

# Schopnost produkce bakteriocinů u bakterií izolovaných z potravin

Radek Novotný

---

Bakalářská práce  
2023

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

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

Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Radek Novotný**  
Osobní číslo: **T20339**  
Studijní program: **B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin**  
Specializace: **Potravinářské biotechnologie a aplikovaná mikrobiologie**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Schopnost produkce bakteriocinů u bakterií izolovaných z potravin**

## Zásady pro vypracování

- Zpracujte literární rešerši na zadané téma zahrnující následující body:
  - Charakterizace a dělení bakteriocinů produkovaných grampozitivními bakteriemi.
  - Využití bakteriocinů.
  - Metody stanovení produkce bakteriocinů.
- V praktické části proveďte:
  - Izolaci grampozitivních bakterií z vybraných potravin.
  - Skríning produkce bakteriocinů u vybraných izolátů.
  - Zpracování a zhodnocení získaných výsledků.
  - Zformulování závěrů práce.

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

Seznam doporučené literatury:

Seznam doporučené literatury:

[1] Lacroix, Ch. *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation*. 1st ed., Cambridge: Woodhead Publishing, 2011, 536 p., ISBN 978-0-85-709052-2.

[2] Taylor, T. M. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. 1st ed., Cambridge: Woodhead Publishing, 2015, 442 p., ISBN 978-1-78242-042-2.

[3] Vědecké zdroje zahrnuté v databázích ScienceDirect, Web of Science, Scopus, SciFinder Scholar aj.

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Khatantuul Purevdorj, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **19. května 2023**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2023

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- 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 autorského zákona 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 samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Bakteriociny jsou definovány jako peptidy nebo proteiny, které bývají syntetizovány v ribozomech různých kmenů bakterií, a které mohou vykazovat schopnost inhibice růstu jiných mikroorganismů. V teoretické části této bakalářské práce je popsána charakterizace a dělení bakteriocinů produkovaných grampozitivními bakteriemi, jejich mechanismus vzniku a účinku, využití bakteriocinů a metody stanovení produkce bakteriocinů. V praktické části této práce je popsána izolace grampozitivních bakterií z vybraných potravin, provedení jejich předběžné typizace a identifikace, a ověření schopnosti produkce antimikrobních látek – bakteriocinů.

Klíčová slova: bakteriociny, antimikrobiální látky, bakterie mléčného kvašení, MALDI – TOF

## **ABSTRACT**

Bacteriocins are defined as peptides or proteins that tend to be synthesized in the ribosomes of various strains of bacteria, which may show the ability to inhibit the growth of other microorganisms. The theoretical part of this bachelor's thesis describes the characterization and the division of bacteriocins produced by gram-positive bacteria, their mechanism of formation and action, the use of bacteriocins and methods for determining the production of bacteriocins. The practical part of this thesis describes the isolation of gram-positive bacteria from selected food, their preliminary typing and identification, and the ability to produce antimicrobial substances - bacteriocins.

Keywords: bacteriocins, antimicrobial substances, lactic acid bacteria, MALDI – TOF

Rád bych poděkoval Ing. Khatantuul Purevdorj Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, vstřícnost, ochotu a věnovaný čas při zpracovávání této bakalářské práce.

Dále děkuji pracovnícím mikrobiologické laboratoře Ing. Veronice Kučabové a Ing. Olze Vlčkové za vstřícnost, ochotu a pomoc při realizaci praktické části bakalářské práce.

Také chci poděkovat prof. Ing. Miroslavě Kačániové Ph.D. za provedení identifikace bakterií pomocí hmotnostní spektrometrie.

V neposlední řadě chci poděkovat své rodině a zejména přítelkyni za podporu a trpělivost během studia.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA BAKTERIOCINŮ</b> .....	<b>11</b>
1.1 BAKTERIOCINY Z HISTORICKÉHO POHLEDU .....	11
1.2 DĚLENÍ BAKTERIOCINŮ .....	12
1.3 BAKTERIOCINY BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	15
1.3.1 Charakteristika bakterií mléčného kvašení .....	15
1.3.2 BMK bakteriociny.....	16
1.4 SROVNÁNÍ BAKTERIOCINŮ S TRADIČNÍMI ANTIBIOTIKY.....	19
<b>2 MECHANISMUS VZNIKU BAKTERIOCINŮ</b> .....	<b>22</b>
<b>3 MECHANISMUS ÚČINKU BAKTERIOCINŮ</b> .....	<b>24</b>
3.1 PRINCIP MECHANISMU ÚČINKU BAKTERIOCINŮ .....	24
3.2 REZISTENCE A MECHANISMUS REZISTENCE K BAKTERIOCINŮM.....	25
<b>4 METODY STANOVENÍ PRODUKCE BAKTERIOCINŮ</b> .....	<b>26</b>
4.1 PLOTNOVÉ METODY .....	26
4.1.1 Vícejamková destička pro detekci bakteriocinů .....	26
4.1.2 Metoda „sendvičové“ vrstvy .....	26
4.1.3 Metoda dvojité vrstvy agaru pro potvrzení bakteriocin produkujících kolonií .....	26
4.1.4 Agarový jamkový difúzní test.....	27
4.1.5 „Agar spot test (spot on the lawn)“ .....	27
4.2 METODA PCR .....	27
<b>5 MOŽNOST VYUŽITÍ BAKTERIOCINŮ</b> .....	<b>29</b>
5.1 SOUČASNÝ VÝZNAM A MOŽNOST VYUŽITÍ.....	29
5.1.1 Potravinářství .....	29
5.1.2 Lékařství.....	31
5.2 VÝZNAM A ŠANCE VYUŽITÍ V BUDOUCNOSTI.....	32
5.2.1 Potravinářství .....	32
5.2.2 Lékařské aplikace.....	32
5.2.3 Veterinární medicína .....	33
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>34</b>
<b>6 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>35</b>
<b>7 MATERIÁL</b> .....	<b>36</b>
7.1 POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	36
7.2 ROZTOKY A CHEMIKÁLIE.....	36
7.3 KULTIVAČNÍ PŮDY .....	36

7.3.1	Příprava kultivačních pŮd: .....	39
<b>8</b>	<b>METODIKA .....</b>	<b>40</b>
8.1	IZOLACE GRAMPOZITIVNÍCH BAKTERIÍ .....	40
8.2	PŘEDBĚŽNÁ TYPIZACE ZÍSKANÝCH IZOLÁTŮ .....	41
8.2.1	Gramovo barvení.....	41
8.2.2	KOH test.....	42
8.2.3	Oxidázový test (OXI test) .....	43
8.2.4	DŮkaz produkce katalázy .....	43
8.2.5	Zamražení získaných izolátů.....	44
8.3	IDENTIFIKACE IZOLÁTŮ POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROFOTOMETRIE MALDI - TOF .....	44
8.4	OVĚŘENÍ SCHOPNOSTI PRODUKCE BAKTERIOCINU U IZOLOVANÝCH BAKTERIÍ .....	45
<b>9</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>48</b>
9.1	IZOLACE GRAMPOZITIVNÍCH BAKTERIÍ .....	48
9.2	IDENTIFIKACE ZÍSKANÝCH IZOLÁTŮ .....	49
9.3	ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA ZÍSKANÝCH IZOLÁTŮ .....	56
9.3.1	Výsledky antimikrobiální aktivity proti potravinovým patogenům.....	56
9.3.2	Výsledky antimikrobiální aktivity proti příbuzným BMK.....	60
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>67</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>76</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>77</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>78</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>79</b>



## ÚVOD

V současné době roste zájem o nové druhy antimikrobiálních látek využívaných například pro kontrolu patogenních mikroorganismů, pro náhradu syntetických potravinových konzervačních látek nebo také tradičních antibiotik (Rahmeh et al., 2019, Ahmad et al., 2017). O nahrazení tradičních antibiotik antimikrobiálními látkami přírodního původu se v posledních letech diskutuje především z důvodu častějšího výskytu antibiotické rezistence a také z důvodu přítomnosti toxických účinků, které jsou se současnými antibiotiky vázány (Ahmad et al., 2017).

Mikroorganismy mají schopnost produkovat širokou škálu nejrůznějších látek s antimikrobiální aktivitou. Mezi tyto metabolity se mohou řadit např. organické kyseliny, alkoholy, diacetyly, antibiotika a nejrůznější látky označované jako bakteriociny (Ahmad et al., 2017).

Bakteriociny jsou částice peptidového charakteru nebo komplexní proteiny vykazující antimikrobiální vlastnosti. Mezi hlavní výhody těchto částic patří jejich fyzikální stabilita a netoxičita. Syntéza bakteriocinů probíhá v ribozomech grampozitivních nebo gramnegativních bakterií, které je vylučují do vnějšího prostředí. Mnoho z těchto bakterií dokáže produkovat bakteriociny, které byly evidovány jako účinné proti zvířecím i lidským patogenním mikroorganismům, aniž by byly zjištěny jakékoli projevy toxicity. Mezi tyto patogeny lze zařadit i methicillin – rezistentní *Staphylococcus aureus* a vankomycin – rezistentní enterokoky (Ahmad et al., 2017).

Využití bakteriocinů nacházíme v mnoha odvětvích průmyslu, především pak v zemědělství, medicíně pro veterinární účely nebo v potravinářství, kde se uplatňují jako konzervační činidla, která jsou využívána pro kontrolu infekčních a patogenních mikroorganismů. Hlavní potenciál představují bakteriociny v uplatnění jako terapeutické a biologické látky, či látky využívané jako konzervanty (Ahmad et al., 2017).

Cílem této bakalářské práce bylo izolovat grampozitivní bakterie z potravin, provést jejich identifikaci, a následně ověřit, zdali vykazují schopnost produkce antimikrobiálních látek – bakteriocinů.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA BAKTERIOCINŮ

Bakteriociny můžeme definovat jako peptidy nebo proteiny, které bývají syntetizovány v ribozomech různých kmenů bakterií, a které mohou vykazovat schopnost inhibice růstu jiných parazitů, virů, hub, či bakterií (Shafique et al., 2023, Liu et al., 2022, Hernández - González et al., 2021; Ahmad et al., 2017).

Mikrobi si v daných prostředích mohou konkurovat v růstu jak v oblasti prostoru, tak živin (Dong et al., 2022, Rasheed et al., 2021, Juturu a Wu, 2018). Tato skutečnost je s největší pravděpodobností důvodem vývoje produkce různých druhů metabolitů a bakteriocinů danými bakteriemi (Dong et al., 2022, Rasheed et al., 2021). Antimikrobiální aktivita proti jiným, většinou však příbuzným bakteriím, zvyhodňuje producenta bakteriocinu v boji o prostor i o živiny v určitém prostředí. Produkce bakteriocinů určitými bakteriemi je v přírodě velmi rozšířeným mechanismem (Rasheed et al., 2021). Bakteriociny vykazují buďto bakteriostatické nebo baktericidní spektrum účinnosti (Soltani et al., 2020). Toto spektrum bývá většinou mířeno proti kmenům bakterií blízce příbuzným produkčnímu kmenu. Pouze ve výjimečných případech bývá spektrum účinku mířeno proti širší skupině nepříbuzných kmenů bakterií (Fathizadeh et al., 2022, Yap, Lai a Tan, 2022, Soltani et al., 2020).

Geny pro biosyntézu bakteriocinů jsou většinou seskupeny jako operony. Operony mohou být lokalizovány buďto na bakteriálním chromozomu, kde jsou spojeny s transpozony, nebo mohou být lokalizovány v plazmidu, kdy jejich transkripce probíhá jednotlivě (Punia Bangar et al., 2022).

### 1.1 Bakteriociny z historického pohledu

O objevu bakteriocinů se z literatury můžeme dovědět již v roce 1925. V této době bylo popsáno antagonistické působení kolicinu V mezi danými kmeny *Escherichia coli*. Kolicin V je tepelně stabilní látka, která vykazovala schopnost inhibice jiných příbuzných kmenů *E. coli*. Bakteriociny vzbuzovaly od tohoto data zájem vědců po celém světě. Následně po třech letech byla publikována antimikrobiální látka produkovaná bakteriemi mléčného kvašení, o jejíž objev se zasloužili vědci Rogers a Whittier. Na objev této látky navázali vědci Mattick a Hirsch, jimž se povedlo přečištění této látky, kterou následně pojmenovali jako nisin (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022).

Výraz bakteriociny byl poprvé použit v roce 1953. Tyto látky mohou být tvořeny bakteriemi grampozitivními i gramnegativními. Pozornost je však věnována zvláště bakteriím grampozitivním, konkrétně bakteriím mléčného kvašení, a to především z důvodu bezpečnosti, které bakterie mléčného kvašení a jejich produkty vykazují (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022).

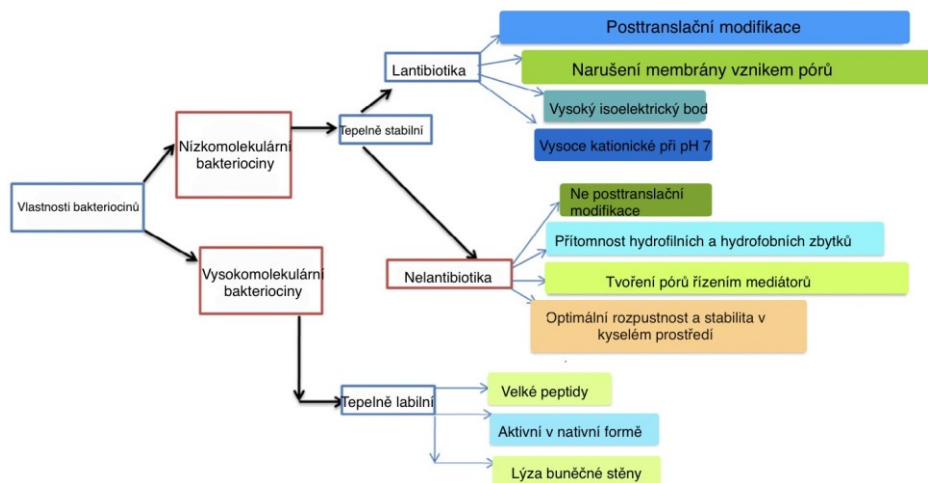
Důvodem, proč bakteriociny přitahují pozornost vědeckých pracovníků, je jejich široký význam a možnost využití v odlišných biotechnologických aplikacích (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022). Některé druhy bakteriocinů jsou zajímavé svou velkou specifitou proti klinickým patogenům, které bývají mnohdy rezistentní k většímu počtu léčiv (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022). Konkrétně rezistence vůči antibiotikům je do budoucna zvětšující se hrozba (Hernández-González et al., 2021). Specifita proti klinickým patogenům je významným faktorem v oblasti klinických aplikací, ve kterých začínají bakteriociny bývat používány jako substituce antibiotik (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022). Výhodnou vlastností bakteriocinů oproti antibiotikům je také jejich relativní jednoduchost mechanismu biosyntézy, která usnadňuje bioinženýrské kroky ke zvýšení jejich specifity, účinnosti a rozmanitosti antimikrobiálního působení (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022).

Bakteriociny byly nejprve používány jako přírodní látky vykazující biokonzervační účinky, následně jako určitá forma alternativy, či podpory při léčbě antibiotiky, a v současné době je jejich výzkum důležitým aspektem pro další nové možnosti využívání v nejrůznějších aplikacích (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022). Více informací o možnostech využití bakteriocinů je uvedeno v kapitole 5.

## 1.2 Dělení bakteriocinů

Bakteriociny jsou produkovány bakteriemi gramnegativními i grampozitivními. Mezi zástupce gramnegativních bakterií, které jsou producenty bakteriocinů, se řadí například *Pseudomonas*, *Shigella*, nebo *Escherichia coli*. Producenty ze skupiny grampozitivních bakterií jsou např. *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* a *Pediococcus* (Punia Bangar et al., 2022).

Pro získání informací ohledně více než 200 bakteriocinů existuje databáze BACTIBASE, v níž jsou uvedeny specifické antimikrobiální, fyzikálně-chemické a strukturní vlastnosti bakteriocinů (Soltani et al., 2020).



Obrázek 1 Dělení bakteriocinů dle vlastností  
(Ahmad et. al 2017)

V průběhu vědeckých bádání bylo navrženo mnoho různých způsobů systému klasifikace (Soltani et al., 2020). Vzhledem k tomu, že jsou bakteriociny vysoce heterogenní skupinou molekul, se tyto systémy klasifikace v průběhu let často mění dle nového vývoje, který se týká struktur a způsobů účinku bakteriocinů (Fernandes a Jobby, 2022, Soltani et al., 2020).

Dle klasifikace vytvořené Cotterem, Rossem a Hillem jsou bakteriociny grampozitivních i gramnegativních bakterií rozděleny do dvou tříd, které jsou založené pouze na přítomnosti, či nepřítomnosti posttranslačních modifikací. Dělení je zcela jasné a jednoduché, avšak zahrnuje pouze antimikrobiální peptidy, nikoliv proteiny, jako jsou např. koliciny (Soltani et al., 2020).

Toto dělení bylo aktualizováno na dvě hlavní třídy, které sdružují modifikované a nemodifikované bakteriociny (Soltani et al., 2020):

- **I. Třída–modifikované bakteriociny**

Jedná se o peptidy s molekulovou hmotností <5 kDa, obsahující posttranslační modifikace, které jsou zajištěné danými enzymy kódovanými v klastru genů pro bakteriocin. Díky modifikaci jsou tyto bakteriociny stabilnější vůči vysokým teplotám, extrémním hodnotám pH a proteolytickým enzymům než bakteriociny II. třídy (Soltani et al., 2020).

Účinek těchto bakteriocinů proti patogenům spočívá v zaměření jejich aktivity na skelet buněčné stěny, zejména grampozitivních bakterií (Ahmad et al., 2017).

Do této třídy spadají lantipeptidy, sactipeptidy, cirkulární peptidy a glykociny grampozitivních bakterií, lineární peptidy obsahující azol, lasopeptidy z grampozitivních i gramnegativních bakterií, a nukleotidové a sideroforové peptidy gramnegativních bakterií. Dále jsou do této třídy zařazovány i linaridiny a thiopeptidy, které jsou produkovány aktinobakteriemi a také kyanobaktiny produkované různými druhy sinic (Soltani et al., 2020).

- **II. Třída-nemodifikované bakteriociny**

V tomto případě se jedná o nemodifikované peptidy o hmotnosti 6-10 kDa, které mohou obsahovat disulfidové můstky. Bakteriociny této třídy se rozdělují dále do 3 podtříd: bakteriociny podobné pediocinu, bakteriociny rozdílné od pediocinu a dvoupeptidové bakteriociny (Soltani et al., 2020).

Další způsob dělení je klasifikace bakteriocinů produkovaných bakteriemi mléčného kvašení (BMK), tedy tzv. BMK bakteriocinů. Základ níže uvedeného dělení je dle Klaenhammera z roku 1993. Toto dělení bylo několikrát aktualizováno, naposledy v roce 2020. Očekává se, že do budoucna budou spolu s novými objevy přicházet další aktualizace klasifikace (Liu et al., 2022, Punia Bangar et al., 2022).

### **BMK bakteriociny:**

- **Třída I – Lantibiotika**

Jsou to polycyklické peptidy, které jsou navzájem rozlišitelné především podle termostability a rozsáhlosti posttranslačních modifikací (Punia Bangar et al., 2022). Tyto posttranslačně modifikované peptidy obsahují neobvyklé aminokyseliny jako jsou lantionin nebo  $\beta$ -metyllantionin (Veetil a Chitra, 2022). Lantibiotika jsou typická svou nízkou molekulovou hmotností, která je menší než 5 kDa. Tato třída se dále dělí na tyto podtřídy, u kterých jsou v závorce uvedeni daní zástupci (Punia Bangar et al., 2022):

- **Lantipeptidy** (nisin)
- **Cyklické bakteriociny** (karnocyklin A, enterocin AS 48)
- **Sactipeptidy** (subtilosin A)
- **Lineární azol obsahující peptidy** (streptolysin S)
- **Glykociny** (glykocin F)

- **Lasso peptidy** (mikrocin J 25)

- **Třída II**

Jedná se o tepelně stabilní nelantibiotika, která jsou typická svou molekulovou hmotností, která je menší než 10 kDa, a také hodnotou izoelektrického bodu kolísající v rozmezí od 8,3 do 10,0. Nelantibiotika se dále dělí do 4 podkategorií, které jsou i se zástupci uvedeny níže (Punia Bangar et al., 2022, Ahmad et al., 2017):

- **Bakteriociny podobné pediocinu (IIa)** – Do této podtřídy se řadí pediocin a enterocin.
- **Dvoupeptidové bakteriociny (IIb)** – Zástupcem je laktocin G.
- **„Leader-less“ bakteriociny (IIc)** – Do této skupiny patří laktocin B.
- **Pediocinu nepodobné bakteriociny (IId)** – Zástupcem je laktocin A.

- **Třída III**

Tato třída zahrnuje vysokomolekulární tepelně nestabilní a citlivé peptidy, jejichž molekulová hmotnost je větší než 30 kDa. Jsou taktéž nazývány jako bakteriolytisy. Zástupcem této třídy je helveticin J (Liu et al., 2022, Punia Bangar et al., 2022).

- **Třída IV**

Pro tuto třídu jsou charakteristické velké peptidy, které bývají většinou spojeny s uhlovodíkovými nebo lipidovými skupinami. Z tohoto důvodu jsou bakteriociny této třídy citlivé na glykolytické a lipolytické enzymy (Punia Bangar et al., 2022, Ahmad et al., 2017).

## 1.3 Bakteriociny bakterií mléčného kvašení

### 1.3.1 Charakteristika bakterií mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou grampozitivní, nesporotvorné, kataláza – negativní, anaerobní, aerotolerantní, či mikroaerofilní bakterie. Jsou snášenlivé vůči kyselinám, a generují kyselinu mléčnou, jakožto produkt fermentace sacharidů (Bergsma et al., 2022, Punia Bangar et al., 2022, Mokoena, Omatola a Olaniran, 2021). Kyselina mléčná je vysoce hygroskopická alifatická kyselina, která je dobře rozpustná ve vodě (Huang, Wanqiu

a Yu - Feng, 2023). Široké využití nalézá v potravinářském, chemickém, farmaceutickém a také kosmetickém průmyslu (Ojo a de Smidt, 2023).

Dle výsledných produktů metabolismu se BMK dělí na dvě skupiny. Homofermentativní BMK produkují z 1 molekuly glukózy 2 molekuly kyseliny mléčné a 2 molekuly adenosin trifosfátu (ATP). Oproti tomu heterofermentativní BMK přeměňují nejprve hexózy na pentózy, a výsledným produktem je 1 molekula kyseliny mléčné a 1 molekula ethanolu nebo kyseliny octové (Huang, Wanqiu a Yu-Feng, 2023).

Bakterie mléčného kvašení jsou typické svým velkým biotechnologickým potenciálem v potravinářském průmyslu, kde jsou známé pro svůj biokonzervační účinek (Punia Bangar et al., 2022, Crowley, Mahony a van Sinderen, 2013). BMK často nalézají uplatnění také jako probiotika, které mají pozitivní a podpůrný vliv na lidské zdraví, nebo se mohou používat jako startovací kultury do určitých druhů sýrů, kde mohou fungovat jako ochrana proti patogenní *Listeria monocytogenes* (Mazguene, 2023, Rangel - Ortega et al., 2023, Coelho, Malcata a Silva, 2022). V potravinářství se také hojně využívají především pro fermentaci mléčných, masných, zeleninových a pekařských výrobků (Suwanjinda, Eames a Panbangred, 2007).

Pro bakterie mléčného kvašení je typické, že jsou producenty řady různých metabolitů (Suwanjinda, Eames a Panbangred, 2007). Jedná se například o organické kyseliny, aminokyseliny, exopolysacharidy, vitamíny a hydroperoxydy, ale také o antimikrobiální látky, které mohou inhibovat růst nežádoucích či patogenních bakterií (Huang, Wanqiu a Yu-Feng, 2023, Zapašnik, Sokołowska a Bryła, 2022, Suwanjinda, Eames a Panbangred, 2007). Mezi tyto produkované antimikrobiální látky se řadí i bakteriociny (Suwanjinda, Eames a Panbangred, 2007).

### 1.3.2 BMK bakteriociny

I když bývají bakteriociny izolovány z mnoha mikroorganismů, BMK bakteriociny představují nejvíce známou a rozmanitou skupinu těchto látek (Punia Bangar et al., 2022).

Jedná se o peptidové molekuly se specifickými chemickými a fyzikálními vlastnostmi, které ovlivňují dané specifické interakce s cílovými buňkami (Todorov et al., 2022). Tyto molekuly umožňují zvýhodnit produkční organismus v podmínkách růstu oproti jiným bakteriálním druhům, důsledkem čehož je, že jsou jiné bakteriální druhy růstem překonány



a začlenění produkčního organismu do dané mikrobiální niky probíhá jednodušeji (Punia Bangar et al., 2022, Perez, Zendo a Sonomoto, 2022).

Ke znakům bakteriocinů produkovaných bakteriemi mléčného kvašení se řadí například tepelná stabilita, snášenlivost rozdílných hodnot pH a možnost odbouratelnosti proteolytickými enzymy (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022, Lahiri et al., 2022). Díky těmto vlastnostem nalézají BMK bakteriociny široké uplatnění v potravinářském průmyslu (Lahiri et al., 2022). Purifikované nebo částečně purifikované BMK bakteriociny, či bakterie mléčného kvašení bývají využívány nejčastěji jako ochranné látky přirozeného původu, což je technologická alternativa ke klasickým konzervačním látkám syntetického původu (Rasheed et al., 2021). Nejznámějším komerčně vyráběným bakteriocinem produkovaným BMK je nisin (Punia Bangar et al., 2022).

Nejvíce bakteriocinů produkovaných bakteriemi mléčného kvašení bylo izolováno převážně z rodu *Lactobacillus*. Tento rod byl v roce 2020 překlasifikován do 25 rodů. Taxonomie byla hodnocena na základě sekvencí celého genomu. Upraven byl také popis čeledi *Lactobacillaceae*, která nově zahrnuje všechny rody dříve řazené do čeledí *Lactobacillaceae* a *Leuconostocaceae* (Zheng et al., 2020). Mnoho autorů pro zjednodušení stále využívá zařazení do rodu *Lactobacillus*, které je pro zjednodušení využito i v této práci.

*Lactobacillus* se vyskytuje ve velkém počtu druhů, a ve velmi rozmanitých prostředích. BMK bakteriociny byly izolovány i z jiných bakterií. Příklady BMK bakteriocinů a jejich producentů jsou uvedeny níže (Rasheed et al., 2021).

### **Bakteriociny I. třídy**

- **Nisin**

Tento bakteriocin se řadí do třídy Ia BMK bakteriocinů a je produkovaný bakterií *Lactococcus lactis*. Mechanismem účinku je inhibice syntézy buněčné stěny, k čemuž jsou citlivé bakterie například *Staphylococcus aureus* nebo *Enterococcus*. Uplatnění nalézá nisin především v potravinářství (Banerji, Karkee a Saroj, 2022).

- **Lakticin**

Lakticin je zástupcem třídy Ib BMK bakteriocinů a produkčním mikroorganismem je také *Lactococcus lactis*. Využívá mechanismu účinku tvoření pórů v cytoplazmatické membráně. Citlivými bakteriemi jsou *Lactococcus lactis*, *Listeria*

*monocytogenes* a *Bacillus subtilis*. Lakticin se využívá v potravinářských aplikacích (Banerji, Karkee a Saroj, 2022).

### **Bakteriociny II. třídy**

- **Leukocin**

Leukocin se řadí do třídy IIa a je produkováný bakterií *Leuconostoc gelidum*. Využívá mechanismu účinku tvoření pórů v cytoplazmatické membráně a citlivou bakterií je *Listeria monocytogenes*. Uplatnění nalézá především jako přídavek do čistících nebo sanitačních prostředků (Banerji, Karkee a Saroj, 2022).

- **Pediocin PA-1**

Tento bakteriocin se řadí rovněž do třídy IIa a je produkováný bakterií *Pediococcus acidilactici*. Mechanismus účinku je stejný jako v předešlém případě. Mezi senzibilní bakterie se řadí *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. a *Escherichia coli*. Pediocin PA-1 nalézá své uplatnění v potravinářství (Banerji, Karkee a Saroj, 2022).

- **Acidocin A**

Acidocin A je také bakteriocinem příslušícím do třídy IIa. Producentem je *Lactobacillus acidophilus* a mechanismus účinku je využíván stejný jako u leucocinu a pediocinu PA-1. Citlivými bakteriemi jsou *Bacillus cereus* a *Staphylococcus aureus*. Využití nalézá acidocin A především v potravinářství (Banerji, Karkee a Saroj, 2022).

- **Laktokocin G**

Laktokocin G je zástupcem třídy IIb a je produkováný bakterií *Lactococcus lactis*. Využívá mechanismu účinku tvoření pórů v cytoplazmatické membráně a citlivými bakteriemi jsou *Lactococcus lactis* a *Streptococcus pneumoniae*. Uplatňuje se hlavně jako terapeutikum (Banerji, Karkee a Saroj, 2022).

- **Plantaricin**

Tento bakteriocin se řadí rovněž do třídy IIb a je produkováný bakterií *Lactiplantibacillus plantarum* (dříve *Lactobacillus plantarum*). K mechanismu účinku tvořením pórů v cytoplazmatické membráně jsou senzibilní bakterie

*Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus*. Podobně jako laktokocin G se plantaricin využívá jako terapeutikum (Banerji, Karkee a Saroj, 2022).

- **Laktokocin A**

Jedná se o zástupce třídy IIc, který je produkován bakterií *Lactococcus lactis*. Využívá mechanismu účinku tvoření pórů v cytoplazmatické membráně stejně jako u zástupců v předešlých případech a citlivou bakterií je *Lactococcus lactis*. Uplatnění nalézá především v potravinářství (Banerji, Karkee a Saroj, 2022).

### **Bakteriociny III. třídy**

- **Helveticin**

Tento bakteriocin je zástupcem třídy III a je produkován bakterií *Lactobacillus crispatus*. Usmrcuje citlivé bakterie (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* a *Enterobacter cloacae*) mechanismem narušení buněčné stěny. Využívá se jako biokonzervant v potravinách (Banerji, Karkee a Saroj, 2022).

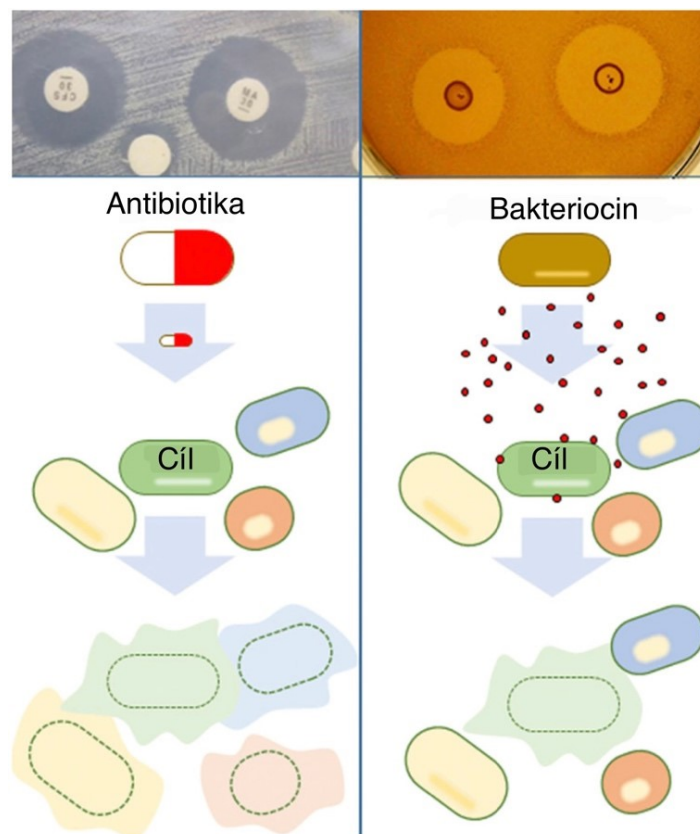
- **Plantaricin S**

Plantaricin S se řadí rovněž do třídy III a je produkován bakterií *Lactiplantibacillus plantarum* (dříve *Lactobacillus plantarum*). Mechanismus účinku je stejný jako v předešlém případě, tedy narušení buněčné stěny citlivé bakterie *Enterococcus faecalis*. Tento bakteriocin se uplatňuje stejně jako helveticin v biokonzervářském průmyslu (Banerji, Karkee a Saroj, 2022).

V současné době není k dispozici žádné dělení BMK bakteriocinů, které by bylo univerzálně přijato. V průběhu let bývá vědci často vytvořeno nové, či aktualizované schéma klasifikace bakteriocinů produkovaných bakteriemi mléčného kvašení (Punia Bangar et al., 2022).

## **1.4 Srovnání bakteriocinů s tradičními antibiotiky**

První vzájemnou odlišností je způsob syntézy. Bakteriociny jsou syntetizovány ribozomálně, zatímco antibiotika jsou označována jako takzvané sekundární metabolity, kdy jsou generována různými enzymy. Antibiotika jsou výhodnější tím, že vykazují širší spektrum účinku, oproti bakteriocinům, které jsou účinné jen na omezené druhy bakterií (Punia Bangar et al., 2022).



Obrázek 2 Spektrum účinku bakteriocinů a antibiotik  
(Mills, Ross a Hill, 2017)

Nevýhodou antibiotik je široké spektrum působení, důsledkem čehož je smrt necílených buněk, tedy okolní mikrobioty (viz Obrázek 2). Oproti antibiotikům bakteriociny působí pouze na specifický cíl, a tím pádem negativně neovlivňují okolní mikrobiotu (Mills, Ross a Hill, 2017).

Rozdíl je také v rozmezí ideálních podmínek. Bakteriociny nevyžadují úzce specifické podmínky působení, ale jsou účinné v širokém rozmezí teplot i pH. Liší se i mechanismem účinku a množstvím, které je zapotřebí k projevení antimikrobní aktivity. Bakteriocinu je k projevení účinku potřebné velmi malé množství oproti antibiotiku (Punia Bangar et al., 2022).

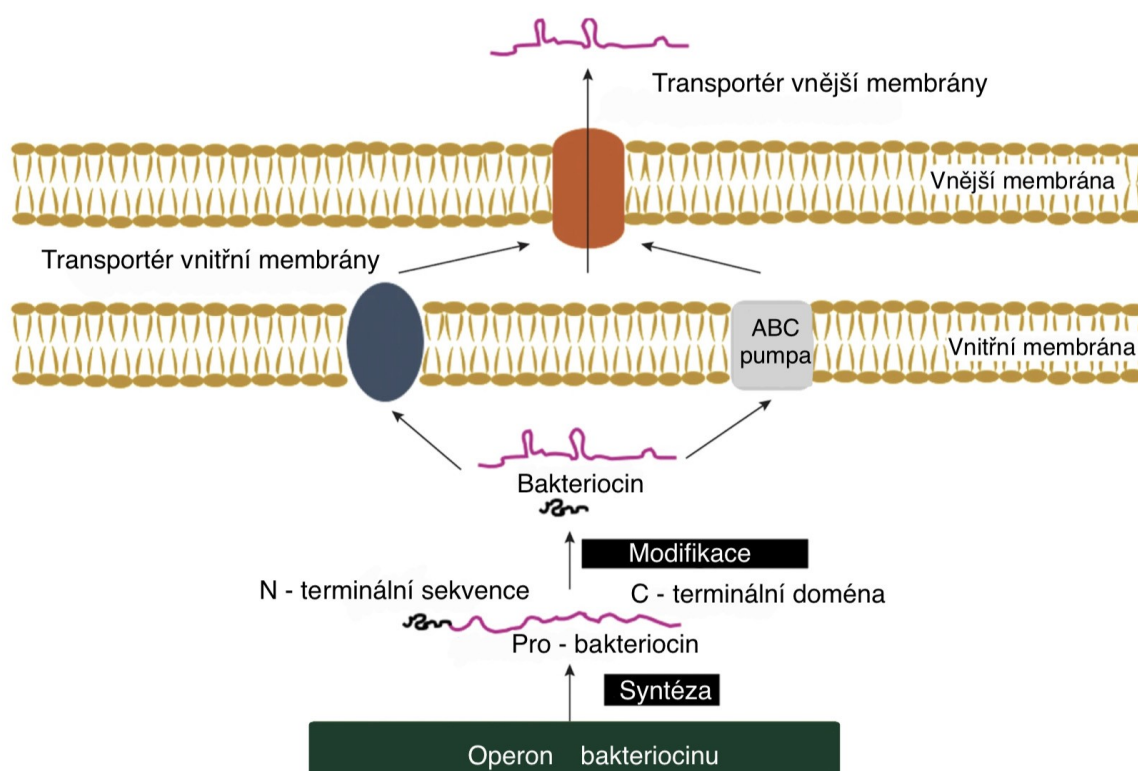
Výhodnou vlastností bakteriocinů je také to, že nepůsobí negativně na střevní mikroflóru (Punia Bangar et al., 2022). Bezpečnost aplikace bakteriocinů je ověřena mnoha studiemi, které potvrdily, že tyto přírodní látky nevykazují, až na výjimky, žádné prokazatelné vedlejší účinky (Ahmad et al., 2017).

V současnosti jsou bakteriociny považovány za vhodnou přírodní alternativu k antibiotikům (Punia Bangar et al., 2022). Jejich poměrně jednoduchý mechanismus biosyntézy

je do budoucna zvýhodňuje oproti antibiotikům i v bioinženýrství, jelikož je výrazně jednodušší manipulovat s geny bakteriocinu tak, aby mohly být zacíleny proti specifické skupině bakterií (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022). Tato podstata by mohla znamenat zavedení nových terapeutických možností, které by mohly snížit celkové využívání tradičních antibiotik (Pérez-Ramos et al., 2021).

## 2 MECHANISMUS VZNIKU BAKTERIOCINŮ

Bakteriociny jsou molekuly proteinového charakteru, které bývají syntetizovány ribozomálně, a které při určitých koncentracích vykazují silnou antimikrobiální aktivitu (Soltani et al., 2020). K řízení syntézy bakteriocinu slouží geny umístěné buďto v chromozomální deoxyribonukleové kyselině (DNA), nebo geny lokalizované v plazmidu (Punia Bangar et al., 2022, Kaur Sidhu a Nehra, 2021). Tyto geny se většinou mezi jednotlivými bakteriociny navzájem liší (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022, Punia Bangar et al., 2022).



Obrázek 3 Schéma biosyntézy bakteriocinů  
(Banerji, Karkee a Saroj, 2022)

Ve většině případů bývají tyto molekuly syntetizovány (viz Obrázek 3) jako neaktivní tzv. prekurzorové peptidy obsahující C – terminální propeptidovou doménu a N – terminální vedoucí sekvenci (Antoshina, Balandin a Ovchinnikova, 2022). Tyto molekuly obsahují tzv. ochranný přijímač transportního signálu, který je určen k transportu peptidu do vnějšího prostředí, tedy ven z buňky, pomocí tzv. transportního proteinového systému (pumpy) ABC (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022, Kaur Sidhu a Nehra, 2021, Soltani et al., 2020, Ahmad et al., 2017).

ABC transportní systémy (pumpy) v eukaryotických a prokaryotických buňkách slouží k pronikání různých látek skrz membránu. Příkladem těchto látek jsou vitamíny, fosfáty, aminokyseliny, ionty, peptidy, proteiny a také polysacharidy (Kaur Sidhu a Nehra, 2021).

Vedoucí peptidy jsou látky, které chrání producenta bakteriocinu tím, že udržují bakteriocin v neaktivní formě. Jakmile dojde k sekreci bakteriocinu ven z buňky, je tento vedoucí peptid odštěpen pomocí transportéru nebo proteáz. Imunita buněk produkujících bakteriocin může být zprostředkována také tzv. imunitními proteiny, které produkční buňku chrání před účinkem bakteriocinu, a které jsou produkovány tzv. imunitními geny (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022, Kaur Sidhu a Nehra, 2021). Imunitní mechanismy se u jednotlivých bakteriocinů většinou liší (Pérez-Ramos et al., 2021).

V určitých případech dochází u prekurzorových peptidů před exportem mimo buňku k někdy i rozsáhlým posttranslačním úpravám (Soltani et al., 2020, Mills, Ross a Hill, 2017).

Mechanismus regulace biosyntézy je u gramnegativních a grampozitivních bakterií rozdílný. Je známo, že biosyntéza bakteriocinu bývá regulována vícesložkovým systémem, jehož součástí je: 1) signální peptid, 2) receptor, zabudovaný v buněčném povrchu, vázající signální peptid, a 3) regulátor odpovědi. V současné době bohužel není tento mechanismus regulace přesvědčivě a detailně objasněn, proto je předmětem dalšího vědeckého bádání (Kaur Sidhu a Nehra, 2021, Ahmad et al., 2017).

### 3 MECHANISMUS ÚČINKU BAKTERIOCINŮ

#### 3.1 Princip mechanismu účinku bakteriocinů

U bakteriocinů se mechanismy antimikrobiálního působení navzájem liší v závislosti na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech, a také podle toho, zdali jsou, či nejsou posttranslačně modifikovány (Soltani et al., 2020). Rozsah antimikrobiálního působení bakteriocinů je určen jednak způsobem účinku bakteriocinu, ale také přítomností specifického receptoru, který se vyskytuje v cílovém citlivém bakteriálním kmenu (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022).

Z odborné literatury vyplývá, že různé třídy bakteriocinů dokáží působit různými mechanismy účinku proti gramnegativním a grampozitivním bakteriím. Mechanismus účinku spočívá buďto v narušení integrity buněčné stěny, nebo v inhibici či zamezení syntézy proteinů nebo nukleových kyselin (Liu et al., 2022, Ahmad et al., 2017).

Některé z bakteriocinů jsou charakteristické využíváním více způsobů mechanismů účinku proti citlivým buňkám (zástupcem této skupiny bakteriocinů je například nisin A), zatímco jiné bakteriociny využívají pouze jediný způsob mechanismu účinku. Převážná část bakteriocinů cílí své působení na buněčný obal bakterií (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022, Kaur Sidhu a Nehra, 2021).

Mnoho bakteriocinů, hlavně II. třídy, jsou kationtové povahy. Elektrostatické interakce mezi bakteriociny kationtové povahy a záporně nabitými složkami (například fosfolipidy, teichoové kyseliny grampozitivních bakterií, či lipopolysacharid gramnegativních bakterií), které jsou obsaženy v cytoplazmatické membráně bakterie, jsou základním principem, který zahajuje antimikrobiální aktivitu. Vznikající vazba mezi těmito látkami může být příčinou tzv. inzerce bakteriocinu do cytoplazmatické membrány, což vede k vytvoření pórů, kterými unikají důležité buněčné metabolity, jako jsou aminokyseliny, adenosintrifosfáty (ATP) nebo ionty hořčíku a draslíku. Únik tohoto obsahu z buněk poté vede k buněčné smrti (Soltani et al., 2020).

K lýze buňky může docházet také skrz uvolnění a aktivaci autolytických enzymů, které vznikají interakcí bakteriocinu se složkami buněčné stěny grampozitivních bakterií. Další možností mechanismu působení určitých bakteriocinů je interference se syntézou nukleových kyselin. Bakteriociny jsou účinné také mechanismem narušování různých transportérů umožňujících příjem živin nebo narušením funkce enzymů, které figurují



v základních metabolických procesech buňky. K odumírání mikrobiálních buněk může docházet také inhibicí klíčení spor bakterií (Soltani et al., 2020).

Vnější membrána gramnegativních bakterií funguje jako poměrně účinná bariéra proti kationtovým bakteriocinům produkovaným grampozitivními bakteriemi, což znamená, že gramnegativní bakterie jsou vůči kationtovým bakteriocinům odolnější. Bakteriociny gramnegativních bakterií jsou schopny tuto bariéru překonávat lépe. Využívají tzv. porinů, kterými se dostávají do periplazmatického prostoru buněk (Soltani et al., 2020).

Ukázkou různých mechanismů účinku bakteriocinů je například nisin působící na cytoplazmatickou membránu gramnegativních bakterií, nebo mersacidin, který je schopen usmrcovat grampozitivní bakterie omezením syntézy buněčné stěny. Dalším příkladem je bakteriocin lysostaphin, spadající do třídy III, který dokáže usmrtit *Staphylococcus aureus* lýzou buněčné stěny. Koliciny, které vykazují antimikrobiální aktivitu proti gramnegativním bakteriím, usmrcují tyto bakterie různými způsoby, mezi které se řadí tvorba pórů v membráně, či inhibice biosyntézy proteinů nebo nukleových kyselin. Bakteriocin pesticin usmrcuje gramnegativní bakterie, konkrétně *Yersinia* spp. a *Escherichia coli*, degradací buněčné stěny, kdy principiálně dochází k porušení glykosidických vazeb v membráně (Ahmad et al., 2017).

### 3.2 Rezistence a mechanismus rezistence k bakteriocinům

Patogenní bakterie mohou mít přirozenou, to znamená vrozenou rezistenci k bakteriocinům, která je popsána u konkrétních rodů nebo druhů. Rezistence může být také určitými citlivými kmeny získána. Přesná definice pro rezistenci k bakteriocinu není v literatuře popsána, jsou však charakterizovány některé konkrétní případy, u kterých jsou popsána kritéria, kterými byla rezistence prokázána. Jedním z příkladů je rezistence bakterie *Listeria monocytogenes* na bakteriocin nisin. Tato rezistence je popsána jako více než desetinásobné zvýšení minimální inhibiční koncentrace, a také dalšími parametry, které se týkají schopnosti růstu tohoto patogena na agarových půdách v přítomnosti bakteriocinu (Ahmad et al., 2017).

Mnoho z bacilů, například *Bacillus cereus*, produkuje enzym nisinázu, který je schopen degradace C - terminálního lantioninového kruhu bakteriocinů nisinu a subtilinu. Byl publikován také popis degradace lantibiotika sublancinu, pomocí proteázy, která je zabudována v membráně (Ahmad et al., 2017).

## 4 METODY STANOVENÍ PRODUKCE BAKTERIOCINŮ

Pro získání nových druhů bakterií, které jsou producenty bakteriocinu, je nutné provádět skríníng pro schopnost produkce těchto antimikrobiálních látek. Většinou bývají bakterie, které vykazují schopnost produkce bakteriocinu, izolovány ze vzorků půdy nebo potravin. Nejčastěji se jedná o mléčné produkty, či jiné druhy fermentovaných potravin. V závislosti na zdrojích, ze kterých bylo záměrem tyto bakterie získat, byly vyvinuty a optimalizovány různé systémy a metody skríníngu produkce bakteriocinů (Juturu a Wu, 2018).

### 4.1 Plotnové metody

#### 4.1.1 Vícejamková destička pro detekci bakteriocinů

Jedná se o metodu sloužící k prokázání produkce bakteriocinů, nebo bakteriocinům podobných inhibičních látek z kefirových zrn a z fermentovaného mléka. Je testována citlivost vybraných indikátorových organismů (*E. coli* O157:H45 a *Listeria innocua* DPC1770) k bakteriocinům produkovaným danými BMK nacházejících se v testované potravinové matrici. Celková inhibice nebo snížení počtu kolonií tvořících jednotek na ml (CFU/ml) indikuje expresi bakteriocinu nebo inhibičních proteinů (Juturu a Wu, 2018).

#### 4.1.2 Metoda „sendvičové“ vrstvy

Tato metoda je používána pro skríníng bakteriocin produkujících bakterií mléčného kvašení, které jsou získávány z potravin a z živočišných zdrojů. Principem této metody je vyšetí testovaného vzorku na misky s agarem „de Mann, Rogosa a Sharpe“ (MRS), převrstvení druhou vrstvou agaru MRS, a po inkubaci a zřetelném nárůstu kolonií převrstvení třetí vrstvou soft agaru s indikátorovým organismem. Produkce bakteriocinu u kolonií viditelných na miskách se projevuje vznikem inhibiční zóny v důsledku difúze produkovaného bakteriocinu do horní vrstvy soft agaru (Juturu a Wu, 2018).

#### 4.1.3 Metoda dvojitě vrstvy agaru pro konfirmaci bakteriocin produkujících kolonií

Principem této metody je naočkování kolonií otestovaných na schopnost produkce bakteriocinu v předchozím skríníngu na 2 misky s MRS agarem. Misky jsou po 4 hodinách inkubace převrstveny soft agarem s indikátorovým mikroorganismem a inkubovány za podmínek vhodných pro tento indikátorový mikroorganismus. Po inkubaci je sledována tvorba inhibičních zón kolem kolonií (Juturu a Wu, 2018).

#### 4.1.4 Agarový jamkový difúzní test

Tato metoda se využívá pro skríníng bakterií mléčného kvašení produkujících bakteriocin. Bývají využívány indikátorové organismy citlivé k bakteriocinům. Principem je zaočkování těchto indikátorových organismů do MRS soft agaru, který je ponechán k utužení v Petriho misce. Po zatužení jsou vyříznuty jamky, do kterých je pipetován zneutralizovaný supernatant BMK. Po inkubaci je jako pozitivní výsledek vnímána tvorba zóny inhibice kolem jamek. Tato metoda se standardně provádí ve třech opakováních, pro ověření a potvrzení správnosti výsledků (Parlindungan et al., 2021, Juturu a Wu, 2018).

#### 4.1.5 „Agar spot test (spot on the lawn)“

Metoda byla vynalezena pro skríníng antimikrobiální aktivity producentů bakteriocinů izolovaných z mléka a mléčných výrobků (Rahmeh et al., 2019, Juturu a Wu, 2018).

Principem této metody je předkultivace kultury v MRS bujónu, její nanesení na plotny s agarem (MRS, M17 nebo „Brain heart infusion (BHI)“), inkubace a následné převrstvení BHI soft agarem, který je inokulován indikátorovým mikroorganismem. Přítomnost zřetelné jasné zóny inhibice po inkubaci znamená potvrzení pozitivního výsledku antagonismu. Tato metodika se provádí ve třech opakováních, pro ověření a potvrzení správnosti výsledků (Parlindungan et al., 2021, Rahmeh et al., 2019, Juturu a Wu, 2018).

## 4.2 Metoda PCR

Objev metody „Polymerase chain reaction“ neboli polymerázové řetězové reakce (PCR) způsobil v roce 1985 revoluci v detekci a identifikaci patogenních organismů v klinických laboratořích (Carter et al., 2010, Schuller et al., 2010). Jedná se o metodu, která se používá k namnožení neboli amplifikaci specifického úseku DNA, a která se zakládá na principu komplementarity bazí (Bártová, 2011).

Syntéza kopií úseků DNA probíhá dle templátové DNA za účasti enzymu DNA-polymerázy. Jednořetězové vlákno sloužící jako templát a získá se denurací dvouřetězové DNA. Na templátu je následně za pomoci dvou primerů vymezen úsek DNA, který bude amplifikován. Primery jsou chemicky syntetizované krátké oligonuklotidy, které se připojují ke komplementárním úsekům řetězců DNA (Bártová, 2011).

Samotný průběh cyklu PCR, který obvykle probíhá 25 až 35x, se skládá ze tří fází (viz Fáze PCR), ke kterým se dále řadí počáteční denaturace (94 °C, 2-5 min) a závěrečná polymerační reakce 72 °C, 5 min (Bártová, 2011).

### **Fáze PCR:**

1) **Denaturace** neboli rozvolnění řetězců DNA probíhá vlivem vysoké teploty 94 až 95 °C po dobu 20 až 45 s.

2) „**Annealing**“ neboli označení pro nasedání primerů na vlákno DNA probíhá při teplotě 50 až 60 °C, po dobu 30 až 90 s.

3) „**Extension**“ je označení pro polymerační reakci, při níž dochází k syntéze komplementárního řetězce DNA. Vše probíhá za účasti DNA polymerázy, která nasedne na primery a připojuje volné nukleotidy k vláknu DNA. Tento proces probíhá na základě principu komplementarity dusíkatých bází při definované teplotě 72 °C (optimum pro *Taq* DNA polymerasu), v rozmezí 45 až 90 sekund (Bártová, 2011). Touto metodou se provádí detekce genů kódujících příslušné bakteriociny u mikroorganismů izolovaných ze vzorků potravin nebo jiných matric. Oproti jiným metodám je poměrně jednoduchá a uživatelsky přívětivější, protože není nutné používat jiné náročnější metody skrínungu a následného čištění proteinů. Nevýhodou je nutnost sekvenace a literárního průzkumu ke zjištění potřebných informací, což je časově náročné. V budoucnu by proto mohlo být nejvýhodnější využívat metodu detekce pomocí „High-performance liquid chromatography“ neboli vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Juturu a Wu, 2018).

Principem této metody je navržení primerů dle publikovaných genů kódujících bakteriocin v databázi „National Center for Biotechnology Information“ neboli Národní centrum pro biotechnologické informace (NCBI), a následném provedení PCR amplifikace bakteriocinových genů na genomové DNA potenciálních produkčních kmenů (Juturu a Wu, 2018).

Navržení primerů je uzpůsobeno tak, aby poskytly amplikony různých velikostí, usnadňujících identifikaci jakýchkoli genů pro produkci bakteriocinu. Například PCR amplikony o velikosti 332, 412 a 608 párů bází (bp) indikují přítomnost genů pro pediocin, enterocin a nisin. Přítomnost či nepřítomnost amplikonů je následně zjišťována gelovou elektroforézou (Suwanjinda, Eames a Panbangred, 2007).

## 5 MOŽNOST VYUŽITÍ BAKTERIOCINŮ

### 5.1 Současný význam a možnost využití

V dnešní době mají bakteriociny velký význam v široké škále aplikací. Jedná se především o možnost využívání v potravinářských a lékařských aplikacích. Pro daná uplatnění jsou nejdůležitější informace ohledně bezpečnosti a toxicity bakteriocinů. Musí být provedeno mnoho testů, které vyžadují velkou pozornost, aby byla potvrzena bezpečnost bakteriocinů. Bakteriociny musí splnit definované podmínky těchto časově náročných testů, aby mohly být zákonně schváleny jako bezpečné a spolehlivé konzervační nebo terapeutické látky (Soltani et al., 2020).

#### 5.1.1 Potravinářství

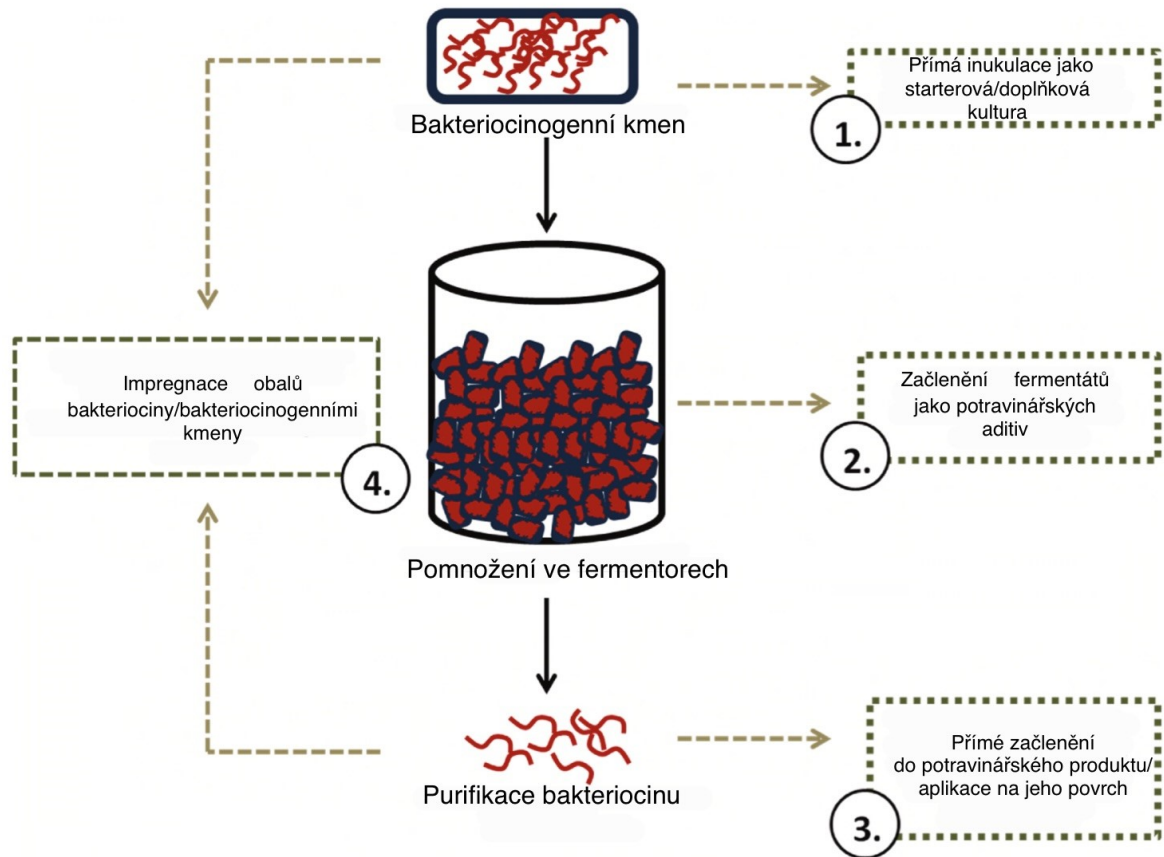
Bakteriociny, jakožto přírodní látky vykazující antimikrobiální aktivitu, byly v potravinářském průmyslu zkoumány jako vhodná alternativa k chemickým konzervantům, a to především z důvodu rostoucích požadavků spotřebitelů na bezpečné potraviny s minimálním zpracováním (Eghbal, Viton a Gharsallaoui, 2022, Choi, Holzapfel a Todorov, 2022, Soltani et al., 2020).

Využívání bakteriocinů v potravinářském průmyslu má velký význam, protože zajišťuje bezpečnost potravin několika způsoby. Především je to snížení počtu mikroorganismů způsobujících kažení potravin, snížení počtu patogenů v potravine, minimalizace používání jiných chemických konzervantů, a v neposlední řadě také vývoj tzv. nových potravin, které jsou minimálně opracované. Všechny výše zmíněné možnosti využití mají také velký význam ve smyslu snížení ekonomických ztrát, které mohou být způsobeny kažením potravin (Punia Bangar et al., 2022, Juturu a Wu, 2018).

Bakteriociny se velmi často využívají jako součásti obalů potravin, do kterých jsou spolu s jinými konzervanty začleněny a vykazují tak synergický účinek ke zvýšení údržnosti potravin. Zároveň jsou bez zápachu, ani nijak neovlivňují sensorické vlastnosti potravin (Soltani et al., 2020, Ahmad et al., 2017, Mills, Ross a Hill, 2017).

Daná potravina může být doplněna bakteriocinem, který je aplikován buďto formou složky, která je dopředu fermentována bakteriocinogenní kulturou (kultura může být využita jako startovací, ochranná, či doplňková) nebo také formou přímo purifikovaného bakteriocinu (viz Obrázek 4) (Bhattacharya et al., 2022, Punia Bangar et al., 2022).

Purifikovaný bakteriocin musí být schválený různými agenturami, čímž získává status bezpečnosti (Punia Bangar et al., 2022).



Obrázek 4 Běžně používané strategie pro aplikaci bakteriocinu v potravinářství (Punia Bangar et al., 2022)

Možnost využívání bakteriocinu označovaného nisin, jakožto konzervantu v potravinách, byla poprvé schválena roku 1969 Organizací pro výživu a zemědělství, Organizací spojených národů a Světovou zdravotnickou organizací. V roce 1988 byla jeho aplikace schválena i Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Punia Bangar et al., 2022, Ahmad et al., 2017). V současné době je využívání nisinu při produkci potravin schváleno asi v padesáti státech světa (Rasheed et al., 2021).

Přesněji se nisin společně s laurovou kyselinou aplikoval do plastové fólie pro potraviny na bázi sóji pro inhibici růstu bakterie *Listeria monocytogenes* (Ahmad et al., 2017).

Nisin se uplatňuje také především v mlékárenském a konzervářském průmyslu. Je velmi účinný proti grampozitivním bakteriím, které jsou patogenní, konkrétně proti bakterii *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes* (Punia Bangar et al., 2022).

Bakteriociny podléhají dlouhému procesu schvalování, jelikož existují velké požadavky na jejich bezpečnost, což je i důvod pro dlouhodobý výzkum. Dnes je schválený a komerčně dostupný pouze nisin a pediocin PA-1, které se prodávají pod názvem Nisaplin TM a ALTATM 2431 (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022). Bakteriociny lze komerčně pořídit i ve formě bioaktivních prášků, pod názvy MicroGARD a DuraFresh. Tyto prášky jsou účinné proti bakteriím, plísním i kvasinkám (Soltani et al., 2020). Tyto dané komerčně dostupné látky nesou označení jako tzv. biokonzervační látky (Punia Bangar et al., 2022).

Bakteriociny, které jsou vylučovány bakteriemi mléčného kvašení, jsou v potravinářském a konzervářském průmyslu považovány za nejvíce vhodnou alternativu, která by mohla nahradit syntetické konzervační látky. Především je to z důvodu jejich netoxické povahy, tzn. bezpečnosti, pro eukaryotické buňky. Výhodou by mělo být také snížení rizika šíření potravinových patogenů, nebo prodloužení trvanlivosti a bezpečnosti potravin, které nejsou vůbec, nebo jsou pouze omezeně ošetřeny syntetickými konzervanty (Rasheed et al., 2021).

### 5.1.2 Lékařství

V současné době je již známo mnoho způsobů využití bakteriocinů v medicíně, především jako tzv. bakteriocinových léků (Ahmad et al., 2017). Tyto léky zastávají úlohu např. v ochraně lidského těla, kdy pomocí různých mechanismů inhibují patogenní bakterie, viry, nebo je také známo, že brání migraci a proliferaci rakovinných buněk, u kterých podporují procesy apoptózy a nekrózy (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022). Dále lze pomocí bakteriocinů léčit samotné tumory, což je velmi výhodné oproti konvenční léčbě, protože bakteriociny lze selektivně zacílit přímo na nádorové buňky bez známek toxicity pro okolní „normální“ buňky (Yaghoubi et al., 2022). Bakteriociny také brání systémovým infekcím těla, které jsou způsobovány bakteriemi, mezi které se řadí např. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter* spp., *Samonella* spp. či *Escherichia coli* (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022). Další oblastí využití je také léčba infekcí získaných v nemocnicích, infekcí horních dýchacích cest, urogenitálního traktu, nebo léčba peptického vředu a různých onemocnění kůže (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022, Ahmad et al., 2017). Bakteriociny se také mnohdy vyskytují jako přídavek do produktů používaných v zubní hygieně. (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022, Ahmad et al., 2017). Zajímavou vlastností bakteriocinů je také schopnost modulace nativní mikrobioty hostitele, čímž ovlivňují funkčnost a účinnost imunity, a tím pozitivně působí na jeho zdraví (Anjana a Tiwari, 2022).

## 5.2 Význam a šance využití v budoucnosti

Bakteriocinům je do budoucna přikládán velký význam především z důvodu jejich antimikrobiální aktivity, kterou vykazují proti mnoha patogenním mikroorganismům (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022). Pozornost vědců při hledání nových možností využití se v posledních letech zvyšuje (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022). Hlavním z důvodů hledání nových možností využití je vysoká účinnost bakteriocinů proti infekčním bakteriím, které jsou typické nízkou schopností vývoje rezistence k bakteriocinům (Le, Kawada - Matsuo a Komatsuzawa, 2022). Je kladen velký důraz k objevování nových druhů bakteriocinů, které jsou typické svými efektivními mechanismy likvidace patogenů, především patogenů multirezistentních, jejichž počet v poslední době roste (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022). Příslibem do budoucna je také využívání biotechnologických technik, které by měly vést k více efektivní produkci bakteriocinů, či ke zvýšení aktivity bakteriocinů proti daným patogenům (Daba, Elnahas a Elkhateeb, 2022).

### 5.2.1 Potravinářství

V současné době je pro rozšíření aplikace bakteriocinů v potravinářství nutný další výzkum. Dle legislativy musí pro další možnosti využívání proběhnout schválení dalších druhů bakteriocinů, abychom je mohli v potravinách pokládat za bezpečná aditiva. Kromě časově náročného procesu schvalování je další výzvou také velkovýroba již komerčně dostupných bakteriocinů. Vlastnosti, jako je čistota přečištěného bakteriocinu, či požadavky pro dlouhodobou stabilitu během skladování, jsou náročné na dosažení, a to především z důvodu vysokých nákladů. Pro rozšíření využívání bakteriocinů v potravinářství je třeba vymyslet varianty technologické výroby, které budou ekonomicky efektivní (Soltani et al., 2020).

### 5.2.2 Lékařské aplikace

V dnešní době se hojně diskutuje o dalších možných formách antikoncepce, mezi které můžeme zařadit i potenciální využití bakteriocinů. Konkrétně nisin, subtilosin a fermenticin se stávají důležitými látkami, které vykazují spermicidní aktivitu a mohly by být využívány jako součást antikoncepčních přípravků (Soltani et al., 2020, Ahmad et al., 2017).



### 5.2.3 Veterinární medicína

Antibiotická rezistence je do budoucna zvětšující se hrozba, jejímž řešením by mohly být bakteriociny, které mohou naplnit svůj potenciál i v prevenci a léčbě nemocí, které postihují zvířata. Tyto peptidy jsou charakteristické nižšími předpoklady pro rozvoj rezistence, než jako je tomu u konvenčních antibiotik. Některé nedávné studie nám naznačují jejich roli, např. jako probiotik či imunomodulátorů u zvířat. Bakteriociny se proto zdají být významnou a mimořádnou alternativou k využití ve veterinární medicíně (Hernández-González et al., 2021).

Potencionální využití by mělo spočívat v použití bakteriocinů nebo přímo jejich produkčních kmenů jako přísad do krmiv pro zvířata či pro akvakultury (Pereira et al., 2022, Soltani et al., 2020). Například bakteriociny gramnegativních bakterií, jako jsou mikrocin J25 a kolicin E1, se zdají být účinné pro kontrolu salmonely u drůbeže, nebo např. jako vhodná podpora růstu selat (Soltani et al., 2020).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části této bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši týkající se tématu charakterizace a dělení bakteriocinů produkovaných grampozitivními bakteriemi, využití bakteriocinů a metod stanovení produkce bakteriocinů.

V praktické části práce bylo cílem izolovat grampozitivní bakterie z vybraných potravin, provést jejich identifikaci, ověřit, zdali vykazují schopnost produkce antimikrobních látek – bakteriocinů, zpracovat a zhodnotit získané výsledky a zformulovat závěry práce.

## 7 MATERIÁL

Níže jsou uvedeny použité pomůcky, přístroje, roztoky, chemikálie a kultivační půdy.

### 7.1 Pomůcky a přístroje

Sterilní bakteriologické kličky, hokejky, Pasteurovo kapátko, sáčky určené k homogenizaci vzorku, destilovaná voda, podložní sklíčka, imerzní olej, oxidázový test, automatické mikropipety, sterilní špičky, zkumavky Eppendorf, dávkovače, kryokrabičky, laboratorní sklo (zkumavky, Petriho misky, lahve, kádinky, odměrné válce).

Biohazard box (box s laminárním prouděním), laboratorní předvážky, stomacher, autokláv, vortex, termostaty pro kultivaci, lednice, mrazicí box, box pro vodní lázeň, kahan, optický mikroskop Olympus CX41, fotoaparát Canon EOS 1100 D.

### 7.2 Roztoky a chemikálie

- 0,85% fyziologický roztok.
- Krystalová violet.
- Lugolův roztok.
- Aceton.
- Safranin.
- 3% roztok peroxidu vodíku ( $H_2O_2$ ).
- 3% roztok hydroxidu draselného (KOH).
- 30% roztok glycerolu.
- 96% ethanol (denaturovaný).

### 7.3 Kultivační půdy

Pro mikrobiologický rozbor byly použity tyto kultivační média (výrobce HiMedia, Bombai, Indie):

- **MRS agar („de Mann, Rogosa a Sharpe agar“)**

Toto kultivační médium slouží k izolaci, kultivaci a stanovení počtu mléčných tyčinek.

**Složení:**

Proteosový pepton (10 g / 1000 ml)

Hovězí extrakt (10 g / 1000 ml)

Kvasničný extrakt (5 g / 1000 ml)

Dextróza (20 g / 1000 ml)

Polysorbát 80 (1 g / 1000 ml)

Citran amonný (2 g / 1000 ml)

Octan sodný (5 g / 1000 ml)

Síran hořečnatý (0,1 g / 1000 ml)

Síran manganatý (0,05 g / 1000 ml)

Fosforečnan draselný (2 g / 1000 ml)

Agar (12 g / 1000 ml)

pH (při 25 °C) 6,5±0,2

- **M17 agar**

Na plotnách s M17 agarem se provádí kultivace a stanovení mléčných koků (streptokoky, leukonostoky a laktokoky).

**Složení:**

β-glycerfosfát disodný (19 g / 1000 ml)

Sojový pepton (5 g / 1000 ml)

Trypton (5 g / 1000 ml)

HM pepton B (5 g / 1000 ml)

Kvasničný extrakt (2,5 g / 1000 ml)

Kyselina askorbová (0,5 g / 1000 ml)

Síran hořečnatý (0,25 g / 1000 ml)

pH (při 25 °C) 6,9 ± 0,2

- **PCA („Plate count agar“)**

Toto kultivační médium bylo využito ke stanovení celkového počtu mikroorganismů.

**Složení:**

Kaseinový enzymatický hydrolyzát (5 g / 1000 ml)

Kvasničný extrakt (2,5 g / 1000 ml)

Dextróza (1 g / 1000 ml)

Agar (15 g / 1000 ml)

Indikátor růstu (0,1 g / 1000 ml)

Sladový extrakt (30 g / 1000 ml)

Mykologický pepton (5 g / 1000 ml)

Médium využitě ke kultivaci a přípravě izolátů na identifikaci MALDI-TOF a pro kultivaci indikátorových mikroorganismů (výrobce HiMedia, Bombai, Indie):

- **BHI („Brain heart infusion agar“)**

Toto kultivační médium neboli infuze mozkové a srdeční tkáně slouží pro všeobecné využití ke kultivaci široké škály bakterií a hub.

**Složení:**

HM prášková infuze (12,5 g / 1000 ml)

BHI prášek (5 g / 1000 ml)

Proteosový pepton (10 g / 1000 ml)

Dextróza (glukóza) (2 g / 1000 ml)

Chlorid sodný (5 g / 1000 ml)

Hydrogenfosforečnan sodný (2,5 g / 1000 ml)

Agar (10 g / 1000 ml)

pH (při 25 °C) 7,4±0,2

### 7.3.1 Příprava kultivačních pūd:

Pro přípravu kultivačního bujónu bylo dané množství kultivačního média dle informací výrobce, uvedených na obalu, naváženo na laboratorních váhách do skleněné lahve. Následně bylo do lahve přidáno požadované množství destilované vody a byla provedena důkladná homogenizace. Poté byl pomocí dávkovače pipetován požadovaný objem média do zkumavek umístěných ve stojanu. Zkumavky byly opatřeny víčky a vloženy do autoklávu ke sterilizaci.

Příprava kultivačního média s agarem probíhalo obdobně jako v předešlém případě, avšak s rozdílem, že k navážce kultivačního média bylo přidáno příslušné množství Agarů typ I (výrobce HiMedia, Bombai, Indie), pokud již v médiu nebylo obsaženo. Po přidání daného množství destilované vody byla provedena důkladná homogenizace. Lahev byla opatřena víčkem a vložena dovnitř autoklávu ke sterilizaci. Po proběhnutí sterilace byla lahev ponechána k dostatečnému vychladnutí, avšak tak, aby nedocházelo k tuhnutí agarů. Poté bylo kultivační médium z lahve vylito do připravených sterilních Petriho misek v biohazard boxu. Misky byly po utužení média skladovány při teplotě 12 °C do doby použití.

## 8 METODIKA

### 8.1 Izolace grampozitivních bakterií

Byl proveden mikrobiologický rozbor vybraných potravin:

- **Parmazán** (Bio Parmigiano Reggiano. Přírodní extra tvrdý sýr, Billa).
- **Sýr Madeland** (Madeland Originál, Madeta, Klasa).
- **Bílý jogurt** (Mléčné výrobky z Valašska, Bílý jogurt, Mlékárna Valašské Meziříčí, Klasa).
- **Sýr Gouda** (Sýr Gouda plátkovaná, 48 % tuku v sušině, polotvrdý, přírodní, plnotučný, Ranko, COOP).
- **Balkánský sýr** (Balkánský sýr přírodní, bílý, 48 % tuku v sušině, Ranko, COOP).
- **Sýr Krolewski** (Krolewski original 45 %, přírodní polotvrdý sýr švýcarského typu s velkými oky, O5M Sierpc, Polsko).
- **Sýr Mozzarella** (Mozzarella Bianca classic, pařený plnotučný sýr ve slaném nálevu, Moravia).
- **Zakysaná smetana** (Bio zakysaná smetana, 15 % tuku, Billa).

Vzorky potravin byly zakoupeny v běžné obchodní síti. Sterilně bylo odebráno 5 g vzorku do sáčku určeného k homogenizaci, a následně bylo přidáno 45 ml sterilního fyziologického roztoku. Sáček byl vložen do Stomacheru, kde byl jeho obsah po dobu 2 min homogenizován. Po vyjmutí ze Stomacheru bylo provedeno desítkové ředění, kdy ze sáčku, jehož obsah již představoval ředění  $10^{-1}$ , byl odebrán objem 0,5 ml do sterilní zkumavky, a bylo přidáno 4,5 ml sterilního fyziologického roztoku a homogenizováno, čímž bylo získáno ředění  $10^{-2}$ . Pro získání ředění  $10^{-3}$  bylo odebráno 0,5 ml ze zkumavky označené ředěním  $10^{-2}$ , a opět bylo přidáno 4,5 ml sterilního fyziologického roztoku. Tímto způsobem bylo postupováno až do získání dostatečného ředění potřebného pro vyšetření na Petriho misky.

Stanovení požadované skupiny mikroorganismů bylo provedeno naočkováním 0,1 ml příslušného ředění vzorku paralelně na 2 Petriho misky s danou půdou a následným rozhokejkováním. Celkový počet mikroorganismů (CPM) byl stanovován na půdě Plate count agar (PCA), mléčné koky byly stanovovány na půdě M17 a pro stanovení mléčných tyčinek byl využit de Mann, Rogosa a Sharpe agar (MRS). Po inokulaci byly



misky vloženy do termostatu (30 °C – PCA a M17, 37 °C – MRS) k inkubaci na dobu 48 hodin. Jakmile uplynula předepsaná doba kultivace, byly provedeny odečty.

Z každé misky byly vybrány dostatečně od sebe vzdálené kolonie, které byly přeočkovány křížovým roztěrem na misky s příslušnou půdou. Misky byly poté opět ponechány ke kultivaci, jejíž podmínky odpovídaly stanovovaným skupinám mikroorganismů viz výše. Další fází postupu po kultivaci byla identifikace získaných izolátů.

## 8.2 Předběžná typizace získaných izolátů

Získané izoláty byly postupně podrobeny barvení dle Grama, kdy byly selektovány pouze grampozitivní bakterie. Důvodem pro selekci byl potenciál produkce bakteriocinů bakteriemi mléčného kvašení, které spadají do skupiny grampozitivních bakterií. Bakterie mléčného kvašení jsou označovány jako neškodné a bezpečné, což je hlavním důvodem selekce, jelikož se tyto bakterie s potenciálem produkce bakteriocinů běžně vyskytují v mléčných a fermentovaných potravinách, ze kterých byly izolovány. Pro ověření správně provedené identifikace barvením dle Grama byl doplněn KOH test, což je jednoduchý sklíčkový test, kterým lze odlišit grampozitivní a gramnegativní bakterie na základě rozdílného složení buněčné stěny. Dále byl proveden oxidázový (OXI) test a test pro důkaz produkce katalázy.

### 8.2.1 Gramovo barvení

#### Princip:

Barvení dle Grama je jedna z nejdůležitějších a nejvíce aplikovaných diagnostických metod, které se v oblasti mikrobiologie využívají. Toto barvení nám umožňuje rozlišit bakterie grampozitivní ( $G^+$ ) a gramnegativní ( $G^-$ ), a to dle principu rozdílného chemického složení, struktury a permeability buněčné stěny. Uvnitř buňky dochází k reakci krystalové violeti a jodu, což způsobuje vznik komplexu, který u grampozitivních bakterií neprojde zpět membránou a je nerozpustný v alkoholu, protože alkohol neprostupuje buněčnou stěnu, což znamená, že se grampozitivní bakterie alkoholem neodbarvují a zůstávají zbarvené tmavě fialově. Gramnegativní bakterie se naopak alkoholem odbarvují, především z důvodu odlišného složení buněčné stěny, kterou alkohol prostupuje. Následné obarvení safraninem způsobí to, že gramnegativní bakterie bývají zbarvené červeně (Říhová Ambrožová, 2007).

**Postup práce:**

Po provedení křížového roztěru bylo sterilní kličkou odebráno malé množství biomasy, a následně bylo přeneseno do kapky sterilního fyziologického roztoku na podložním sklíčku. Poté bylo provedeno suspendování biomasy ve fyziologickém roztoku a následně bylo sklíčko se suspenzí ponecháno k zaschnutí. Dalším krokem bylo provedení fixace nátěru na sklíčku protažením plamenem.

Připravený fixovaný preparát byl nejprve převrstven krystalovou violetí (60 s), opláchnut destilovanou vodou (5 s), poté byl převrstven Lugolovým roztokem (30 s), opláchnut 96% ethanolem (1 s), následně byl dobarven safraninem (60 s) a na závěr byl opláchnut destilovanou vodou (5 s) a ponechán k usušení.

Obarvené preparáty byly zhlédnuty mikroskopem, kdy byly pozorovány pod imerzním olejem při celkovém zvětšení 1000x. Po zhlédnutí a fotografickém zdokumentování byly selektovány a dále zamrazeny a uchovávány pouze grampozitivní bakterie, u kterých byly provedené další testy.

**8.2.2 KOH test****Princip:**

Pro konfirmaci, zda se jedná o grampozitivní izoláty, byl proveden KOH test. Principem tohoto sklíčkového testu je odlišné složení bakteriální buněčné stěny. U gramnegativních bakterií je buněčná stěna citlivá k působení zředěných alkalických roztoků, které mají schopnost ji poměrně jednoduše narušovat. Po narušení tenké peptidoglykanové vrstvy buněčné stěny gramnegativních bakterií vzniká suspenze, která vykazuje viskózní vlastnosti, jelikož probíhá uvolňování vláken deoxyribonukleové kyseliny. U grampozitivních bakterií nelze účinek zředěných alkalických roztoků na buněčnou stěnu pozorovat, což znamená, že nedochází k porušení buněčné stěny, a tím pádem ani k tvorbě viskózní suspenze (Kopecká a Rotková, 2017, Halebian et al., 1981).

**Postup práce:**

Na podložní sklíčko byla asepticky za pomoci Pasteurova kapátka aplikována kapka 3% roztoku KOH, do které byla pomocí sterilní plastové kličky vnesena čtyřiaadvacetihodinová kultura daného izolátu a rozmíchána. Poté byla klička ze suspenze tažena směrem vzhůru do vzdálenosti cca 2 cm, při čemž bylo pozorováno, jestli dochází k tvorbě viskózního vlákna. Pokud vlákno vzniká, výsledek se označuje jako pozitivní,

a jedná se o gramnegativní bakterie, pokud vlákno nevzniká, výsledek je negativní a jedná se o bakterie grampozitivní.

### 8.2.3 Oxidázový test (OXI test)

#### **Princip:**

Dalším provedeným testem byl oxidázový test, který je určen pro mikroorganismy produkující enzym cytochrom c oxidázu. Jedná se o poslední enzym dýchacího řetězce, který se účastní u aerobních bakterií přenosu elektronů na kyslík v systému elektronového transportního řetězce. Využívané oxidázové činidlo je složeno z chromogenního oxidačně - redukčního činidla, které během oxidace mění svou barvu na modrou až tmavě fialovou (Kopecká a Rotková, 2017).

#### **Postup práce:**

Na detekční zónou testu byla asepticky plastovou sterilní kličkou nanesena čtyřiašedesátihodinová kultura daného izolátu. Výsledek je považován jako pozitivní v případě, že detekční zóna zmodrá do 30 s. V případě, že zóna zmodrá do 2 min, je výsledek považován za opožděně pozitivní. Pokud dojde ke změně barvy po době delší než 2 min, nebo se barva nezmění vůbec, je výsledek testu považován jako negativní.

### 8.2.4 Důkaz produkce katalázy

#### **Princip:**

Posledním provedeným testem byl důkaz produkce katalázy. Kataláza je enzym, který je schopen rozkládat peroxid vodíku na vodu a volný kyslík. Některé z bakterií vykazují schopnost redukce kyslíku na peroxid vodíku. Peroxid vodíku je však pro buňky toxický, proto existuje obranný mechanismus jeho odbourávání. Principem tohoto mechanismu je rozklad peroxidu vodíku na volný kyslík a vodu, což je zprostředkováno enzymem katalázou (Kopecká a Rotková, 2017).

#### **Postup práce:**

Na podložní skličko byla asepticky za pomoci Pasteurova kapátka aplikována kapka 3% roztoku peroxidu vodíku ( $H_2O_2$ ), do které byla pomocí sterilní plastové kličky vnesena čtyřiašedesátihodinová kultura daného izolátu a rozmíchána. Pozitivita testu se projevuje okamžitým uvolňováním bublinek kyslíku.

### 8.2.5 Zamražení získaných izolátů

Vybrané grampozitivní bakterie byly uchovávány zamražením. Vybrané izoláty byly zaočkovány do MRS (tyčinky) či M17 (koky) bujónu, dle jejich morfologie. Poté byly zkumavky vloženy do termostatu nastaveného na 37 °C na dobu inkubace 48 hod. Po uplynutí doby inkubace bylo 750 µl suspenze pomnoženého izolátu přeneseno do sterilních Eppendorfových zkumavek, ke kterým bylo následně přidáno 750 µl sterilního 30% glycerolu. Poměr suspenze a glycerolu byl 1:1. Tyto zkumavky byly následně uchovávány v kryokrabičkách umístěných v mrazícím boxu, který byl nastavený na - 80 °C. Jeden izolát byl zamražen ve třech Eppendorfových zkumavkách.

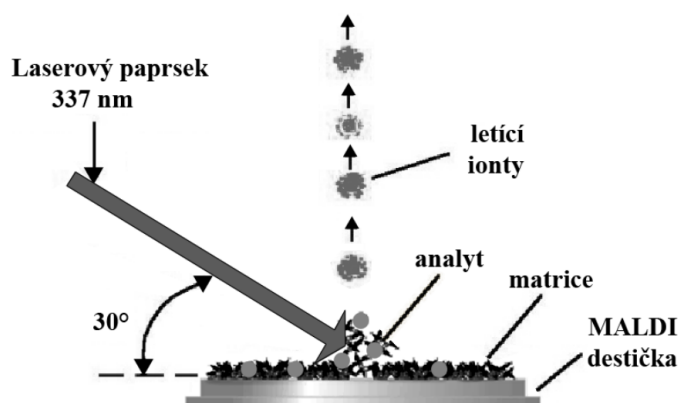
## 8.3 Identifikace izolátů pomocí hmotnostní spektrofotometrie

### MALDI - TOF

#### Princip:

MALDI-TOF MS neboli Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, je rychlá a přesná metoda identifikace a typizace mikroorganismů, která se řadí k chemotaxonomickým metodám. Principem identifikace je analýza ribosomálních a jiných proteinů v buňce, které mají jednotlivé bakteriální druhy specifické (Bursová et al., 2014).

Proteiny buněčných extraktů jsou ionizovány pomocí matrice za využití dusíkového UV laseru. Matrice slouží k tomu, aby analyt nebyl v přímém kontaktu s laserem. Je nutné, aby byla energie přenesena na molekuly analytu ionizací, tedy přenosem protonu z excitovaných molekul matrice. Ionty, které přešly do plynné fáze se dále pohybují silným elektrickým polem, ve kterém dochází k jejich urychlení a zaostření. Následně ionty vstupují do vakuové trubice hmotnostního analyzátoru doby letu, kde rychlost jejich pohybu odpovídá jejich hmotnosti a náboji. Výslednou hodnotou je doba letu částice, která je snímána detektorem. Těžší či méně nabité ionty dorazí k detektoru později než ionty lehčí či více nabité. Detektor je propojen se specifickým softwarem, pomocí něhož jsou data zpracovávána (Bursová et al., 2014).



Obrázek 5 Schéma ionizace  
(Bursová et al., 2014)

Principem identifikace mikroorganismů je srovnání proteinového spektra konkrétního izolátu se spektry referenčních kmenů, které jsou k dispozici v databázi MALDI Biotyper (Bursová et al., 2014).

#### **Postup práce (příprava izolátů):**

Zamražené kultury byly nejprve inokulovány do BHI bujónu a ponechány ke kultivaci po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Poté byla získaná biomasa z bujónu přenesena asepticky sterilní bakteriologickou kličkou na misky s BHI agarem a byl proveden křížový roztěr. Misky byly vloženy do termostatu a inkubovány (37 °C, 24 hod). Po inkubaci bylo do Eppendorfovy zkumavky napipetováno 150 µl destilované vody, do které byla sterilní kličkou vnesena dostatečně hustá biomasa kultury odebraná z misky s BHI agarem a byla provedena suspendace. Na závěr bylo do zkumavky přidáno 450 µl 96% ethanolu. Následně byly zkumavky vloženy do kryo krabičky a uchovávány v mrazáku nastaveném na -20 °C, dokud nebyly převezeny do laboratoře AgroBioTech v Nitře, ve které proběhla analýza pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

## **8.4 Ověření schopnosti produkce bakteriocinu u izolovaných bakterií**

Poslední fází postupu v této práci bylo provedení skrínungu antimikrobiální aktivity u vybraných izolátů. Celkem bylo testováno 150 izolátů na 15 vybraných indikátorových mikroorganismů. Test byl proveden třikrát.

### **8.4.1 Agar spot test, agar spot antimicrobial assay**

Tato metoda je určena pro skrínung antimikrobiální aktivity producentů bakteriocinů nebo bílkovin podobných bakteriocinům (Rahmeh et al., 2019, Juturu a Wu, 2018). Celkový

postup agar spot testu byl s mírnou modifikací sestaven dle odborných publikací autorů Parlindungan et al. (2021), Rahmeh et al. (2019), Juturu a Wu (2018) a Crowley, Mahony a van Sinderen (2013).

#### 1. fáze – Prvotní pomnožení izolátů v bujónu:

Prvním krokem pracovního postupu bylo předmnožení bakteriální kultury v MRS bujónu. Zamražené izoláty byly rozmrazeny, promíchány a v objemu 200  $\mu$ l zaočkovány do zkumavek s 5 ml MRS bujónu. Zkumavky byly umístěny do termostatu nastaveného na 37 °C ke kultivaci na dobu 18 hod.

#### 2. fáze – Kultivace bakteriální kultury v bujónu (1% inokulum):

Z narostlé kultury v MRS bujónu bylo po promíchání odebráno 50  $\mu$ l a přeneseno do zkumavek s 5 ml MRS bujónu, čímž bylo získáno 1% inokulum. Následně byly zkumavky umístěny, stejně jako v 1. fázi, do termostatu. Kultivace probíhala při 37 °C po dobu 18 hodin.

#### 3. fáze – Dávkování bakteriální kultury na misky:

Dalším krokem bylo dávkování kultury na misky s MRS agarem. 2  $\mu$ l přes noc narostlé kultury byly nadávkovány na misky s 1,2 % MRS agarem. Na jedné misce bylo rozmístěno celkem 10 různých izolátů, kdy jednotlivé izoláty byly od sebe dostatečně vzdáleny, aby nedocházelo k interferenci. Misky byly uloženy do termostatu ke kultivaci při 37 °C na dobu 24 hod.

#### 4. fáze – Převrstvení izolátů soft agarem inokulovaným indikátorovou kulturou:

Den předem byly indikátorové kultury z misek ve formě křížových roztěrů (48hodinové kultury) přeneseny do zkumavek s 5 ml BHI bujónu. Zkumavky byly vloženy do inkubátoru nastaveného na 37 °C a kultivace probíhala po dobu 24 hod.

Misky s nadávkovanými kulturami byly po 24 hodinách inkubace vytáhnuty z termostatu a převrstveny 0,8% soft agarem BHI, který byl inokulován indikátorovým mikroorganismem. Postup inokulace byl takový, že bylo nejprve 100 ml soft agaru v lahvi zchlazeno pod studenou tekoucí vodou na teplotu, která by indikátorové mikroorganismy neusmrtila (cca 40 až 50 °C), a poté bylo do soft agaru inokulováno 1,7 ml příslušné indikátorové kultury, která byla předtím důkladně homogenizována. Indikátorová kultura byla v soft agaru důkladně promíchána a následovalo převrstvení misek s nadávkovanými izoláty. Na 1 miskou bylo dávkováno 5 ml soft agaru s indikátorovou kulturou (0,1 ml kultury v 5 ml soft agaru), aby došlo ke správnému převrstvení celé plochy. Po utužení byly misky umístěny do termostatu ke kultivaci při 30 °C na dobu 48 hodin.

**Indikátorové mikroorganismy:**• **Gramnegativní bakterie:**

- 1) *Salmonella* Typhimurium
- 2) *Escherichia coli*

• **Grampozitivní bakterie:**

- 3) *Staphylococcus aureus*
- 4) *Enterococcus faecalis*
- 5) *Bacillus cereus*
- 6) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141
- 7) *Lactococcus cremoris* CCDM 946
- 8) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 364
- 9) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004
- 10) *Lactococcus cremoris* CCDM 824
- 11) *Streptococcus thermophilus* CCDM 224
- 12) *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM P89
- 13) *Levilactobacillus brevis* RIBM P20
- 14) *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM P96
- 15) *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM P94

• **Pozitivní kontrola:** *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 (producent nisinu)5. fáze – Pozorování vzniku inhibiční zóny:

Po předepsané době inkubace byly provedeny odečty, kdy byl pozorován vznik inhibiční zóny kolem nadávkovaného izolátu. Za pozitivní výsledek byla považována čirá zóna o minimální velikosti 1 až 2 mm. Vzniklé zóny byly změřeny a byl zaznamenán jejich průměr v mm.

## 9 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této části práce jsou představeny a okomentovány získané výsledky.

### 9.1 Izolace grampozitivních bakterií



Obrázek 6 Počet získaných izolátů z daných potravin

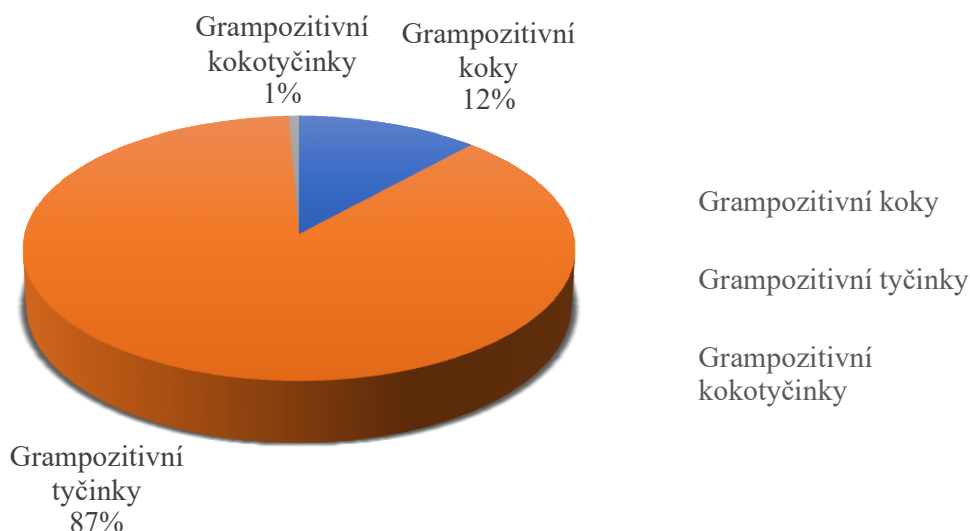
Na Obrázku 6 lze sledovat grafické znázornění celkových počtů izolovaných grampozitivních bakterií z daných, předem vytypovaných, potravin. Seznam využitých potravin je uveden v podkapitole 8.1. Celkem bylo z potravin izolováno 152 grampozitivních bakterií. Počty vyizolovaných bakterií z příslušných potravin jsou následující: 34 izolátů ze sýru Parmazán, 29 ze sýru Madeland, 24 z bílého jogurtu, 21 ze sýru Gouda, 19 z Balkánského sýru, 16 ze sýru Krolewski, 8 ze sýru Mozzarella a 1 izolát ze zakysané smetany. Důvodem, proč se ze zakysané smetany podařilo získat pouze 1 izolát, je pravděpodobně náročnost kultivačních podmínek pro přítomné bakterie (smetanová kultura), která se projevovala nedostatečným růstem. Dalším důvodem byla i přítomnost gramnegativních bakterií na miskách, které nebyly selektovány a byly vyřazeny.

Grafické znázornění poměru zastoupené morfologie grampozitivních bakterií všech získaných izolátů lze pozorovat níže na Obrázku 7. Z celkového počtu 152 izolátů byly pozorovány 3 typy morfologie – tyčinky, koky a kokotyčinky. Nejvíce bakterií mělo morfologii tyčinek, jejichž počet odpovídal 133 izolátům, což činí 87 %. Izolovaných



bakterií s morfológií koků bylo 18, což odpovídá 12 %. Bakterie v morfológii kokotyčinky byla získána pouze 1, což odpovídá zastoupení 1 % z celkového počtu izolátů.

### Poměr vyizolovaných bakterií dle morfológie



Obrázek 7 Zastoupení izolátů dle morfológie

## 9.2 Identifikace získaných izolátů

Celkové výsledky typizace a identifikace izolovaných bakterií jsou uvedeny v Příloze I. V této části jsou uvedeny pouze výsledky identifikace získaných izolátů pomocí metody MALDI-TOF (Tab. 1 – Tab. 8). Tabulky jsou pro lepší přehlednost rozděleny dle potraviny, ze které byly bakterie izolovány. Celkem bylo úspěšně identifikováno 106 ze 152 izolátů. Neúspěšná identifikace 46 izolátů mohla být zapříčiněna nízkou koncentrací daného mikroorganismu nebo rovněž absencí spektra, charakteristického pro daný MO.

Tabulka 1 Výsledky identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF (sýr Mozzarella)

Potravina	Izolát	Identifikace MALDI-TOF	Skóre
Sýr Mozzarella	3	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Sýr Mozzarella	4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.734
Sýr Mozzarella	5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,812
Sýr Mozzarella	6	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.908
Sýr Mozzarella	39	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1.995
Sýr Mozzarella	40	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.895
Sýr Mozzarella	41	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.990
Sýr Mozzarella	42	<i>Staphylococcus warneri</i>	1.844

Mozzarella je druh měkkého sýru, který bývá skladován ve vlastní syrovátce v uzavřených obalech. Ze vzorku sýru Mozzarella byly izolovány a identifikovány 3 druhy stafylokoka. Jednalo se konkrétně o *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri* a *Staphylococcus haemolyticus*. Jedná se o doprovodnou mikroflóru a výskyt těchto mikroorganismů je možný právě z důvodu skladování tohoto sýru ve vlastní syrovátce (Devirgiliis et al., 2010). Ze tohoto druhu sýra dále bývá nejčastěji izolovány kmeny *Lacticaseibacillus casei* a *Lactobacillus acidophilus*, které jsou součástí startovací kultury (Losito et al., 2014). V této práci se nepodařilo získat izoláty daných druhů.

Tabulka 2 Výsledky identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF (zakysaná smetana)

Potravina	Izolát	Identifikace MALDI-TOF	Skóre
Zakysaná smetana	51	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	

Smetanová kultura bývá složena z druhů *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, *Lactococcus cremoris* a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, subsp. *dextranicum* (Buňková, 2022). V této práci se ze vzorku zakysané smetany podařilo izolovat pouze 1 izolát, který nebyl úspěšně identifikován pomocí metody MALDI-TOF.

Tabulka 3 Výsledky identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF (Balkánský sýr)

Potravina	Izolát	Identifikace MALDI-TOF	Skóre
Balkánský sýr	1	<i>Kocuria varians</i>	2.195
Balkánský sýr	35	<i>Lactococcus lactis</i>	2.309
Balkánský sýr	36	<i>Lactococcus lactis</i>	2.240
Balkánský sýr	37	<i>Lactococcus lactis</i>	2.244
Balkánský sýr	94	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1,898
Balkánský sýr	96	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,897
Balkánský sýr	99	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1,84
Balkánský sýr	102	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,342
Balkánský sýr	139 - 143	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Balkánský sýr	144	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1,779
Balkánský sýr	145	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Balkánský sýr	147	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	2.148
Balkánský sýr	148	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1,712
Balkánský sýr	149 - 150	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	

Balkánský sýr je dlouhodobě zrající druh měkkého sýra ve slaném nálevu. V tomto sýru zpravidla nebývají přítomny patogenní mikroorganismy. Při podmínkách vysoké

koncentrace soli se však může množit *Staphylococcus aureus* (Buňková, 2022). Z celkem 19 izolátů získaných ze vzorku sýra bylo úspěšně identifikováno 11 izolátů, které se řadí mezi druhy *Lactococcus lactis*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Kocuria varians* a *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Až na *Lactococcus lactis*, který je součástí zákysové kultury, se jedná o doprovodnou mikroflóru balkánského sýru.

Tabulka 4 Výsledky identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF (sýr Krolewski)

Potravina	Izolát	Identifikace MALDI-TOF	Skóre
Sýr Krolewski	43	<i>Staphylococcus warneri</i>	2,032
Sýr Krolewski	44	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,197
Sýr Krolewski	45	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,717
Sýr Krolewski	46	Nespolehlivá identifikace	
Sýr Krolewski	47	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,976
Sýr Krolewski	48	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,849
Sýr Krolewski	64	Nespolehlivá identifikace	
Sýr Krolewski	65	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,885
Sýr Krolewski	66	Nespolehlivá identifikace	
Sýr Krolewski	67	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,152
Sýr Krolewski	68	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	1,808
Sýr Krolewski	69	Nespolehlivá identifikace	
Sýr Krolewski	92	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,718
Sýr Krolewski	97	<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	1,908
Sýr Krolewski	146	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,171
Sýr Krolewski	151	Nespolehlivá identifikace	

Úspěšně identifikovanými bakteriemi získanými ze sýru Krolewski, což je sýr švýcarského typu s oky, byly nejčastěji *Lacticaseibacillus paracasei* (8 z 11 izolátů). Další izoláty byly identifikovány jako *Lactiplantibacillus paraplantarum* (1), *Latilactobacillus curvatus* (1) a *Staphylococcus warneri* (1). Až na *Staphylococcus warneri* se jedná o běžnou doprovodnou mikroflóru daného sýru. *Staphylococcus warneri* je kontaminací, která mohla vzniknout chybou při mikrobiologickém rozboru. Obecně bývá v sýrech švýcarského typu přítomen *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* nebo *Lactobacillus helveticus*, jako starterová kultura (Bachmann et al., 2011).

Tabulka 5 Výsledky identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF (sýr Madeland)

Potravina	Izolát	Identifikace MALDI-TOF	Skóre
Sýr Madeland	70	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2.053
Sýr Madeland	71	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,88
Sýr Madeland	72	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,932
Sýr Madeland	73	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1.940
Sýr Madeland	74	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,803
Sýr Madeland	75	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2.104
Sýr Madeland	76	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2.082
Sýr Madeland	77	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1.741
Sýr Madeland	78	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1.968
Sýr Madeland	79	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,147
Sýr Madeland	80	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1.728
Sýr Madeland	81	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1.787
Sýr Madeland	82	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,889
Sýr Madeland	83	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,842
Sýr Madeland	84	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,884
Sýr Madeland	85	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,764
Sýr Madeland	86	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,221
Sýr Madeland	87	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,966
Sýr Madeland	88	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,879
Sýr Madeland	89	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,961
Sýr Madeland	90	Nespolehlivá identifikace	
Sýr Madeland	91	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,816
Sýr Madeland	93	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,127
Sýr Madeland	95	Nespolehlivá identifikace	
Sýr Madeland	98	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,849
Sýr Madeland	100	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,128
Sýr Madeland	101	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1.813
Sýr Madeland	129	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1.948
Sýr Madeland	137	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,119

Sýr Madeland se řadí mezi polotvrdé sýry holandského typu, ve kterém se uvnitř hmoty tvoří oka. Dle literatury by v sýrech tohoto typu měl být nejvíce (až z 90 %) přítomen *Lactococcus lactis* jako startérova kultura (Duru et al., 2018). V této práci byla většina bakterií izolovaných ze sýru Madeland identifikována jako *Lacticaseibacillus paracasei*, podobně jako v případě sýru Krolewski. Jedná se o běžnou nonstartérovou kulturu BMK vyskytující se v sýrech holandského typu (Pachlová et al., 2018).

Tabulka 6 Výsledky identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF (Parmazán)

Potravina	Izolát	Identifikace MALDI-TOF	Skóre
Parmazán	103	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	1,714
Parmazán	104	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1,905
Parmazán	105	Nespolehlivá identifikace	
Parmazán	106	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	2,07
Parmazán	107 - 108	Nespolehlivá identifikace	
Parmazán	109	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	1,965
Parmazán	110 - 115	Nespolehlivá identifikace	
Parmazán	116	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,22
Parmazán	117	Nespolehlivá identifikace	
Parmazán	118	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	1,807
Parmazán	119	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	1,786
Parmazán	120	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,233
Parmazán	121	<i>Lactobacillus</i> sp.	1,793
Parmazán	122 - 124	Nespolehlivá identifikace	
Parmazán	125	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	1,752
Parmazán	126	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	1,861
Parmazán	127	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	1,97
Parmazán	128, 130	Nespolehlivá identifikace	
Parmazán	131	<i>Lactobacillus</i> sp.	1,78
Parmazán	132 - 133	Nespolehlivá identifikace	
Parmazán	134	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	2,003
Parmazán	135	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,215
Parmazán	136	Nespolehlivá identifikace	
Parmazán	138	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	2,079

Parmazán je extra tvrdý sýr zrající 12 až 24 měsíců. V Parmazánu byla identifikací prokázána přítomnost bakteriálních druhů: *Leuconostoc pseudomesenteroides* (1), *Lacticaseibacillus casei* (2), *Lactobacillus* sp. (2), *Lacticaseibacillus paracasei* (3) a *Lacticaseibacillus rhamnosus* (8). *Lacticaseibacillus paracasei* a *Lacticaseibacillus rhamnosus* jsou převládajícími nespolehlivými druhy mikroflóry tohoto sýru (Tagliazucchi et al., 2020). Přítomná mikroflóra na Parmazánu byla nejvíce rozmanitá ze všech potravin. Převládající mikrobiotou tohoto sýra dle jiné studie může být i *Lactobacillus helveticus*, který se však nepodařilo izolovat (Sola et al., 2022).

Tabulka 7 Výsledky identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF (bílý jogurt)

Potravina	Izolát	Identifikace MALDI-TOF	Skóre
Bílý jogurt	7	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.961
Bílý jogurt	8	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.749
Bílý jogurt	9	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.704
Bílý jogurt	10	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.894
Bílý jogurt	11	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	2.014
Bílý jogurt	12	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.793
Bílý jogurt	13	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.965
Bílý jogurt	14	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1,925
Bílý jogurt	15	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1,797
Bílý jogurt	16	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.875
Bílý jogurt	17	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.904
Bílý jogurt	18	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.846
Bílý jogurt	19	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	2.015
Bílý jogurt	20	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	2.060
Bílý jogurt	21	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.966
Bílý jogurt	22	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.889
Bílý jogurt	23	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.943
Bílý jogurt	24	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.875
Bílý jogurt	25	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.876
Bílý jogurt	26	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	2.035
Bílý jogurt	27	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.831
Bílý jogurt	28	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	2.003
Bílý jogurt	29	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.837
Bílý jogurt	30	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.819

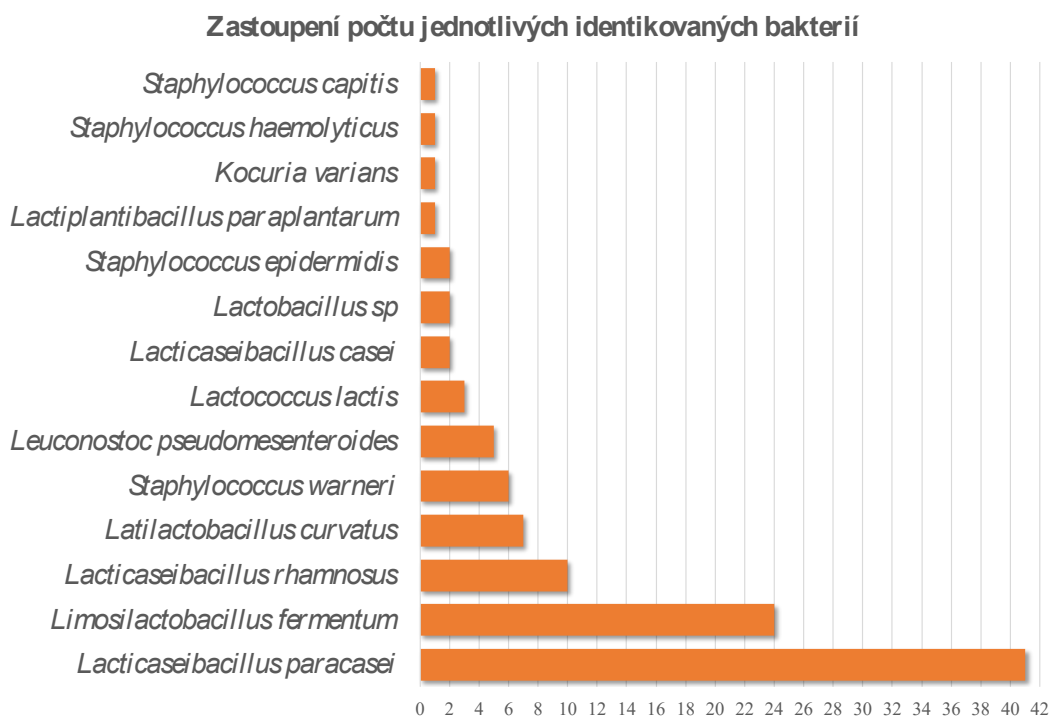
Z bílého jogurtu bylo získáno 24 izolátů, jejichž identifikace odhalila, že se jedná pouze o jednoho zástupce, kterým je *Limosilactobacillus fermentum* (dříve *Lactobacillus fermentum*). Tento bakteriální druh se hojně vyskytuje v zákysu a v různých fermentovaných mléčných výrobcích. Dále jsou přítomny jogurtové kultury *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus* v ideálním poměru 1:2 (Hassanpour et al., 2019). V této práci se tyto mikroorganismy nepodařilo izolovat.

Tabulka 8 Výsledky identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF (sýr gouda)

Potravina	Izolát	Identifikace MALDI-TOF	Skóre
Sýr Gouda	2	<i>Staphylococcus warneri</i>	1,931
Sýr Gouda	31 - 32	Nespolehlivá identifikace	
Sýr Gouda	33	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	1,893
Sýr Gouda	34, 38	Nespolehlivá identifikace	
Sýr Gouda	49	<i>Staphylococcus capitis</i>	1,732
Sýr Gouda	50, 52	Nespolehlivá identifikace	
Sýr Gouda	53	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,917
Sýr Gouda	54 - 55	Nespolehlivá identifikace	
Sýr Gouda	56	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	1,85
Sýr Gouda	57	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	1,866
Sýr Gouda	58	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	1,76
Sýr Gouda	59	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	1,882
Sýr Gouda	60 - 61	Nespolehlivá identifikace	
Sýr Gouda	62	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	1,946
Sýr Gouda	63	Nespolehlivá identifikace	
Sýr Gouda	152	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	2,055

Jedná se o polotvrdý sýr s nízko-dohřivanou syřeninou, k jehož výrobě se využívá základní kultura, ke které může být přidána i kultura doplňková, která je využívána při zrání. Startovací kulturou bývá zástupci rodu *Lactococcus* a *Leuconostoc* (Park et al., 2019). Dále se mohou vyskytovat nonstartérové kultury *Latilactobacillus curvatus*, *Lacticaseibacillus paracasei* nebo *Lacticaseibacillus rhamnosus* (Park et al., 2019), což je v souladu s našimi výsledky. Šest získaných izolátů bylo identifikováno jako *Latilactobacillus curvatus*, 1 izolát jako *Lacticaseibacillus paracasei* a 1 izolát byl identifikován jako *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Rovněž byl ve vzorku sýru přítomen kmen *Staphylococcus capitis* a *Staphylococcus warneri*. Tyto kmeny stafylokoka jsou pravděpodobnou kontaminací, která mohla vzniknout chybou lidského faktoru, při mikrobiologickém rozboru.

Celkem bylo úspěšně hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF identifikováno 106 izolátů ze 152. Nejčastějšími zástupci byly *Lacticaseibacillus paracasei* (39 %), *Limosilactobacillus fermentum* (23 %), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (9 %) a *Latilactobacillus curvatus* (7 %). Zastoupení jednotlivých bakterií, které se podařilo identifikovat, je graficky znázorněno na Obrázku 8.



Obrázek 8 Počty jednotlivých identifikovaných bakterií

### 9.3 Antimikrobiální aktivita získaných izolátů

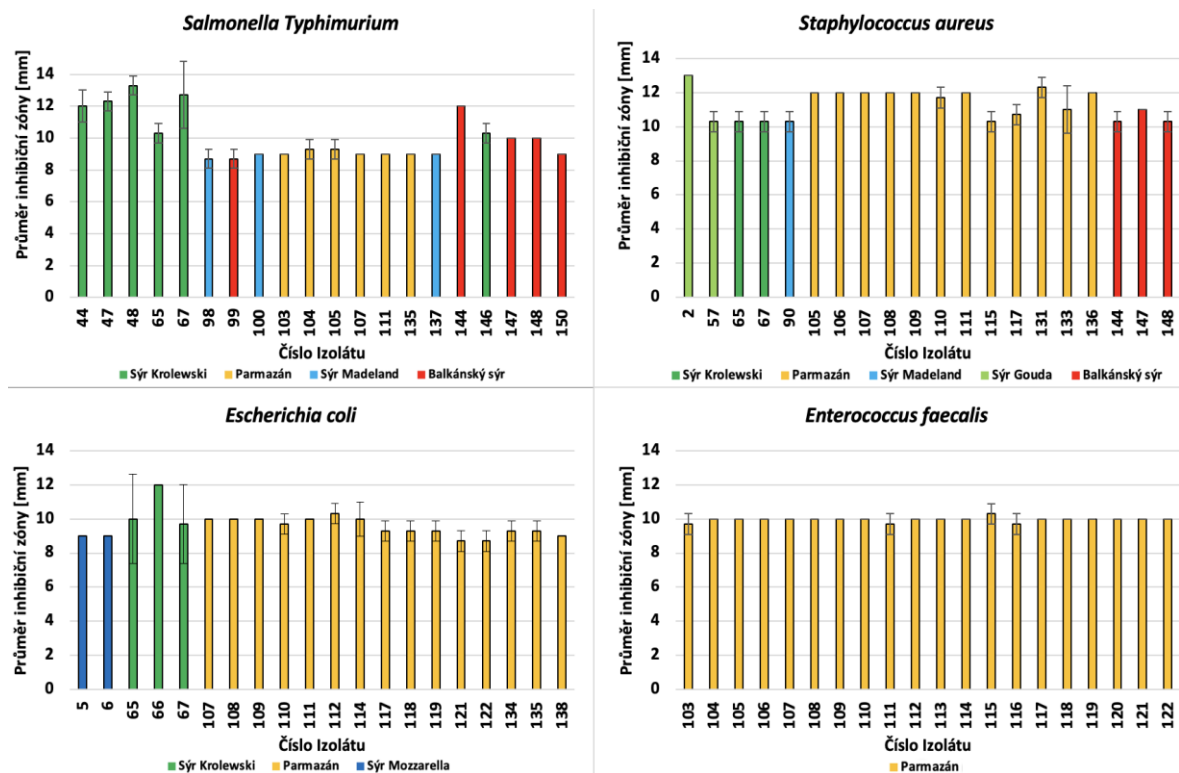
#### 9.3.1 Výsledky antimikrobiální aktivity proti potravinovým patogenům

Antimikrobiální aktivita 150 získaných izolátů (izolát 35 a 36 vynechán z důvodu špatného růstu) byla testována proti 15 indikátorovým mikroorganismům. Metodika práce „agar spot“ testu a použité indikátorové mikroorganismy jsou uvedeny v podkapitole 8.4.1. Tento test byl proveden celkem třikrát. Za pozitivní výsledek byl považován vznik zóny o velikosti alespoň 2 mm kolem „spotu“ (místo nanesení definovaného objemu daného izolátu), jehož průměr byl kolem 5 mm. Celkovými výsledky jsou tedy průměry inhibičních zón, včetně průměru „spotu“. Celkové výsledky antimikrobiální aktivity izolovaných bakterií jsou uvedeny v tabulkách v Příloze II, kde jsou popsány průměry inhibičních zón spolu se směrodatnou odchylkou. Z důvodu analýzy velkého množství dat a získání mnoha pozitivních výsledků antimikrobiální aktivity, bylo pro každý indikátorový mikroorganismus vybráno 20 izolátů, u kterých byla pozorována tvorba zón inhibice o největších průměrech.

V grafech na Obrázku 9 a na Obrázku 10 jsou uvedeny největší průměry inhibičních zón vytvořených u vybraných potravinových patogenů. Testovanými gramnegativními bakteriemi pro citlivost k antimikrobiálním látkám produkovaných zkoumanými izoláty



byly *Salmonella Typhimurium* a *Escherichia coli*. Grampozitivní bakterie byly *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* a *Bacillus cereus*. U všech potravinových patogenů byla antimikrobiální aktivita v největší míře pozorována u izolátů získaných ze sýru Parmazán. Největší průměr zón inhibice u izolátů získaných z tohoto sýru se pohyboval od 10 do 16 mm.



Obrázek 9 Velikost inhibičních zón u patogenních mikroorganismů

Celkově se průměry vybraných inhibičních zón u izolátů účinných proti *Salmonella Typhimurium* pohybovaly od 8,3 mm až do 13 mm. Nejvyšší antimikrobiální aktivitu vůči tomuto patogenu vykazovaly izoláty identifikované jako *Lacticaseibacillus paracasei* získané ze sýru Krolewski (izoláty č. 44, 47, 48, 65, 67 a 146). Naopak kmeny *Lacticaseibacillus paracasei* izolované ze sýru Madeland (izoláty č. 98, 100 a 137) vykazovaly nižší aktivitu oproti izolátům ze sýru Krolewski. Průměry jejich inhibičních zón se pohybovaly kolem 8,6 mm, kdežto u izolátů ze sýru Krolewski byly detekovány zóny o velikosti 10 až 13 mm. Rovněž podobná citlivost *S. Typhimurium* byla pozorována vůči působení kmenů izolovaných z Parmazánu (průměry inhibičních zón kolem 9 mm): *Leuconostoc pseudomesenteroides* (izolát č. 104), *Lacticaseibacillus casei* (izolát č. 103), *Lacticaseibacillus paracasei* (izolát č. 135) a izolát č. 111. Dále po působení izolátů (č. 99, 144 a 148 - *Leuconostoc pseudomesenteroides*, č. 147 - *Lacticaseibacillus rhamnosus*,

a izolát č. 150) z Balkánského sýru byly zaznamenány průměry zón o velikosti 8,6 až 12 mm. Ve studiích od autorů Lando, Valduga a Moroni (2023) a Meleh et al. (2020) byla zaznamenána antimikrobiální aktivita proti bakterii *Salmonella* Typhimurium u kmenů *Limosilactobacillus fermentum*, *Lacticaseibacillus casei* a *Lactobacillus delbrueckii*. Antimikrobiální aktivita těchto bakterií nebyla v této práci zaznamenána, avšak na rozdíl od této studie se podařilo izolovat jiné druhy BMK, které inhibiční účinky na *Salmonella* Typhimurium vykazují.

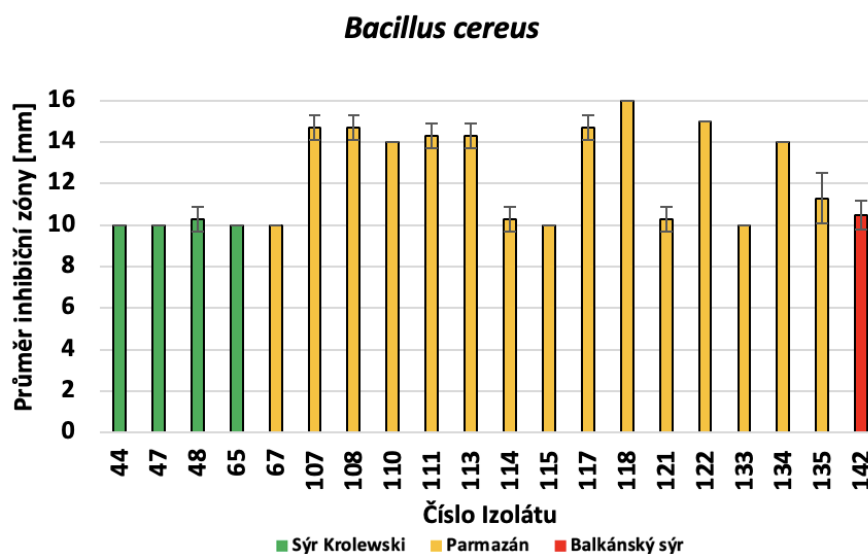
Jak můžeme vidět na Obrázku 9, u bakterie *Escherichia coli* se projevila citlivost ke kmenům *Staphylococcus epidermis* (izolát č. 5) a *Staphylococcus warneri* (izolát č. 6) získaných ze sýru Mozzarella. U těchto izolátů byly detekovány inhibiční zóny o průměru 8,6 mm. Největší zóna inhibice proti *E. coli*, jejíž průměr dosahoval 12 mm, byla zaznamenána u izolátu č. 66, získaného ze sýru Krolewski. U izolátů č. 65 a 67 z tohoto sýru byly evidovány menší zóny inhibice produkované kmenem *Lacticaseibacillus paracasei*, jejichž průměr činil 9,7 mm. Podobně citlivá byla *E. coli* i na izoláty získané ze sýru Parmazán. Jedná se o kmeny *Lacticaseibacillus rhamnosus* (izolát č. 109, 118, 119, 134, 138), *Lactobacillus* sp. (izolát č. 121) a *Lacticaseibacillus paracasei* (izolát č. 135). Izoláty č. 107, 108, 110, 111, 112, 114, 117 a 122 nebyly spolehlivě identifikovány. Průměr inhibičních zón u izolátu z Parmazánu se pohyboval v rozmezí od 8,6 mm do 10,3 mm. Obdobná studie byla provedena autory Liu et al. (2013) a Rahmeh et al. (2019), kteří zjistili citlivost *E. coli* vůči působení BMK kmenů *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* a *Ligilactobacillus salivarius* a *Lactobacillus* sp.

V případě bakterie *Staphylococcus aureus* byla zaznamenána antimikrobiální aktivita i u izolátů získaných ze sýru Gouda. Jednalo se o kmeny *Staphylococcus warneri* (izolát č. 2) a *Lactobacillus curvatus* (izolát č. 57). Jak lze pozorovat v grafu na Obrázku 9, průměr vytvořených inhibičních zón v případě těchto dvou kmenů byl 13 a 10,3 mm. Izoláty ze sýru Krolewski, které inhibovaly růst *Staphylococcus aureus*, byly kmeny *Lacticaseibacillus paracasei* (izolát č. 65 a 67). Byl pozorován vznik inhibiční zóny o průměru 10,3 mm. Inhibiční zóny s průměrem kolem 10 mm byly také zaznamenány u kmenu *Lacticaseibacillus rhamnosus* (izolát č. 147), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (izolát č. 144 a 148) a u izolátu č. 150, které byly izolovány z Balkánského sýru. Antimikrobiální aktivita byla zaznamenána i v případě *Lacticaseibacillus rhamnosus* (izolát č. 106 a 109), *Lactobacillus* sp. (izolát č. 131), a u ostatních nespolehlivě identifikovaných izolátů (č. 105, 107, 108, 110, 111, 115, 117, 133, 136) získaných ze sýru Parmazán.

V případě izolátů z Parmazánu se průměr vytvořených inhibičních zón pohyboval v rozmezí 10 až 12 mm. Výsledkům zjištěným v této práci u bakterií *Leuconostoc pseudomesenteroides* a *Lactobacillus* sp., které vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti *Staphylococcus aureus*, odpovídají i výsledky publikované v práci Rahmeh et al. (2019). Rovněž autoři Meleh et al. (2020) ve své studii zaznamenali antimikrobiální aktivitu proti *Staphylococcus aureus* u BMK bakterií *Limosilactobacillus fermentum* a *Lactobacillus delbrueckii*.

Podobná studie byla provedena autory Yi et al. (2020), kteří zjistili, že inhibiční aktivita na potravinové patogeny *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium a *E. coli* byla evidována u bakterií mléčného kvašení kmenů *Lacticaseibacillus paracasei* a *Lactiplantibacillus plantarum*. Působení antimikrobiální aktivity těchto kmenů bakterií bylo zaznamenáno i v této práci.

Oproti jiným indikátorovým mikroorganismům se *Enterococcus faecalis* jevil nejvíce citlivý vůči izolátům č. 103 – 122 získaných pouze ze sýru Parmazán. Jednalo se o zástupce *Lacticaseibacillus casei* (izolát č. 103), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (izolát č. 104), *Lacticaseibacillus paracasei* (izolát č. 116 a 122) a *Lacticaseibacillus rhamnosus* (izolát č. 106, 109, 118 a 119). Průměry inhibičních zón vytvořených produkcí těchto kmenů byly kolem 10 mm. Autoři Shaaban et al. (2022) vypracovali studii, ve které zaznamenali antimikrobiální aktivitu kmenů *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lacticaseibacillus rhamnosus* proti bakterii *Enterococcus faecalis*. V této práci, podobně jako v uvedené studii, byla zaznamenána schopnost inhibovat růst *Enterococcus faecalis* u kmenu *Lacticaseibacillus rhamnosus*.



Obrázek 10 Velikost inhibičních zón u *Bacillus cereus*

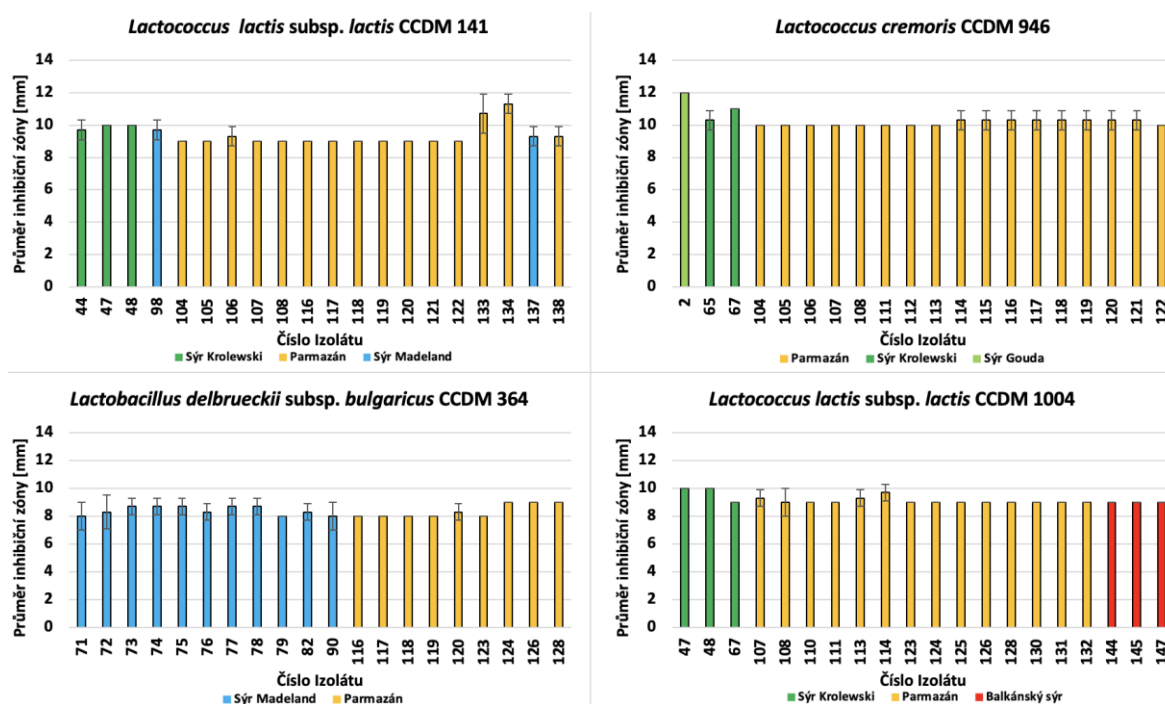
V případě bakterie *Bacillus cereus* (Obrázek 10) byly oproti ostatním patogenům pozorovány tvorby inhibičních zón o největších průměrech. Vůbec největší zóna inhibice (16 mm) byla pozorována po působení antimikrobiálních látek kmenu *Lactocaseibacillus rhamnosus* (izolát č. 118) izolovaného z Parmazánu. Nejvíce účinné se proti této bakterii jevíly právě izoláty získané z tohoto sýru. Jak je možné vidět v grafu na Obrázku 10, po působení devíti z patnácti izolátů byly detekovány inhibiční zóny o velikosti 14 až 16 mm. Projevy antimikrobiální aktivity byly detekovány také u dalších kmenů: u 4 kmenů *Lactocaseibacillus paracasei* (izolátů ze sýru Krolewski) a u jednoho izolátu z Balkánského sýru (izolát č. 142). Po působení těchto kmenů byly zjištěny průměry inhibičních zón o velikosti kolem 10 mm.

Tirloni et al. (2020) ve své studii zjistili schopnost inhibovat růst *B. cereus* u kmenů *Lactococcus cremoris* a *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Schopnost inhibice růstu této bakterie izolátem *Lactococcus lactis* ze sýru Krolewski v této studii nebyla prokázána. V dosud publikované literatuře není mnoho studií týkajících se antimikrobiální aktivity laktobacilů vůči *Bacillus cereus*. Výsledky této práce naznačují, že i kmeny laktobacilů mohou mít inhibiční účinek vůči tomuto patogenu.

### 9.3.2 Výsledky antimikrobiální aktivity proti příbuzným BMK

Stejně jako v případě potravinových patogenů, jsou i zde níže uvedeny největší průměry inhibičních zón vytvořených u daných bakterií mléčného kvašení. Pro každý indikátorový

kmen BMK bylo rovněž vybráno 20 izolátů, které vykazovaly největší antimikrobiální aktivitu.



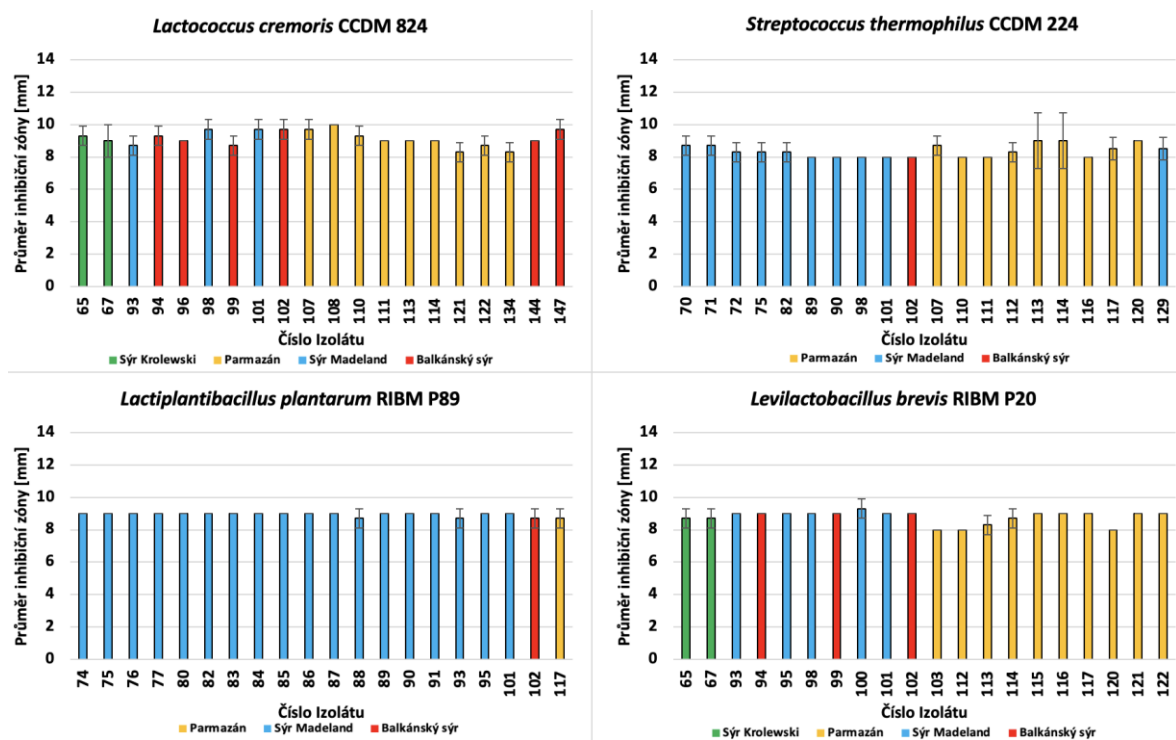
Obrázek 11 Velikost inhibičních zón u kmenů BMK

Jako indikátorové mikroorganismy byly vybrány i 2 kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Jednalo se o kmeny s označením CCDM 141 a CCDM 1004. V obou případech byly na tyto kmeny v největší míře účinné izoláty získané z Parmazánu, u kterých byly pozorovány inhibiční zóny o průměru kolem 10 mm. Konkrétně šlo o kmeny *Leuconostoc pseudomesenteroides* (izolát č. 104), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (izoláty č. 106, 118, 119, 126 a 134), *Lacticaseibacillus paracasei* (izoláty č. 116 a 120), *Lacticaseibacillus casei* (izolát č. 125) a o *Lactobacillus* sp. (izolát č. 131). Na oba kmeny laktokoka také shodně působily kmeny *Lacticaseibacillus paracasei* (izoláty č. 44, 47, 48 a 67). Tyto izoláty ze sýru Krolewski tvořily zóny inhibice o průměru kolem 10 mm. Antimikrobiální aktivita dalších izolátů se mezi uvedenými kmeny laktokoků lišila. Zatímco na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 byly účinné izoláty č. 98 a 137 (*Lacticaseibacillus paracasei*) získané ze sýru Madeland, v případě *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 byla zóna inhibice pozorována po působení izolátů z Balkánského sýru *Leuconostoc pseudomesenteroides* (izolát č. 144) a *Lacticaseibacillus rhamnosus* (izolát č. 147).

Při analýze výsledků největší antimikrobiální aktivity v případě *Lactococcus cremoris* CCDM 946 byla největší antimikrobiální aktivita pozorována u izolátů

č. 104 – 108 a č. 111 – 122 získaných z Parmazánu, jejichž průměr inhibiční zóny činil 10 mm, a dále u izolátů č. 65 a 67 (*Lacticaseibacillus paracasei*) ze sýru Krolewski. Oproti kmenu *Lactococcus cremoris* CCDM 824, jehož výsledky jsou popsány níže pod Obrázkem 12, byla vůči tomuto kmenu *Lactococcus cremoris* CCDM 946 pozorována antimikrobiální aktivita *Staphylococcus warneri* (izolát. č. 2), izolovaného ze sýru Gouda. Průměr vzniklé inhibiční zóny byl 12 mm.

V případě bakterie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCDM 364 byla největší antimikrobiální aktivita pozorována u izolátů se schopností tvorby zóny inhibice o průměru 8 až 9 mm, získaných ze sýru Madeland (izolát č. 71 – 79, 82 a 90) a ze sýru Parmazán (izolát č. 116 – 120, 123). Identifikovanými izoláty ze sýru Madeland byly kmeny *Lacticaseibacillus paracasei*.



Obrázek 12 Velikost inhibičních zón u kmenů BMK

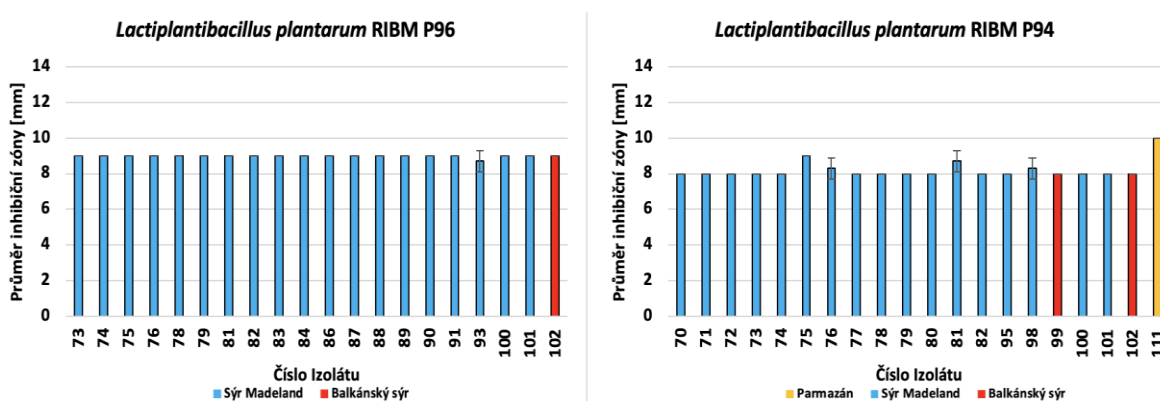
Výše na Obrázku 12 si můžete všimnout, že kmen *Lactococcus cremoris* CCDM 824 vykazoval citlivost vůči působení izolátů *Leuconostoc pseudomesenteroides* (izoláty č. 94, 99, 144), *Lacticaseibacillus paracasei* (izolát č. 102) a *Lacticaseibacillus rhamnosus* (izolát č. 147). Byly detekovány inhibiční zóny o průměru 9 až 10 mm. Tyto kmeny byly získané z Balkánského sýru. Obdobná citlivost *L. cremoris* byla pozorována i vůči působení izolátů z Parmazánu (inhibiční zóny o průměru 8,3 až 10 mm), z nichž jediný úspěšně identifikovaný kmen byl *Lacticaseibacillus rhamnosus* (izolát č. 134). Antimikrobiální

aktivita byla také zaznamenána u kmenů izolovaných ze sýrů Krolewski a Madeland, kdy byly detekovány inhibiční zóny o průměru 8,6 mm až 9,7 mm. Jedná se o izoláty identifikované jako *Lacticaseibacillus paracasei*.

V případě *Streptococcus thermophilus* CCDM 224 byla největší antimikrobiální aktivita (průměr inhibiční zóny 8 až 9 mm) pozorována u izolátu z Balkánského sýru *Lacticaseibacillus paracasei* (izolát č. 102) a ve všech izolátech sýru Madeland, které lze vidět na Obrázku 12. Podobná aktivita byla zachycena i v případě parmazánových izolátů *Lacticaseibacillus paracasei* (izoláty č. 116 a 120) a ostatních neúspěšně identifikovaných izolátů z tohoto sýru.

U bakterie *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM P89 můžeme vidět, že byly vytvořeny inhibiční zóny o průměru kolem 9 mm. Jednalo se zejména o izoláty *Lacticaseibacillus paracasei* získané ze sýru Madeland a z Balkánského sýru. Dále se antimikrobiální aktivita projevila i v případě izolátu č. 117, získaného z Parmazánu.

Při pozorování výsledků u indikátorového mikroorganismu *Levilactobacillus brevis* RIBM P20 si můžeme všimnout inhibičního působení *Lacticaseibacillus casei* (izolát č. 103) a *Lacticaseibacillus paracasei* (izoláty č. 116 a 120), které byly izolovány z Parmazánu. Antimikrobiální aktivitu u *Lacticaseibacillus paracasei* můžeme pozorovat i u izolátů získaných z ostatních druhů sýrů viz Obrázek 12. Na *Levilactobacillus brevis* RIBM P20 také inhibičně působily kmeny *Leuconostoc pseudomesenteroides* (izoláty č. 94 a 99), které se podařilo izolovat z Balkánského sýru.



Obrázek 13 Velikost inhibičních zón u kmenů BMK

Bakterie *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM P96 a *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM P94 byly nejvíce citlivé vůči izolátům získaných ze sýru Madeland. Jednalo se kmeny identifikované jako *Lacticaseibacillus paracasei*. Pro vzájemné porovnání průměr

inhibičních zón dosahoval 8 mm v případě indikátorového kmene *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM P94, a 9 mm v případě *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM P96. Izolát č. 111 (*Lacticaseibacillus paracasei*) tvořil proti kmenu *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM P96 oproti jiným izolátům větší zónu inhibice. Velikost zóny činila 10 mm. Antimikrobiální aktivita *Lacticaseibacillus paracasei* se projevila i u potravinových patogenních bakterií (viz výše) a byla zaznamenána i v literatuře (Yi et al., 2020).

Antimikrobiální aktivita daných izolátů je v případě produkce bakteriocinu mířena proti kmenům bakterií blízké příbuzným produkčnímu kmenu (Fathizadeh et al., 2022; Yap, Lai a Tan, 2022; Soltani et al., 2020). V literatuře nebývají většinou uvedeny informace o výsledcích antimikrobiální aktivity testované na příbuzné BMK. Důvodem je bezpečnost a využití těchto bakterií v potravinářství. Publikace uvádí většinou výsledky antimikrobiální aktivity mířené proti patogenním indikátorovým mikroorganismům.



## Shrnutí

Antimikrobiální aktivita BMK je v případě produkce bakteriocinu mířena proti kmenům bakterií blízké příbuzným produkčnímu kmenu (Fathizadeh et al., 2022, Yap, Lai a Tan, 2022, Soltani et al., 2020). Protože byly testovány většinou bakterie mléčného kvašení izolované z daných potravin, bylo očekáváno získání výsledků antimikrobiální aktivity častěji u indikátorových organismů BMK než u potravinových patogenů.

Celkově lze však zhodnotit, že tvorba zón inhibice se u daných izolátů projevila v případě každého z 15 testovaných indikátorových mikroorganismů. Vznik zóny inhibice byl v největší míře evidován proti *Staphylococcus aureus*, kdy byla antimikrobiální aktivita prokázána u 84 % z celkového počtu 150 izolátů. Ve studii prováděné autory Yi et al. (2020) byla zjištěna antimikrobiální aktivita vůči *S. aureus* pouze u 45 % získaných izolátů. Naopak nejmenší antimikrobiální aktivita izolátů byla v této studii evidována vůči testovanému kmenu *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM P94, kdy schopnost tvorby inhibiční zóny vykazovalo 32 % z celkového počtu 150 izolátů.

Na závěr je nutno poznamenat, že celkové získané výsledky antimikrobiální aktivity nelze vnímat pouze jako antimikrobiální aktivitu způsobenou produkcí bakteriocinů. Přítomnost bakteriocinů je třeba prokázat dalšími testy (např. přidáním proteináz) (Leslie et al., 2021, Yi et al., 2020), což z důvodu časové náročnosti této práce nebylo provedeno. Pro potvrzení, zdali se jedná opravdu o bakteriociny, je nutný další výzkum.

## ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla sledována antimikrobiální aktivita, konkrétně schopnost produkce bakteriocinů, grampozitivních bakterií izolovaných z potravin. Celkem bylo testováno 150 izolátů k 5 druhům potravinových patogenů a k 10 příbuzným druhům bakterií mléčného kvašení. Tvorba zón inhibice se u daných izolátů projevila v případě každého z 15 testovaných indikátorových mikroorganismů.

Vznik zóny inhibice byl v největší míře evidován proti *Staphylococcus aureus*, kdy byla antimikrobiální aktivita prokázána u 84 % z celkového počtu 150 izolátů. Naopak nejméně citlivý indikátorový mikroorganismus byl *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM P94, kdy schopnost tvorby inhibiční zóny vykazovalo 32 % z celkového počtu 150 izolátů.

Celkově lze vyhodnotit, že inhibiční aktivita na *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* a *Escherichia coli* byla pozorována u získaných izolátů *Lacticaseibacillus paracasei* a *Lactiplantibacillus plantarum*. U všech potravinových patogenů byla antimikrobiální aktivita v největší míře pozorována u izolátů získaných ze sýru Parmazán. Tvorba inhibiční zóny o největším průměru (16 mm) bakterií *Lacticaseibacillus rhamnosus* byla pozorována u indikátorového mikroorganismu *Bacillus cereus*. Identifikované izoláty vykazující antimikrobiální aktivitu na více indikátorových MO byly izoláty z Parmazánu (*Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lacticaseibacillus paracasei*), sýru Krolewski (*Lacticaseibacillus paracasei*), Balkánského sýru (*Leuconostoc pseudomesenteroides* a *Lacticaseibacillus rhamnosus*) a sýru Madeland (*Lacticaseibacillus paracasei*). Antimikrobiální aktivita *Limosilactobacillus fermentum* izolovaného z bílého jogurtu nebyla zaznamenána, stejně tak i aktivita izolátu ze zakysané smetany. Pro potvrzení, zdali se jedná o aktivitu bakteriocinů, je nutný další výzkum.

Získané výsledky antimikrobiální aktivity by mohly nalézt své uplatnění v potravinářském průmyslu nebo v lékařství. V potravinářském průmyslu by mohlo využití spočívat v konzervaci potravin, konkrétně ke kontrole patogenních mikroorganismů v potravinách. V lékařství by se mohlo jednat o aplikaci v kontrole mikroorganismů způsobujících infekce, nebo by se v budoucnu mohly bakteriociny využívat jako přírodní alternativa k antibiotikům, k nimž se v poslední době zvyšuje rezistence mnoha druhů bakterií. Antimikrobiální aktivita bakteriocinů je z těchto důvodů velmi zajímavým tématem výzkumu, na který se v poslední době soustředí mnoho vědců z celého světa, kteří provádějí další studie a testy pro možné zavedení využívání bakteriocinů.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

AHMAD, Varish et al., 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. **49**(1), 1-11 [cit. 2023-02-23]. ISSN 09248579. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016

ANJANA a Santosh Kumar TIWARI, 2022. Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 12(Neuvedeno), Strany neuvedeny [cit. 2023-05-04]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2022.851140

ANTOSHINA, Daria V., Sergey V. BALANDIN a Tatiana V. OVCHINNIKOVA, 2022. Structural Features, Mechanisms of Action, and Prospects for Practical Application of Class II Bacteriocins. *Biochemistry (Moscow)* [online]. **87**(11), 1387-1403 [cit. 2023-05-06]. ISSN 0006-2979. Dostupné z: doi:10.1134/S0006297922110165

BACHMANN, H.-P. et al., 2011. Cheese | Swiss-Type Cheeses. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences* [online]. Neuvedeno. Neuvedeno: Elsevier, s. 712-720 [cit. 2023-05-16]. ISBN 9780123744074. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00085-6

BANERJI, R., A. KARKEE a S. D. SAROJ, 2022. Bacteriocins against Foodborne Pathogens (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. **58**(5), 518-539 [cit. 2023-05-06]. ISSN 0003-6838. Dostupné z: doi:10.1134/S0003683822050052

BÁRTOVÁ, Eva, 2011. PCR (polymerázová řetězová reakce). In: *Molekulární biologie VFU Brno: Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat* [online]. Brno: VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie [cit. 2023-05-06]. Dostupné z: [https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-pcr&lang=cz](https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz)

BERGSMA, Simon et al., 2022. Biotechnological and Medical Aspects of Lactic Acid Bacteria Used for Plant Protection: A Comprehensive Review. *BioTech* [online]. **11**(3), Strany neuvedeny [cit. 2023-04-21]. ISSN 2673-6284. Dostupné z: doi:10.3390/biotech11030040

BHATTACHARYA, Dipanwita et al., 2022. Lactic Acid Bacteria and Bacteriocins: Novel Biotechnological Approach for Biopreservation of Meat and Meat Products. *Microorganisms* [online]. **10**(10), Strany neuvedeny [cit. 2023-04-22]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10102058

BUŇKOVÁ L. Potravinářská mikrobiologie, Mikrobiologie mléka a mléčných výrobků. Presentation presented at: [Tomas Bata Univezity; 2022; Zlín, Czechia.]

BURSOVÁ, Šárka et al., 2014. *Mikrobiologické laboratorní metody* [online]. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno [cit. 2023-04-30]. ISBN 978-80-7305-676-6. Dostupné z: [https://fvhe.vfu.cz/files/cela-skripta-bursova-a-kol\\_mlm-elektronicka-verze\\_upraveny-logolink.pdf](https://fvhe.vfu.cz/files/cela-skripta-bursova-a-kol_mlm-elektronicka-verze_upraveny-logolink.pdf)

CARTER, Ian et al., 2010. PCR Methodology. In: SCHULLER, Margret et al., ed. *PCR for Clinical Microbiology* [online]. Neuedeno. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 11-47 [cit. 2023-05-06]. ISBN 978-90-481-9038-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-90-481-9039-3\_2

COELHO, Márcia C., Francisco Xavier MALCATA a Célia C. G. SILVA, 2022. Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions. *Foods* [online]. **11**(15), Strany nevedeny [cit. 2023-04-22]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods11152276

CROWLEY, Sarah, Jennifer MAHONY a Douwe VAN SINDEREN, 2013. Broad-spectrum antifungal-producing lactic acid bacteria and their application in fruit models. *Folia Microbiologica* [online]. **58**(4), 291-299 [cit. 2023-04-21]. ISSN 0015-5632. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-012-0209-3

DABA, Ghoson M., Marwa O. ELNAHAS a Waill A. ELKHATEEB, 2022. Beyond biopreservatives, bacteriocins biotechnological applications: History, current status, and promising potentials. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [online]. **39**(Neuedeno), 1-16 [cit. 2023-03-01]. ISSN 18788181. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcab.2021.102248

DEVIRGILIIS, C. et al., 2010. Identification of tetracycline- and erythromycin-resistant Gram-positive cocci within the fermenting microflora of an Italian dairy food product. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **109**(1), 313-323 [cit. 2023-05-18]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04661.x

DONG, Huina et al., 2022. CRISPR/Cas tools for enhancing the biopreservation ability of lactic acid bacteria in aquatic products. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. **10**(Neuedeno), Strany nevedeny [cit. 2023-04-22]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2022.1114588

Druhy čistých mlékařských kultur pro zakysané výrobky, 2020. *Portál inovace vyššího odborného vzdělávání* [online]. Praha: ČVUT v Praze [cit. 2023-05-15]. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odz/tech/299/page20.html>

DURU, Ilhan Cem et al., 2018. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of the microbial community in Swiss-type Maasdam cheese during ripening. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **281**(Neuvedeno), 10-22 [cit. 2023-05-15]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.017

EGHBAL, Noushin, Christophe VITON a Adem GHARSALLAOUI, 2022. Nano and microencapsulation of bacteriocins for food applications: A review. *Food Bioscience* [online]. **50**(B), Strany neuvedeny [cit. 2023-05-04]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2022.102173

FATHIZADEH, Hadis et al., 2022. Bacteriocins: Recent Advances in its Application as an Antimicrobial Alternative. *Current Pharmaceutical Biotechnology* [online]. **23**(8), 1028-1040 [cit. 2023-04-22]. ISSN 13892010. Dostupné z: doi:10.2174/1389201022666210907121254

FERNANDES, Abigail a Renitta JOBBY, 2022. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential clinical applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. **194**(10), 4377-4399 [cit. 2023-04-22]. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1007/s12010-022-03870-3

HALEBIAN, S et al., 1981. Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **13**(3), 444-448 [cit. 2023-02-16]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/jcm.13.3.444-448.1981

HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, Juan Carlos et al., 2021. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. *Animals* [online]. **11**(4), 1-17 [cit. 2023-03-02]. ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi:10.3390/ani11040979

HUANG, Tang, Huang WANQIU a Yao YU-FENG, 2023. The metabolites of lactic acid bacteria: classification, biosynthesis and modulation of gut microbiota. *Microbial cell, The journal for unicellular biology and human disease* [online]. **10**(3), 49-62 [cit. 2023-04-21]. Dostupné z: <http://microbialcell.com/researcharticles/2023a-tang-microbial-cell/>

CHOI, Gee-Hyeun, Wilhelm Heinrich HOLZAPFEL a Svetoslav Dimitrov TODOROV, 2022. Diversity of the bacteriocins, their classification and potential applications in combat of antibiotic resistant and clinically relevant pathogens. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. **Neuveden**(Neuvedeno), 1-20 [cit. 2023-05-04]. ISSN 1040-841X. Dostupné z: doi:10.1080/1040841X.2022.2090227

JUTURU, Veeresh a Jin Chuan WU, 2018. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnology Advances* [online]. **36**(8), 2187-2200 [cit. 2023-04-16]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2018.10.007

KANDI, Venkataramana et al., 2016. Emerging Bacterial Infection: Identification and Clinical Significance of *Kocuria* Species. *Cureus* [online]. **8**(8), Strany neuvedeny [cit. 2023-05-18]. ISSN 2168-8184. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.731

KAUR SIDHU, Parveen a Kiran NEHRA, 2021. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria as Potent Antimicrobial Peptides against Food Pathogens. In: K. HABIB, Maki a César MARTÍN-GÓMEZ, ed. *Biomimetics* [online]. Neuvedeno. Neuvedeno: IntechOpen, s. 1-23 [cit. 2023-04-16]. ISBN 978-1-83962-170-3. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.95747

KOPECKÁ, Jana a Gabriela ROTKOVÁ, 2017. Úvod do identifikace bakterií, biochemické testy a standardizované identifikační systémy. In: *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií: Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity* [online]. Brno: Masarykova univerzita [cit. 2023-04-30]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni\\_mikrobiologie/web/pages/identifikace\\_bakterii.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/identifikace_bakterii.html)

LAHIRI, Dibyajit et al., 2022. Bacteriocin: A natural approach for food safety and food security. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. **10**(Neuvedeno), Strany neuvedeny [cit. 2023-04-22]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2022.1005918

LANDO, Vanessa, Nátalia Zini VALDUGA a Liziane Schittler MORONI, 2023. Functional characterization of Lactobacilli strains with antimicrobial activity against *Salmonella* spp. and cell viability in fermented dairy product. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [online]. **47**(Neuvedeno), 6 [cit. 2023-05-18]. ISSN 18788181. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcab.2023.102605

- LE, Mi Nguyen-Tra, Miki KAWADA-MATSUO a Hitoshi KOMATSUZAWA, 2022. Efficiency of Antimicrobial Peptides Against Multidrug-Resistant Staphylococcal Pathogens. *Frontiers in Microbiology* [online]. **13**(Neuvedeno), Strany neuvedeny [cit. 2023-05-04]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2022.930629
- LESLIE, V. A. et al., 2021. Bacteriocin producing microbes with bactericidal activity against multidrug resistant pathogens. *Journal of Infection and Public Health* [online]. **14**(12), 1802-1809 [cit. 2023-05-17]. ISSN 18760341. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiph.2021.09.029
- LIU, Guorong et al., 2022. Combined antimicrobial effect of bacteriocins with other hurdles of physicochemic and microbiome to prolong shelf life of food: A review. *Science of The Total Environment* [online]. **825**(Neuvedeno), 1-16 [cit. 2023-04-16]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.154058
- LIU, Xiaoming et al., 2013. Screening of lactobacilli with antagonistic activity against enteroinvasive Escherichia coli. *Food Control* [online]. **30**(2), 563-568 [cit. 2023-05-18]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.002
- LOSITO, Francesca et al., 2014. Microbiological safety and quality of Mozzarella cheese assessed by the microbiological survey method. *Journal of Dairy Science* [online]. **97**(1), 46-55 [cit. 2023-05-15]. ISSN 00220302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2013-7026
- MAZGUENE, Souhila, 2023. Lactic Acid Bacteria Metabolism: Mini-Review. *Current Nutrition & Food Science* [online]. **19**(2), 94-104 [cit. 2023-04-21]. ISSN 15734013. Dostupné z: doi:10.2174/1573401318666220527124256
- MEHDI HASSANPOUR, Mohammad, Anousheh SHARIFAN a Afshin AKHONDZADEH BASTI, 2019. The effect of probiotic strain of Lactobacillus fermentum on growth of Escherichia coli O111 during yogurt storage. *Food and health journal* [online]. **2**(3), 1-7 [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: [https://fh.srbiau.ac.ir/article\\_16012.html](https://fh.srbiau.ac.ir/article_16012.html)
- MELEH, Hadiza Umar et al., 2020. Isolation and safety characterisation of lactobacilli strains with antimicrobial properties as potential probiotics for human use. *LWT* [online]. **131**(Neuvedeno), 5 [cit. 2023-05-18]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2020.109796
- MILLS, Susan, R. Paul ROSS a Colin HILL, 2017. Bacteriocins and bacteriophage; a narrow-minded approach to food and gut microbiology. *FEMS Microbiology*

*Reviews* [online]. **41**(Supp\_1), S129-S153 [cit. 2023-04-16]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1093/femsre/fux022

MOKOENA, Mduduzi P., Cornelius A. OMATOLA a Ademola O. OLANIRAN, 2021. Applications of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins against Food Spoilage Microorganisms and Foodborne Pathogens. *Molecules* [online]. **26**(22), Strany neuvedeny [cit. 2023-04-22]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26227055

OJO, Abidemi Oluranti a Olga DE SMIDT, 2023. Lactic Acid: A Comprehensive Review of Production to Purification. *Processes* [online]. **11**(3), Strany neuvedeny [cit. 2023-04-21]. ISSN 2227-9717. Dostupné z: doi:10.3390/pr11030688

PACHLOVÁ, Vendula et al., 2018. Biogenic amine production by nonstarter strains of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus paracasei* in the model system of Dutch-type cheese. *LWT* [online]. **97**(Neuvedeno), 730-735 [cit. 2023-05-17]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2018.07.045

PARK, Wonseo et al., 2019. Microbiological Characteristics of Gouda Cheese Manufactured with Pasteurized and Raw Milk during Ripening Using Next Generation Sequencing. *Food Science of Animal Resources* [online]. **39**(4), 585-600 [cit. 2023-05-15]. ISSN 2636-0772. Dostupné z: doi:10.5851/kosfa.2019.e49

PARLINDUNGAN, Elvina et al., 2021. Lactic Acid Bacteria Diversity and Characterization of Probiotic Candidates in Fermented Meats. *Foods* [online]. **10**(7), 3-5 [cit. 2023-04-21]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods10071519

PEREIRA, Wellison Amorim et al., 2022. Use of Probiotic Bacteria and Bacteriocins as an Alternative to Antibiotics in Aquaculture. *Microorganisms* [online]. **10**(9), Strany neuvedeny [cit. 2023-05-04]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10091705

PÉREZ-RAMOS, Adrián et al., 2021. Current Knowledge of the Mode of Action and Immunity Mechanisms of LAB-Bacteriocins. *Microorganisms* [online]. **9**(10), Strany neuvedeny [cit. 2023-04-22]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9102107

PEREZ, Rodney Honrada, Takeshi ZENDO a Kenji SONOMOTO, 2022. Multiple bacteriocin production in lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and*



*Bioengineering* [online]. **134**(4), 277-287 [cit. 2023-05-05]. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiosc.2022.07.007

PUNIA BANGAR, Sneh et al., 2022. Retrospecting the concept and industrial significance of LAB bacteriocins. *Food Bioscience* [online]. **46**(Neuvedeno), 1-13 [cit. 2023-03-08]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2022.101607

RAHMEH, R. et al., 2019. Distribution and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from raw camel milk. *New Microbes and New Infections* [online]. **30**(C), 1-4 [cit. 2023-04-20]. ISSN 20522975. Dostupné z: doi:10.1016/j.nmni.2019.100560

RANGEL-ORTEGA, Sarahi del Carmen et al., 2023. Biological control of pathogens in artisanal cheeses. *International Dairy Journal* [online]. **140**(Neuvedeno), Strany neuvedeny [cit. 2023-04-21]. ISSN 09586946. Dostupné z: doi:10.1016/j.idairyj.2023.105612

RASHEED, Hafiz Abdul et al., 2021. Effect of Novel Bacteriocinogenic *Lactobacillus fermentum* BZ532 on Microbiological Shelf-Life and Physicochemical and Organoleptic Properties of Fresh Home-Made Bozai. *Foods* [online]. **10**(9) [cit. 2023-03-29]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods10092120

ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana, 2007. Barvení dle GRAMA: Encyklopedie hydrobiologie. In: *VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO TECHNOLOGICKÁ V PRAZE: Jana Říhová Ambrožová Encyklopedie hydrobiologie* [online]. Praha: VŠCHT Praha [cit. 2023-04-29]. Dostupné z: [https://e-learning.vscht.cz/knihy/uid\\_es-006/ebook.html?p=B012](https://e-learning.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=B012)

SHAABAN, Shymaa et al., 2022. Evaluation of the antibacterial activity of *Lactobacilli* probiotics supernatants against *Enterococcus faecalis* (in-vitro study). *BMC Oral Health* [online]. **22**(407), Strany neuvedeny [cit. 2023-05-18]. Dostupné z: <https://bmcoralhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12903-022-02434-5>

SHAFIQUE, Bakhtawar et al., 2023. Recent Trends and Applications of Nanoencapsulated Bacteriocins against Microbes in Food Quality and Safety. *Microorganisms* [online]. **11**(1), Strany neuvedeny [cit. 2023-04-21]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms11010085

SCHULLER, Margret et al., ed., 2010. *PCR for Clinical Microbiology* [online]. Neuvedeno. Dordrecht: Springer Netherlands [cit. 2023-05-06]. ISBN 978-90-481-9038-6. Dostupné z: [https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-90-481-9039-3\\_2.pdf](https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-90-481-9039-3_2.pdf)

SOLA, Laura et al., 2022. Insights on the bacterial composition of Parmigiano Reggiano Natural Whey Starter by a culture-dependent and 16S rRNA metabarcoding portrait. *Scientific Reports* [online]. **12**(Neuvedeno), Strany neuvedeny [cit. 2023-05-15]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-22207-y>

SOLTANI, Samira et al., 2020. Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. **45**(1), 1-24 [cit. 2023-03-11]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1093/femsre/fuaa039

SUWANJINDA, Duongdearn, Chris EAMES a Watanalai PANBANGRED, 2007. Screening of lactic acid bacteria for bacteriocins by microbiological and PCR methods. *Biochemistry and Molecular Biology Education* [online]. **35**(5), 364-369 [cit. 2023-04-15]. ISSN 14708175. Dostupné z: doi:10.1002/bmb.84

TAGLIAZUCCHI, Davide et al., 2020. Cultivable non-starter lactobacilli from ripened Parmigiano Reggiano cheeses with different salt content and their potential to release anti-hypertensive peptides. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **330**(Neuvedeno), Strany neuvedeny [cit. 2023-05-18]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108688

TIRLONI, Erica et al., 2020. Biopreservation as a potential hurdle for *Bacillus cereus* growth in fresh cheese. *Journal of Dairy Science* [online]. **103**(1), 150-160 [cit. 2023-05-17]. ISSN 00220302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2019-16739

TODOROV, Svetoslav Dimitrov et al., 2022. Use of Bacteriocins and Bacteriocinogenic Beneficial Organisms in Food Products: Benefits, Challenges, Concerns. *Foods* [online]. **11**(19), Strany neuvedeny [cit. 2023-05-04]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods11193145

VEETIL, Vajid Nettoor a Vijaya CHITRA, 2022. LANTIBIOTICS OF MILK ISOLATES: A SHORT REVIEW ON CHARACTERIZATION AND POTENTIAL APPLICATIONS. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences* [online]. **11**(4), Strany neuvedeny [cit. 2023-05-05]. Dostupné z: <https://office2.jmbfs.org/index.php/JMBFS/article/view/3702>

YAGHOUBI, Atieh et al., 2022. Bacterial Peptides and Bacteriocins as a Promising Therapy for Solid Tumor. *Current Pharmaceutical Design* [online]. **28**(38), 3105-3113 [cit. 2023-05-04]. ISSN 13816128. Dostupné z: doi:10.2174/1381612828666220921150037

YAP, Pei Gee, Zee Wei LAI a Joo Shun TAN, 2022. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification strategies and applications in food and medical industries. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* [online]. **11**(1), Strany neuvedeny [cit. 2023-04-22]. ISSN 2314-8543. Dostupné z: doi:10.1186/s43088-022-00227-x

YI, Lanhua et al., 2020. Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in Chinese homemade pickle and dry-cured meat, and bacteriocin identification by genome sequencing. *LWT* [online]. **125**(Neuvedeno), Strany neuvedeny [cit. 2023-05-17]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2020.109177

ZAPAŚNIK, Agnieszka, Barbara SOKOŁOWSKA a Marcin BRYŁA, 2022. Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Safety. *Foods* [online]. **11**(9), Strany neuvedeny [cit. 2023-04-22]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods11091283

ZHENG, Jinshui et al., 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **70**(4), 2782-2858 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.004107

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

ATP	Adenosintrifosfát
BHI	Infuze mozkové a srdcové tkáně
BMK	Bakterie mléčného kvašení
bp	Pár bází
CFU	Kolonie tvořící jednotka
CPM	Celkový počet mikroorganismů
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
G -	Gramnegativní
G +	Grampozitivní
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxid vodíku
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KOH	Hydroxid draselný
MALDI-TOF	Hmotnostní spektrometrie
MO	Mikroorganismus
MRS	„de Mann, Rogosa a Sharpe“
NCBI	Národní centrum pro biotechnologické informace
OXI	Oxidázový
PCA	„Plate count agar“
PCR	Polymerázová řetězová reakce

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Dělení bakteriocinů dle vlastností .....	13
Obrázek 2 Spektrum účinku bakteriocinů a antibiotik .....	20
Obrázek 3 Schéma biosyntézy bakteriocinů .....	22
Obrázek 4 Běžně používané strategie pro aplikaci bakteriocinu v potravinářství.....	30
Obrázek 5 Schéma ionizace .....	45
Obrázek 6 Počet získaných izolátů z daných potravin .....	48
Obrázek 7 Zastoupení izolátů dle morfologie.....	49
Obrázek 8 Počty jednotlivých identifikovaných bakterií .....	56
Obrázek 9 Velikost inhibičních zón u patogenních mikroorganismů.....	57
Obrázek 10 Velikost inhibičních zón u <i>Bacillus cereus</i> .....	60
Obrázek 11 Velikost inhibičních zón u kmenů BMK.....	61
Obrázek 12 Velikost inhibičních zón u kmenů BMK.....	62
Obrázek 13 Velikost inhibičních zón u kmenů BMK.....	63

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Výsledky identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF (sýr Mozzarella).....	49
Tabulka 2 Výsledky identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF (zakysaná smetana).....	50
Tabulka 3 Výsledky identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF (Balkánský sýr).....	50
Tabulka 4 Výsledky identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF (sýr Krolewski).....	51
Tabulka 5 Výsledky identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF (sýr Madeland).....	52
Tabulka 6 Výsledky identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF (Parmazán).....	53
Tabulka 7 Výsledky identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF (bílý jogurt).....	54
Tabulka 8 Výsledky identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF (sýr gouda).....	55

## **SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha P I: Výsledná tabulka typizace a identifikace získaných izolátů

Příloha P II: Výsledná tabulka tvorby inhibičních zón

# PŘÍLOHA P I: VÝSLEDNÁ TABULKA TYPIZACE A IDENTIFIKACE ZÍSKANÝCH IZOLÁTŮ

Tabulka 1a -Výsledná typizace a identifikace izolátů

Potravina	Půda	Izolát	Morfologie	Gram	KOH	Kat	Oxi	Identifikace MALDI-TOF	Skóre
Balkánský sýr	PCA	1	Koky	G +	G +	POZ	NEG	<i>Kocuria varians</i>	2.195
Balkánský sýr	M17	35	Koky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lactococcus lactis</i>	2.309
Balkánský sýr	M17	36	Koky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lactococcus lactis</i>	2.240
Balkánský sýr	M17	37	Koky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lactococcus lactis</i>	2.244
Balkánský sýr	M17	94	Koky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1,898
Balkánský sýr	M17	96	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,897
Balkánský sýr	M17	99	Koky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1,84
Balkánský sýr	M17	102	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,342
Balkánský sýr	M17	139	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	Nespolehlivá identifikace	
Balkánský sýr	M17	140	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	Nespolehlivá identifikace	
Balkánský sýr	M17	141	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	Nespolehlivá identifikace	
Balkánský sýr	M17	142	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	Nespolehlivá identifikace	
Balkánský sýr	M17	143	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	Nespolehlivá identifikace	
Balkánský sýr	M17	144	Koky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1,779
Balkánský sýr	PCA	145	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	Nespolehlivá identifikace	
Balkánský sýr	MRS	147	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	2.148
Balkánský sýr	MRS	148	Koky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1,712
Balkánský sýr	MRS	149	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	Nespolehlivá identifikace	
Balkánský sýr	MRS	150	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	Nespolehlivá identifikace	
Bílý jogurt	MRS	7	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.961
Bílý jogurt	MRS	8	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.749
Bílý jogurt	MRS	9	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.704
Bílý jogurt	MRS	10	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.894
Bílý jogurt	MRS	11	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	2.014
Bílý jogurt	MRS	12	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.793
Bílý jogurt	MRS	13	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.965
Bílý jogurt	MRS	14	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1,925
Bílý jogurt	MRS	15	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1,797
Bílý jogurt	MRS	16	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.875
Bílý jogurt	MRS	17	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.904



Tabulka 1a - Výsledná typizace a identifikace izolátů - pokračování

Potravina	Půda	Izolát	Morfologie	Gram	KOH	Kat	Oxi	Identifikace MALDI-TOF	Skóre
Bílý jogurt	MRS	18	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.846
Bílý jogurt	MRS	19	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	2.015
Bílý jogurt	MRS	20	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	2.060
Bílý jogurt	MRS	21	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.966
Bílý jogurt	MRS	22	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.889
Bílý jogurt	MRS	23	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.943
Bílý jogurt	MRS	24	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.875
Bílý jogurt	MRS	25	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.876
Bílý jogurt	MRS	26	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	2.035
Bílý jogurt	MRS	27	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.831
Bílý jogurt	MRS	28	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	2.003
Bílý jogurt	MRS	29	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.837
Bílý jogurt	MRS	30	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1.819
Parmazán	PCA	103	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	1.714
Parmazán	PCA	104	Koky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1,905
Parmazán	PCA	105	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	PCA	106	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	2,07
Parmazán	PCA	107	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	PCA	108	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	MRS	109	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	1,965
Parmazán	MRS	110	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	MRS	111	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	MRS	112	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	MRS	113	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	MRS	114	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	MRS	115	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	MRS	116	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,22
Parmazán	MRS	117	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	MRS	118	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	1.807
Parmazán	MRS	119	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	1.786
Parmazán	MRS	120	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,233
Parmazán	MRS	121	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lactobacillus sp.</i>	1,793
Parmazán	MRS	122	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	MRS	123	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	MRS	124	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	MRS	125	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	1.752

Tabulka 1b - Výsledná typizace a identifikace izolátů - pokračování

Potravina	Půda	Izolát	Morfologie	Gram	KOH	Kat	Oxi	Identifikace MALDI-TOF	Skóre
Parmazán	MRS	126	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	1,861
Parmazán	MRS	127	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	1,97
Parmazán	M17	128	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	M17	130	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	M17	131	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lactobacillus sp.</i>	1,78
Parmazán	M17	132	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	M17	133	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	M17	134	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	2,003
Parmazán	M17	135	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,215
Parmazán	M17	136	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Parmazán	M17	138	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	2,079
Sýr Gouda	PCA	2	Koky	G +	G +	POZ	NEG	<i>Staphylococcus warneri</i>	1,931
Sýr Gouda	MRS	31	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Sýr Gouda	MRS	32	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Sýr Gouda	MRS	33	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	1,893
Sýr Gouda	MRS	34	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Sýr Gouda	M17	38	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Sýr Gouda	MRS	49	Tyčinky	G +	G +	POZ	NEG	<i>Staphylococcus capitis</i>	1,732
Sýr Gouda	MRS	50	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Sýr Gouda	MRS	52	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Sýr Gouda	MRS	53	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,917
Sýr Gouda	MRS	54	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Sýr Gouda	MRS	55	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Sýr Gouda	MRS	56	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	1,85
Sýr Gouda	MRS	57	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	1,866
Sýr Gouda	M17	58	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	1,76
Sýr Gouda	M17	59	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	1,882
Sýr Gouda	M17	60	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Sýr Gouda	M17	61	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Sýr Gouda	M17	62	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	1,946
Sýr Gouda	M17	63	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
Sýr Gouda	MRS	152	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	2,055
Sýr Krolewski	PCA	43	Koky	G +	G +	POZ	NEG	<i>Staphylococcus warneri</i>	2,032
Sýr Krolewski	MRS	44	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,197
Sýr Krolewski	MRS	45	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,717
Sýr Krolewski	MRS	46	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	

Tabulka 1c - Výsledná typizace a identifikace izolátů - pokračování

Potravina	Půda	Izolát	Morfologie	Gram	KOH	Kat	Oxi	Identifikace MALDI-TOF	Skóre
S. Krolewski	MRS	47	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,976
S. Krolewski	MRS	48	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,849
S. Krolewski	M17	64	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
S. Krolewski	M17	65	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,885
S. Krolewski	M17	66	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
S. Krolewski	M17	67	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,152
S. Krolewski	M17	68	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	1,808
S. Krolewski	M17	69	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
S. Krolewski	M17	92	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,718
S. Krolewski	M17	97	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	1,908
S. Krolewski	PCA	146	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,171
S. Krolewski	MRS	151	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
S. Madeland	PCA	70	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,053
S. Madeland	PCA	71	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,88
S. Madeland	PCA	72	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,932
S. Madeland	PCA	73	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,940
S. Madeland	PCA	74	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,803
S. Madeland	PCA	75	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,104
S. Madeland	MRS	76	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,082
S. Madeland	MRS	77	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,741
S. Madeland	MRS	78	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,968
S. Madeland	MRS	79	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,147
S. Madeland	MRS	80	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,728
S. Madeland	MRS	81	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,787
S. Madeland	MRS	82	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,889
S. Madeland	MRS	83	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,842
S. Madeland	MRS	84	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,884
S. Madeland	MRS	85	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,764
S. Madeland	MRS	86	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,221
S. Madeland	MRS	87	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,966
S. Madeland	MRS	88	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,879
S. Madeland	MRS	89	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,961
S. Madeland	M17	90	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	
S. Madeland	M17	91	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,816
S. Madeland	M17	93	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,127
S. Madeland	M17	95	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Nespolehlivá identifikace</i>	

Tabulka 1d - Výsledná typizace a identifikace izolátů - pokračování

Potravina	Půda	Izolát	Morfologie	Gram	KOH	Kat	Oxi	Identifikace MALDI-TOF	Skóre
Sýr Madeland	M17	98	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,849
Sýr Madeland	M17	100	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,128
Sýr Madeland	M17	101	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,813
Sýr Madeland	M17	129	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	1,948
Sýr Madeland	M17	137	Tyčinky	G +	G +	NEG	NEG	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2,119
Sýr Mozzarella	PCA	3	Tyčinky	G +	G +	POZ	POZ	Nespolehlivá identifikace	
Sýr Mozzarella	PCA	4	Koky	G +	G +	POZ	NEG	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,734
Sýr Mozzarella	PCA	5	Koky	G +	G +	POZ	NEG	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,812
Sýr Mozzarella	PCA	6	Koky	G +	G +	POZ	NEG	<i>Staphylococcus warneri</i>	1,908
Sýr Mozzarella	M17	39	Koky	G +	G +	POZ	NEG	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,995
Sýr Mozzarella	M17	40	Koky	G +	G +	POZ	NEG	<i>Staphylococcus warneri</i>	1,895
Sýr Mozzarella	M17	41	Koky	G +	G +	POZ	NEG	<i>Staphylococcus warneri</i>	1,990
Sýr Mozzarella	M17	42	Koky	G +	G +	POZ	NEG	<i>Staphylococcus warneri</i>	1,844
Zakysaná smetana	PCA	51	Kokotyč.	G +	G +	NEG	NEG	Nespolehlivá identifikace	







Tabulka 2d - Výsledná tabulka tvorby inhibičních zón pokračování

Číslo izolátu	Průměry inhibičních zón ± SD [mm]														
	Indikátorové mikroorganismy*														
	1) ST	2) EC	3) SA	4) EF	5) BC	6) LL1	7) LCI	8) LD	9) LL2	10) LC2	11) SCT	12) LP	13) LB	14) LP1	15) LP2
63-64	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
65	10,3 ± 0,6	10,0 ± 2,6	10,3 ± 0,6	9,3 ± 0,6	10,0 ± 0,0	7,3 ± 0,6	10,3 ± 0,6	7,0 ± 1,7	8,7 ± 0,6	9,3 ± 0,6	7,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	7,3 ± 0,6	7,0 ± 0,0
66	0,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
67	12,7 ± 2,1	9,7 ± 2,3	10,3 ± 0,6	9,3 ± 0,6	10,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	11,0 ± 0,0	7,7 ± 1,2	9,0 ± 0,0	9,0 ± 1,0	7,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0
68	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
69	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
70	7,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	9,3 ± 0,6	7,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	8,7 ± 0,6	7,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0
71	7,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	9,3 ± 0,6	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	8,0 ± 1,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	8,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0
72	7,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	9,3 ± 0,6	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	8,3 ± 1,2	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	8,7 ± 0,6	7,7 ± 0,6	8,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0
73	7,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	6,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0
74	7,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0
75	7,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	7,3 ± 0,6	7,3 ± 0,6	7,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	9,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0
76	6,3 ± 1,2	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6
77	7,7 ± 0,6	8,3 ± 0,6	9,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	6,3 ± 0,6	8,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0
78	7,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,3 ± 0,6	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	6,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0
79	7,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	7,3 ± 0,6	7,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	6,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0
80	7,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	9,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	8,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0
81	7,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	6,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6
82	7,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	9,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0
83	7,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	9,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	5,7 ± 0,6	7,7 ± 0,6	7,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6



Tabulka 2e - Výsledná tabulka tvorby inhibičních zón pokračování

Číslo izolátu	Průměry inhibičních zón ± SD [mm]														
	Indikátorové mikroorganismy*														
	1) ST	2) EC	3) SA	4) EF	5) BC	6) LL1	7) LC1	8) LD	9) LL2	10) LC2	11) SCT	12) LP	13) LB	14) LPI	15) LP2
84	7,3 ± 0,6	7,3 ± 1,2	9,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	7,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	7,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	7,3 ± 0,6
85	7,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0
86	7,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0
87	7,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0
88	7,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,3 ± 0,6	7,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0
89	7,0 ± 0,0	7,3 ± 1,2	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0
90	7,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	10,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	7,3 ± 0,6	8,3 ± 0,6	7,0 ± 0,0	8,0 ± 1,0	7,0 ± 0,0	7,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0
91	0,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	9,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0
92	7,0 ± 0,0	6,3 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	7,3 ± 0,6	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
93	7,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	7,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	7,7 ± 0,6	8,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	7,7 ± 0,6
94	7,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	5,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	7,3 ± 0,6	9,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
95	7,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,7 ± 1,2	6,7 ± 0,6	6,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	6,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0
96	8,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,7 ± 1,2	0,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
97	8,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,7 ± 1,2	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
98	8,7 ± 0,6	7,3 ± 0,6	7,3 ± 0,6	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,7 ± 0,6	7,7 ± 0,6	7,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	8,3 ± 0,6
99	8,7 ± 0,6	7,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0
100	9,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	9,3 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0
101	0,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	7,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0
102	0,0 ± 0,0	7,3 ± 0,6	7,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0
103	9,0 ± 0,0	8,3 ± 2,1	9,3 ± 2,3	9,7 ± 0,6	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	8,7 ± 1,2	7,0 ± 0,0	7,0 ± 1,7	6,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0

Tabulka 2f - Výsledná tabulka tvorby inhibičních zón pokračování

Číslo izolátu	Průměry inhibičních zón ± SD [mm]														
	Indikátorové mikroorganismy*														
	1) ST	2) EC	3) SA	4) EF	5) BC	6) LL1	7) LCI	8) LD	9) LL2	10) LC2	11) SCT	12) LP	13) LB	14) LPI	15) LP2
104	9,3 ± 0,6	7,3 ± 1,2	9,3 ± 2,3	10,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
105	9,3 ± 0,6	8,3 ± 2,1	12,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	6,3 ± 0,6	8,0 ± 1,0	6,5 ± 0,7	0,0 ± 0,0	6,3 ± 0,6	7,0 ± 1,0	8,0 ± 0,0	6,3 ± 0,6
106	0,0 ± 0,0	8,7 ± 2,3	12,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,3 ± 0,6	10,0 ± 0,0	6,3 ± 0,6	9,0 ± 1,0	0,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	7,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
107	9,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	14,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	6,3 ± 0,6	9,3 ± 0,6	9,7 ± 0,6	8,7 ± 0,6	8,3 ± 0,6	7,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
108	0,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	14,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	9,0 ± 1,0	10,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	8,3 ± 0,6	7,7 ± 0,6	8,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0
109	0,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,7 ± 0,6	6,3 ± 0,6	8,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
110	8,7 ± 0,6	9,7 ± 0,6	11,7 ± 0,6	10,0 ± 0,0	14,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	10,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	9,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	7,5 ± 0,7	8,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	6,3 ± 0,6
111	9,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	9,7 ± 0,6	14,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	7,3 ± 0,6	9,0 ± 0,0	9,0 ± 1,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	7,3 ± 0,6	10,0 ± 0,0
112	0,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	10,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	6,5 ± 0,7
113	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	14,3 ± 0,6	9,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,3 ± 0,6	9,0 ± 0,0	9,0 ± 1,7	8,3 ± 0,6	8,3 ± 0,6	7,7 ± 0,6	6,7 ± 0,6
114	0,0 ± 0,0	10,0 ± 1,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6	9,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6	7,7 ± 0,6	9,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	9,0 ± 1,7	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	7,7 ± 0,6	6,3 ± 0,6
115	0,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6	10,3 ± 0,6	10,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6	7,7 ± 0,6	8,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,3 ± 0,6	9,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0
116	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	9,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	6,5 ± 0,7	0,0 ± 0,0
117	0,0 ± 0,0	9,3 ± 0,6	10,7 ± 0,6	10,0 ± 0,0	14,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	8,5 ± 0,7	8,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
118	0,0 ± 0,0	9,3 ± 0,6	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	16,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
119	0,0 ± 0,0	9,3 ± 0,6	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
120	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6	8,3 ± 0,6	8,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
121	0,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6	9,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	8,3 ± 0,6	6,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
122	0,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	8,7 ± 0,6	6,3 ± 0,6	7,7 ± 1,2	9,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	6,3 ± 0,6
123	8,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0



Tabulka 2b - Výsledná tabulka tvorby inhibičních zón pokračování

Číslo izolátu	Průměry inhibičních zón ± SD [mm]														
	Indikátorové mikroorganismy*														
	1) ST	2) EC	3) SA	4) EF	5) BC	6) LL1	7) LC1	8) LD	9) LL2	10) LC2	11) SCT	12) LP	13) LB	14) LP1	15) LP2
144	12,0 ± 0,0	8,7 ± 1,2	10,3 ± 0,6	7,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	6,5 ± 0,7	9,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
145	0,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	8,5 ± 0,7	7,7 ± 0,6	9,0 ± 0,0	6,5 ± 0,7	9,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
146	10,3 ± 0,6	8,7 ± 1,2	9,0 ± 0,0	7,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	9,0 ± 0,0	7,5 ± 0,7	8,7 ± 0,6	8,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
147	10,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	11,0 ± 0,0	7,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	7,5 ± 0,7	9,0 ± 0,0	9,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
148	10,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6	7,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	7,7 ± 0,6	7,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
149	0,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,7 ± 0,6	6,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	8,0 ± 1,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
150	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	6,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	6,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
151	8,3 ± 0,6	8,0 ± 0,0	9,7 ± 0,6	6,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
152	8,3 ± 0,6	7,7 ± 0,6	9,7 ± 0,6	6,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	8,0 ± 1,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

**\*Indikátorové mikroorganismy:**

- |                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| 1) <i>Salmonella</i> Typhimurium                                      | ST  |
| 2) <i>Escherichia coli</i>                                            | EC  |
| 3) <i>Staphylococcus aureus</i>                                       | SA  |
| 4) <i>Enterococcus faecalis</i>                                       | EF  |
| 5) <i>Bacillus cereus</i>                                             | BC  |
| 6) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141            | LL1 |
| 7) <i>Lactococcus cremoris</i> CCDM 946                               | LC1 |
| 8) <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CCDM 364 | LD  |
| 9) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004           | LL2 |
| 10) <i>Lactococcus cremoris</i> CCDM 824                              | LC2 |
| 11) <i>Streptococcus thermophilus</i> CCDM 224                        | SCT |
| 12) <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RIBM P89                     | LP  |
| 13) <i>Levilactobacillus brevis</i> RIBM P20                          | LB  |
| 14) <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RIBM P96                     | LP1 |
| 15) <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RIBM P94                     | LP2 |