLEGELOVÁ, J. a KARPÍŠKOVÁ, S., 2007. *Mikrobiální biofilmy v potravinářském průmyslu*. Online. ProLékaře.cz. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/283778047>. [cit. 2025-02-13].

SILLIKER, J. H.; ELLIOTT, R. P.; BAIRD-PARKER, A. C.; BRYAN, F. L.; CHRISTIAN, J. H. B. et al., 1980. *Microbial Ecology of Foods VOLUME 1 Factors Affecting Life and Death of Microorganisms*. Academic Press. ISBN 0123635012.

SPERBER, William H., 1983. Influence of Water Activity on Foodborne Bacteria — A Review. Online. *Journal of Food Protection*. Roč. 46, č. 2, s. 142-150. ISSN 0362028X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-46.2.142>. [cit. 2025-03-02].

STEPANOVIĆ, SRDJAN; VUKOVIĆ, DRAGANA; HOLA, VERONIKA; BONAVENTURA, GIOVANNI DI; DJUKIĆ, SLOBODANKA et al., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. Online. *APMIS*. Roč. 115, č. 8, s. 891-899. ISSN 0903-4641. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x. [cit. 2025-02-14].

TROLLER, John, 2012. *Water Activity and Food*. Academic Press. ISBN 9780323159012. VAN LOOVEREN, M. a GOOSSENS, H., 2004. Antimicrobial resistance of Acinetobacter spp. in Europe. Online. *Clinical Microbiology and Infection*. Roč. 10, č. 8, s. 684-704. ISSN

1198743X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00942.x>. [cit. 2025-04-05].

YE, Yingwang; LING, Na; JIAO, Rui; WU, Qinpging; HAN, Yongjia et al., 2015. Effects of culture conditions on the biofilm formation of Cronobacter sakazakii strains and distribution of genes involved in biofilm formation. Online. *LWT - Food Science and Technology*. Roč. 62, č. 1, s. 1-6. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.035>. [cit. 2025-04-22].

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma systému lyofilizace (Barbosa-Cánovas et al., 2007)	17
Obrázek 2: Optimální růstová křivka bakterií (Silliker et al., 1980)	23
Obrázek 3: Teorie překážek (t – teplota, a_w – snížená aktivita vody; pH – snížená hodnota pH; Eh – snížená oxidoredukční potenciál; $pres$ – konzervační látky; V – vitamíny; N – nutrienty) (Leistner a Gorris, 1995)	25
Obrázek 4: Průběh purifikace DNA (horní řada – vzorek s roztokem SPRIselect, dolní řada – vzorek s PCR vodou)	34
Obrázek 5: Výsledek elektroforézy s amplifikovaným genem pro 16S rRNA	38
Obrázek 6: Růst <i>Cronobacter sakazakii</i> P14 při různých teplotách	40
Obrázek 7: Růst <i>Acinetobacter nosocomialis</i> P58 při různých teplotách	41
Obrázek 8: Růst <i>Acinetobacter nosocomialis</i> P59 při různých teplotách	41
Obrázek 9: Růst <i>Acinetobacter nosocomialis</i> P65 při různých teplotách	42
Obrázek 10: Růst <i>Acinetobacter nosocomialis</i> P66 při různých teplotách	42
Obrázek 11: Růst <i>Acinetobacter baumannii</i> P63 při různých teplotách	43
Obrázek 12: Růst <i>Acinetobacter radioresistens</i> 28 při různých teplotách	44
Obrázek 13: Růst <i>Acinetobacter radioresistens</i> 28A při různých teplotách	44
Obrázek 14: Růst <i>Pseudomonas aeruginosa</i> H3 při různých teplotách	45
Obrázek 15: Růst <i>Pseudomonas aeruginosa</i> H4 při různých teplotách	45
Obrázek 16: Růst <i>Enterobacter</i> sp. 16B při různých teplotách	46
Obrázek 17: Výsledky diskové difuzní metody pro <i>Acinetobacter nosocomialis</i> P65	47
Obrázek 18: Zastoupení citlivých, intermediárních a rezistentních izolátů z čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	48
Obrázek 19: Zastoupení citlivých, intermediárních a rezistentních izolátů rodu <i>Acinetobacter</i>	49
Obrázek 20: Vyhodnocení podílu testovaných kmenů podle schopnosti tvorby biofilmu ..	50

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Aktivita vody různých potravin a minimální požadavky na a_w mikrobiálních skupin.	14
Tabulka 2: Složení PCR směsi pro amplifikaci jednoho vzorku DNA na sekvenaci genu pro 16S rRNA.....	32
Tabulka 3: Průběh PCR pro amplifikaci 16S rRNA genu	33
Tabulka 4: Parametry kultivace testovaných izolátů v bioreaktoru RTS-1	35
Tabulka 5: Použitá antibiotika pro testování rezistence.....	36
Tabulka 6: Koncentrace a čistota DNA izolované z testovaných kmenů bakterií.....	38
Tabulka 7: Výsledky identifikace bakterií sekvenací genů pro 16S rRNA	39
Tabulka 8: Hodnocení antibiotické rezistence kmenů z čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	47
Tabulka 9: Hodnocení antibiotické rezistence kmenů rodu <i>Acinetobacter</i>	48
Tabulka 10: Limitní hodnoty pro hodnocení tvorby biofilmu	50
Tabulka 11: Vyhodnocení tvorby biofilmu u testovaných gramnegativních tyčinek	50

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

a_w	aktivita vody
BHI	mozko-srdcová infuze
bp	párů bazí
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleotidy
EUCAST	Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (anglicky European Committee on antimicrobial susceptibility testing)
HACCP	system analýzy rizik a kritických kontrolních bodů
ICMSF	Mezinárodní komise pro stanovení mikrobiologických požadavků na potraviny (anglicky International Commission on Microbiological Specifications for Foods)
OD	optická denzita
ODc	hraniční hodnota optické denzity
PCR	polymerázová řetězová reakce
pH	potenciál vodíku
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
SD	směrodatná odchylka
sp.	druh (species)
spp.	druhy (species)