Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Gramnegativní bakterie v sušené dětské výživě

Izolace a charakterizace

Ing. Pavlína Píšová
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Obsah

- Úvod do problematiky
- Cíl práce
- Metodika
- Průběžné výsledky
- Shrnutí



Obr. 1: Sušené mléko

Beggs 2 pokračovací mléko (800 g). Online. In: Beggs. Dostupné z: https://beggs.cz/cdn/shop/files/beggs2_mleko2.jpg?v=1762522760&width=2000. [cit. 2025-12-16].

Úvod do problematiky

Sušená dětská mléčná výživa/kaše



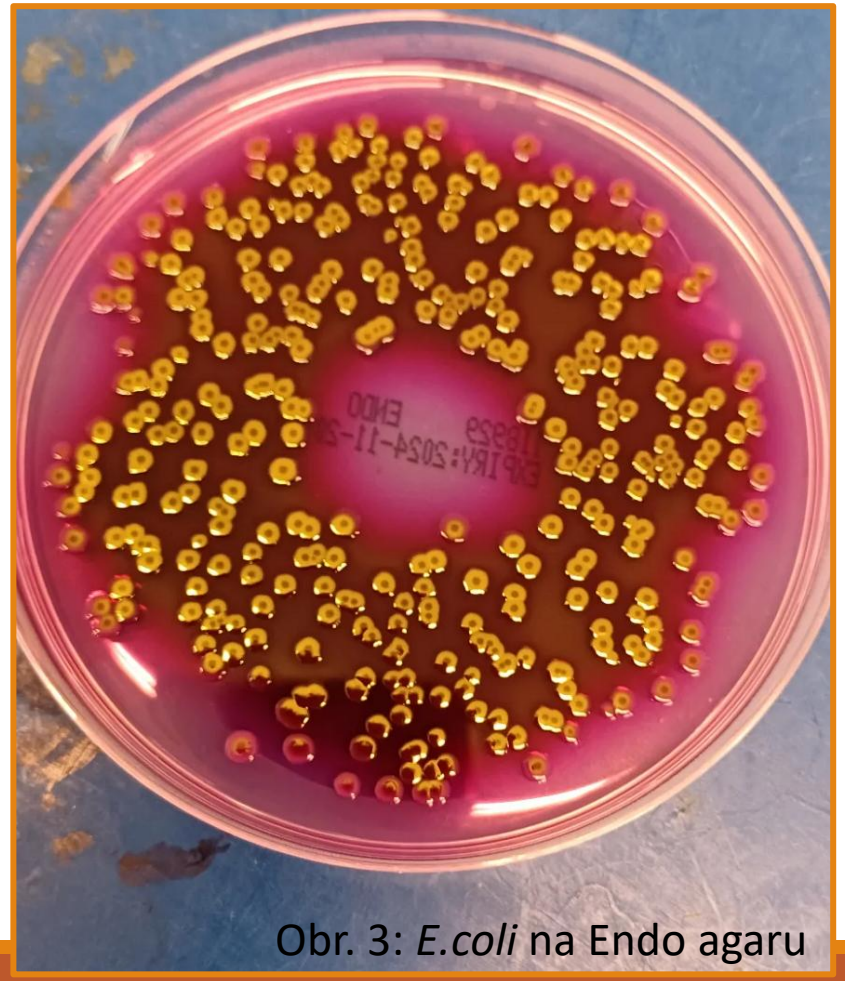
Obr. 2: Sušené mléko

- Sušená dětská výživa -> vysoké nároky na bezpečnost
  - Slabý imunitní systém kojenců
- Kojenecké cereální potraviny, prášková kojenecká výživa = nesterilní
  - Nízké počty mikroorganizmů -> potenciální riziko[1,2]

Literatura k dispozici u autorky

Sušené mléko. Online. LAKTEA o.p.s. Dostupné z: https://www.laktea.cz/index.php?page=zdrava-vyziva&article=susene-mlekox.

Gramnegativní bakterie v potravinách s nepříznivými podmínkami růstu



Obr. 3: *E.coli* na Endo agaru

- Životaschopnost mikroorganizmů negativně ovlivňována faktory při zpracování
  - Tepelný, osmotický a oxidační stres, zvýšení intracelulárního pH a koncentrace solí v důsledku ztráty vody[3]
- Sušené potraviny -> nízká vodní aktivita (nižší než 0,70)[4]
- Nízká aktivita vody nebrání kontaminaci, pouze inhibuje růst[5]

Literatura k dispozici u autorky

E.coli on Endo agar is by far my favourite looking combo. Shiny and metallic., 2024. Online. In: Reddit. Dostupné z: https://www.reddit.com/r/microbiology/comments/1fwct1o/ecoli_on_endo_agar_is_by_far_my_favourite_looking/.

Mechanizmy přežití konzervačního zákroku



Obr. 4: Sušené ovoce

- Mikroorganizmy v prostředí s nízkou vodní aktivitou často odolnější vůči tepelnému ošetření[3]
- Adaptace buněk po předchozím tepelném nebo osmotickém šoku[6, 7]
- Neredukující cukry a další rozpuštěné látky v prostředí potraviny -> ochranné látky proti poškození dehydratací[6]

Literatura k dispozici u autorky

How Long Can Freeze Dried Fruit Last: Understanding Shelf Life and Storage Tips, 2025. Online. In: Https://eherbal.co/. Dostupné z: https://eherbal.co/how-long-can-freeze-dried-fruit-last-understanding-shelf-life-and-storage-tips/.

Výskyt v konkrétních potravinách



Obr. 5: *Acinetobacter* spp.

- Studie z roku 2006 zaměřená na stanovení mikrobioty u potraviny očekávaných jako složky kojenecké stravy:
  - >5 log CFU/g (CPM aerobních, plotnová kultivace) u 81 % hnědé rýže, 50 % dýně, 43 % brambor a 47 % mrkve
  - Počty *Enterobacteriaceae:* 3 log CFU/g nebo více u 53 % banánů, 75 % dýní, 67 % sóji a 68 % mrkve[8]
- Zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* -> z práškového plnotučného a odtučněného mléka a práškové kojenecké výživy (*Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp. a *Escherichia* spp.)[1,9]
- Kontaminace kojenecké výživy *Salmonella* spp. spojována s onemocněním u kojenců[10]

Literatura k dispozici u autorky

Bakterií Acinetobacter Helena, 2017. Online. In: Depositphotos. Dostupné z: https://depositphotos.com/cz/photo/bacterium-acinetobacter-baumannii-153521402.html.

Výskyt v konkrétních potravinách



Obr. 5: *Acinetobacter* spp.

- *Cronobacter sakazakii:*
  - Oportunitní patogen
  - Nebezpečný u novorozenců a kojenců s oslabenou imunitou
  - Přítomnost v potravinách rostlinného původu/sušené kojenecké výživě (z přidávaných suchých surovin (rýže, sója) a z výrobního prostředí)[10, 11]
- *Acinetobacter baumannii:*
  - Oportunním patogen
  - Zvýšená odolnosti vůči antibiotikům[2]
  - Karbapenem-rezistentní *Acinetobacter* spp. -> z kojenecké výživy v nemocnici v Rio de Janeiru[12]

Literatura k dispozici u autorky

Bakterií Acinetobacter Helena, 2017. Online. In: Depositphotos. Dostupné z: https://depositphotos.com/cz/photo/bacterium-acinetobacter-baumannii-153521402.html.

Cíl práce

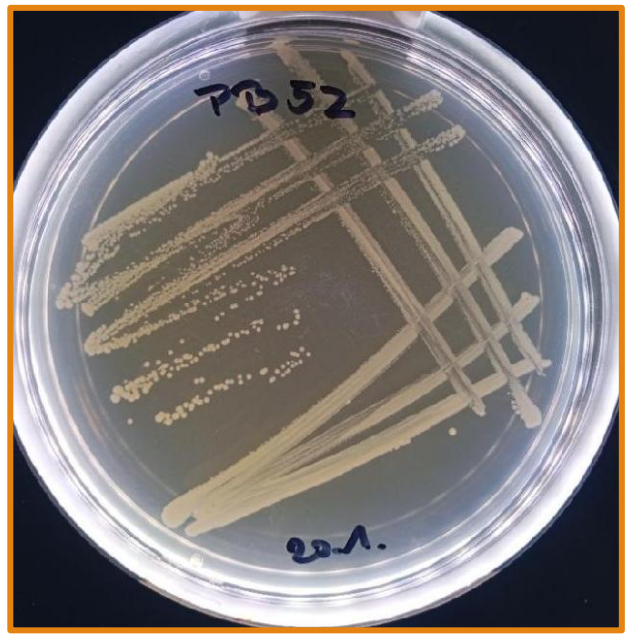
- Přítomnost a identifikace gramnegativních bakterií v potravinách s nepříznivými podmínkami pro jejich růst
  - Sušená dětská mléčná výživa, kaše a jejich suroviny
- Určení jejich vlastností (tvorba biofilmu, antibiotická rezistence a citlivost k přírodním látkám) a vliv kultivačních podmínek
  - S ohledem na udržitelnost zkoumaných potravin a jejich bezpečnost pro spotřebitele

Metodika

Izolace a identifikace mikroorganizmů

- Izolace:
  - Vzorky sušeného kozího mléka, kaší a sušeného ovoce
  - Příprava ředění při laboratorní teplotě a teplotě doporučené výrobcem k přípravě

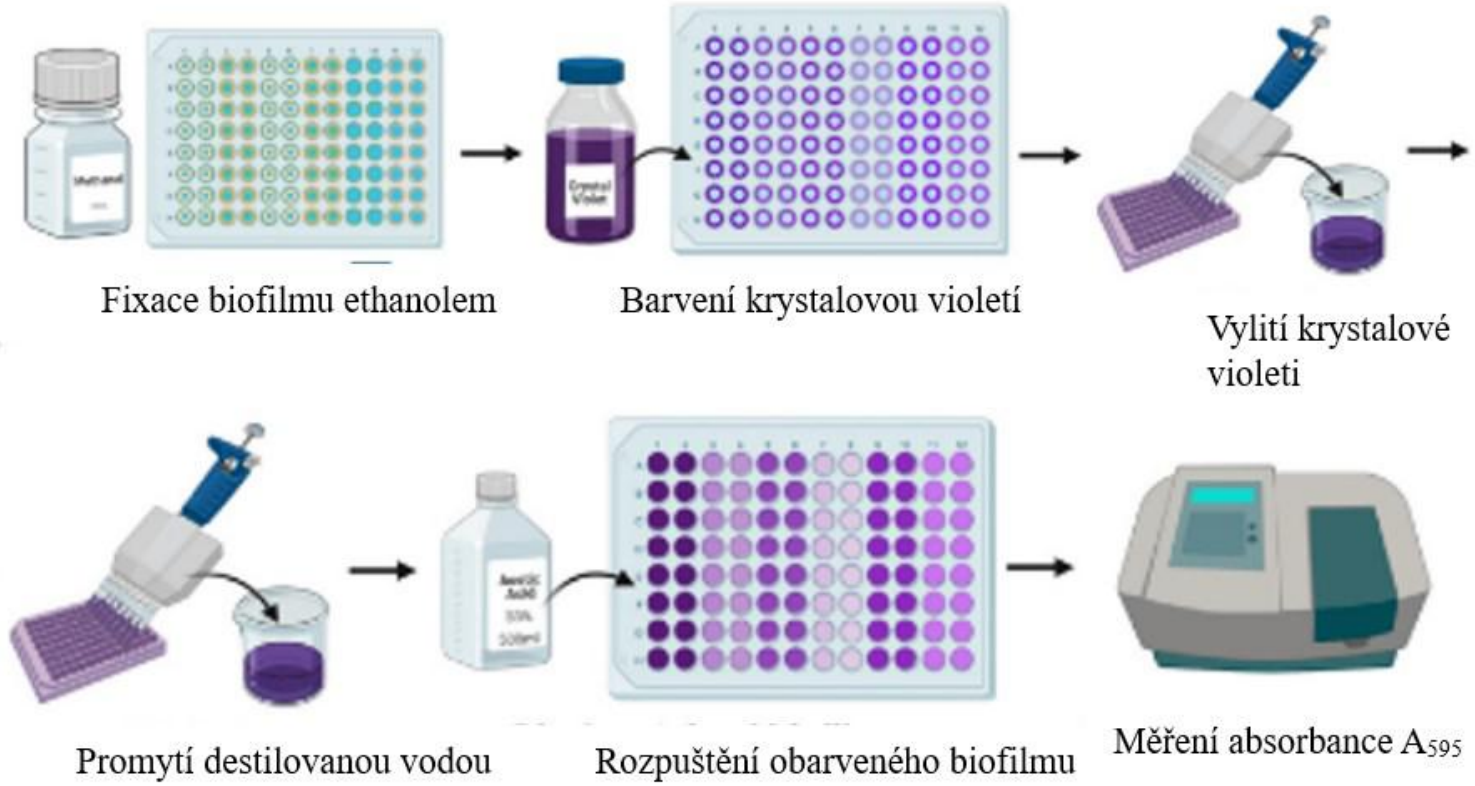
- Identifikace:
  - MALDI-TOF (Spolupráce se Slovenskou poľnohospodárskou univerzitu v Nitře)
  - 16S rRNA



Obr. 6: Křížový roztěr kultury

Tvorba biofilmu - Christensenova metoda

- 10 µl bakteriální suspenze (1,0 McF) + 200 µl MPB bujónu
- 30 °C po dobu 48 hodin



Obr. 7: Schéma Christensenovy metody (upraveno dle Campo-Pérez et al., 2023)

Fenotypová antibiotická rezistence

- Disková difuzní metoda (metodika EUCAST) [13]
- Testována rezistence k 15 antibiotikům
  - 9 různých tříd
- EUCAST a CLSI Breakpoint Tables využity k vyhodnocení [13]

Tabulka 1: Antibiotika využitá při diskové difuzní metodě

Třída antibiotik	Název antibiotika	Obsah disku	Výrobce
Peniciliny	Ampicilin	25µg	HiMedia
	Amoxyclav (amoxycilin/kyselina klavulanová)	30µg	HiMedia
	Piperacilin-tazobaktam	100/10µg	HiMedia
Cefalosporiny	Cefepim	30µg	HiMedia
	Ceftazidim	10µg	HiMedia
Karbapenemy	Imipenem	10µg	Oxoid™
	Meropenem	10µg	Oxoid™
Fluorochinolony	Ciprofloxacin	5µg	HiMedia
	Levofloxacin	5µg	HiMedia
Aminoglykosidy	Amikacin	30µg	Oxoid™
	Tobramycin	10µg	HiMedia
Monobaktamy	Aztreonam	30µg	Oxoid™
Tetracykliny	Tetracyklin	10µg	HiMedia
Makrolidy	Azitromycin	30µg	HiMedia
Amfenikoly	Chloramfenikol	30µg	HiMedia

Stanovení růstových křivek

- Závislost růstu na kultivační teplotě (25/30/45 °C po 48 hodin)
- 50 µl bakteriální suspenze (0,5 McF) + 30 ml BHI bujónu
- Záznamníku růstu RTS-1C Personal Bioreactor
- Měřena optická hustota při vlnové délce 850 nm (NIR světelná dioda)



Obr. 7: RTS-1C Personal Bioreactor

Působení vybraných faktorů na tvorbu biofilmu



Obr. 8: Měření absorbance na přístroji Tecan

- Kultivační teplota (25/30/37 °C)
- Doba kultivace (24/48/72 hodin)
- Přídavek sacharidů (glukóza, galaktóza a fruktóza; koncentrace 0,5/1/2 %) a NaCl (koncentrace 1/1,5/2,5/4 %)
- 10 µl bakteriální suspenze (1,0 McF) + 200 µl MPB bujónu (MPB bujón s přídavkem sach./NaCl)
- Dále Christensenova metoda

Působení rostlinných extraktů na vybrané mikroorganizmy

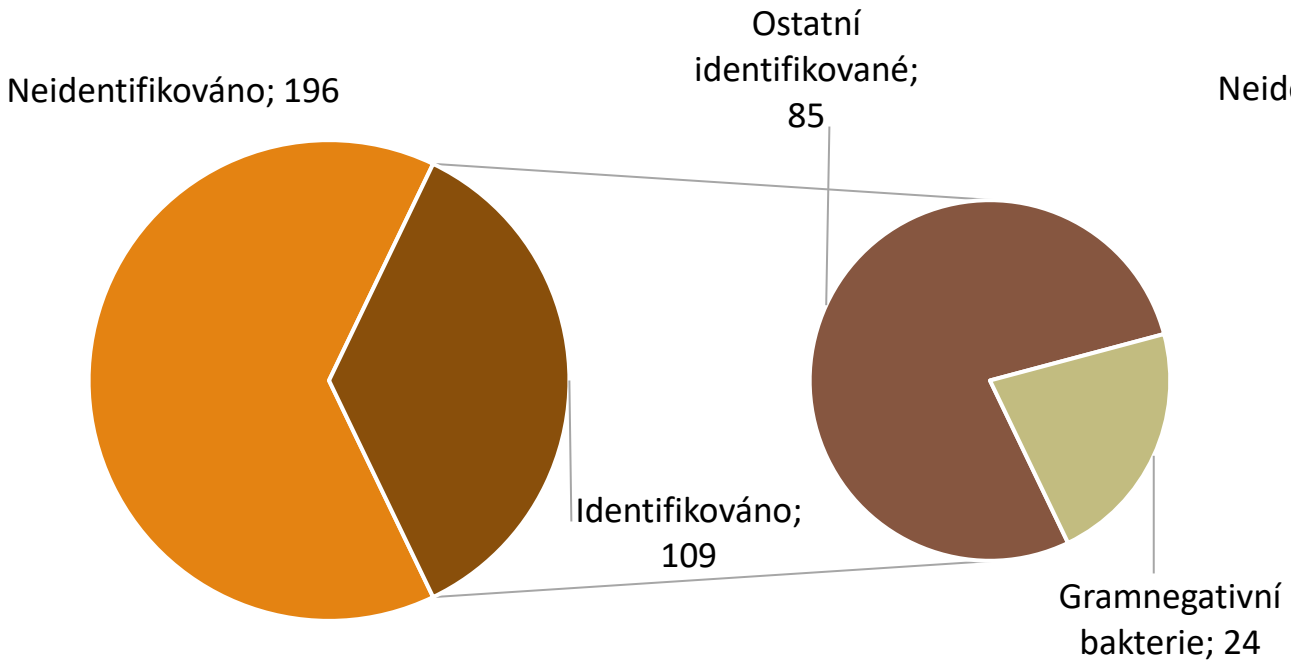


Obr. 9: Vybrané etanolové extrakty

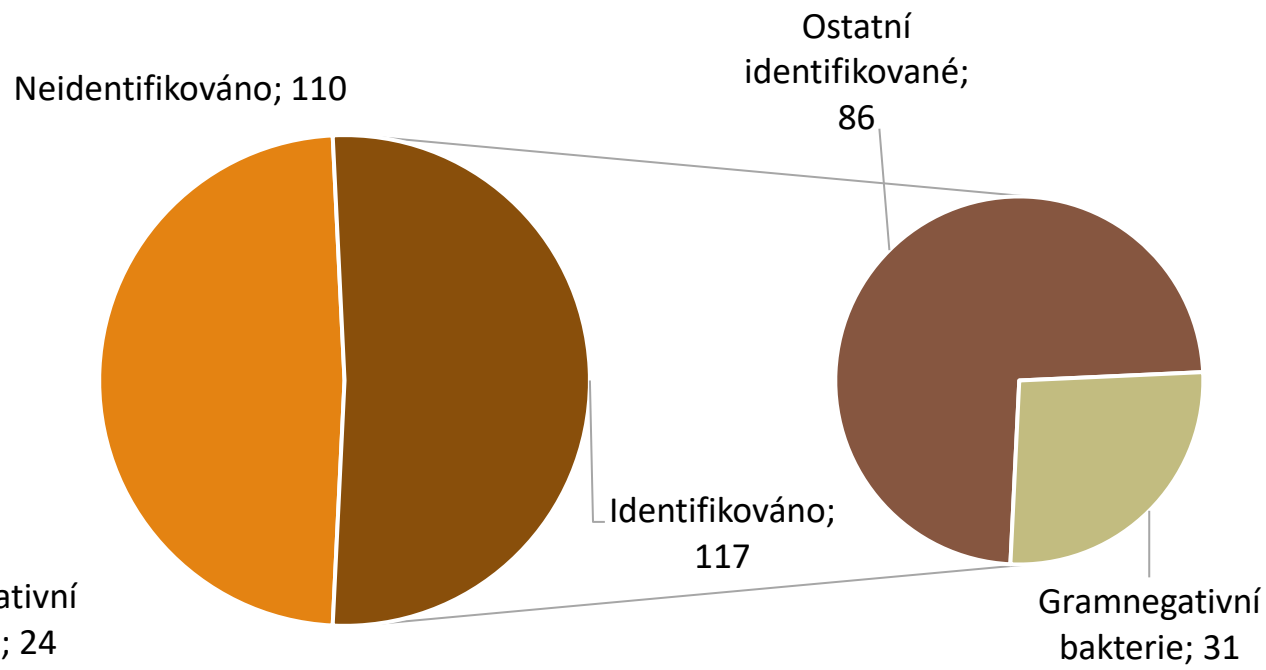
- Vliv působení rostlinných extraktů a esenciálních olejů
  - Z tržní sítě
  - Extrahovány v laboratoři
    - Vodné, ethanolové, hexanové extrakty, MAE vodné extrakty, varem připravené vodné extrakty
- Disková difuzní metoda:
  - Sterilní papírové disky + 15 µl příslušného extraktu/esenciálního oleje
  - NK: disky napuštěné extrakčním médiem
  - PK: Chloramfenikol (30µg, HiMedia)
  - Kultivovány při 37 °C po dobu 24 hodin -> odečteny inhibiční zóny

Průběžné výsledky

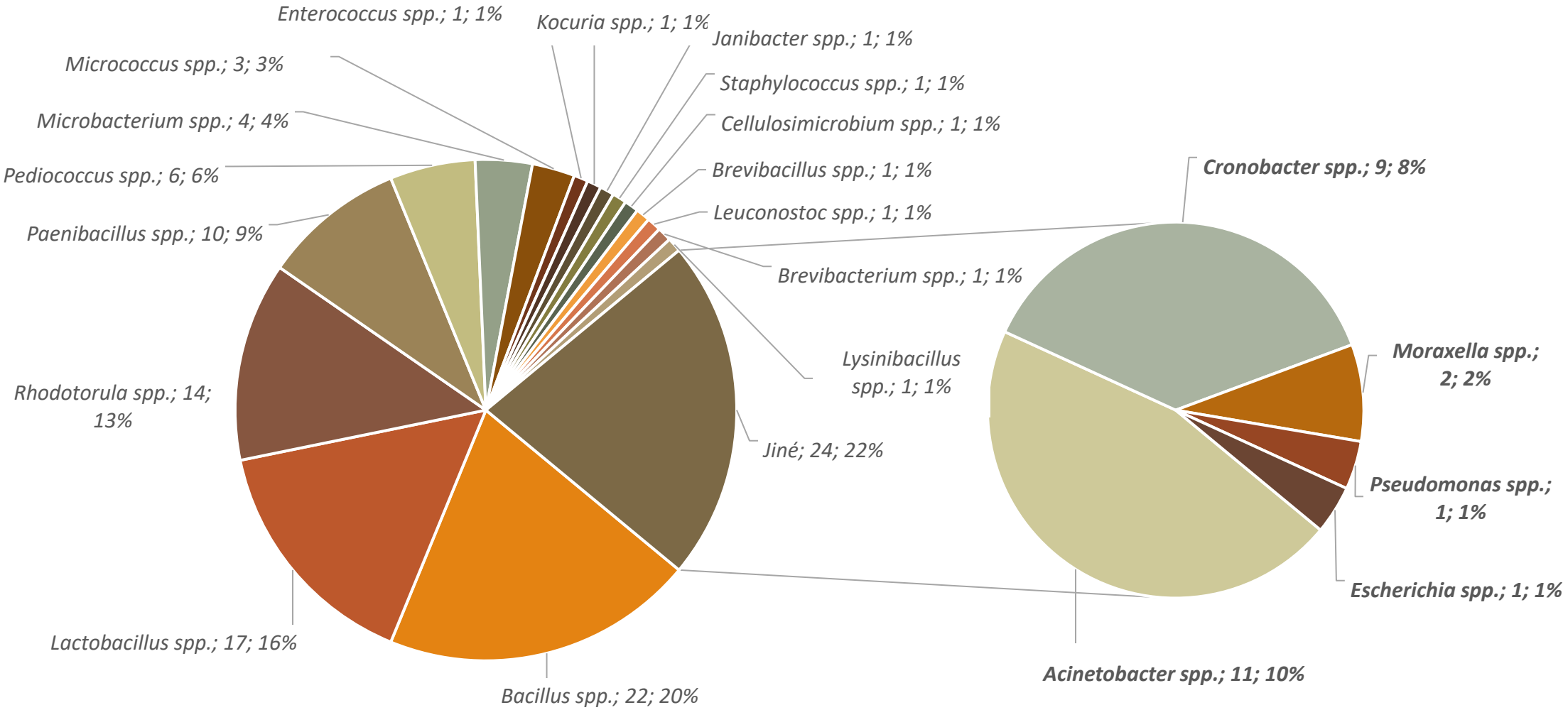
Identifikace izolátů



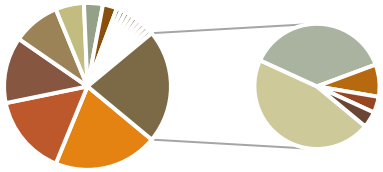
Graf 1: Počty získaných izolátů (sušené mléko/kaše)



Graf 2: Počty získaných izolátů (sušené ovoce)

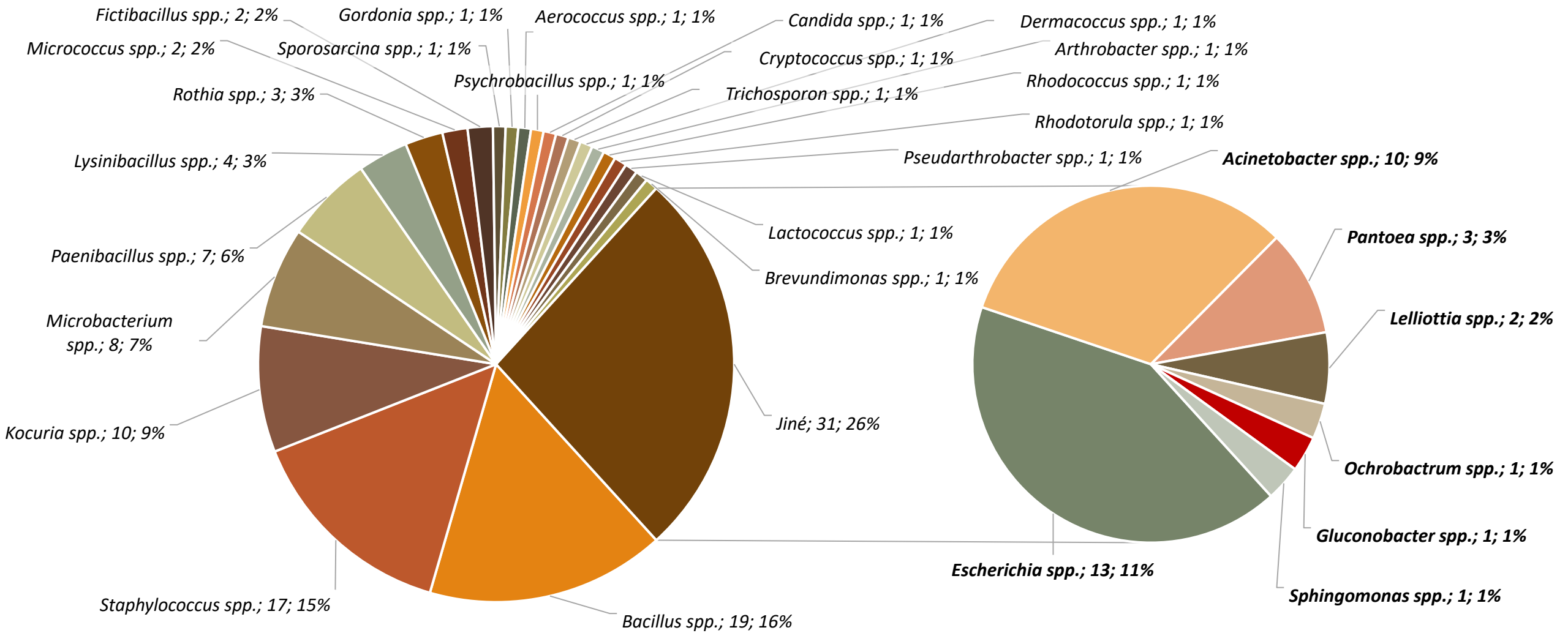


Graf 3: Identifikované izoláty (sušené mléko/kaše)

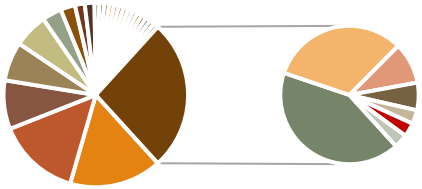


Tabulka 2: Identifikované gramnegativní bakterie (sušené mléko/kaše)

Matrice	MALDI-TOF	16S rRNA
Pokračovací mléčná kojenecká výživa	-	*Pseudomonas atacamensis* (98.91 %)
Batolecí mléčná výživa	*Moraxella osloensis*	-
Kaše - rýžová bez ochucení	-	*Cronobacter sakazakii* (99.47 %)
	-	*Acinetobacter nosocomialis* (4x: 96.16 %; 98.49 %; 99.55%; 99.47 %)
	-	*Acinetobacter baumannii* (98.61 %)
	Acinetobacter nosocomialis (2x)	-
	Cronobacter sp. (6x)	-
Kaše – kukuřično-rýžová s broskví a dýní	*Acinetobacter baumannii*	-
Kaše – pšenično-rýžová s banánem a kakaem	*Acinetobacter baumannii*	-
	Cronobacter sp.	-
Kaše – ovesná se švestkami a jablkem	*Acinetobacter radioresistens*	-
	Escherichia hermannii	-
Sušené kozí mléko plnotučné 31 %	*Acinetobacter radioresistens*	-
	Moraxella osloensis	-



Graf 4: Identifikované izoláty (sušené ovoce)



Tabulka 3: Identifikované gramnegativní bakterie (sušené ovoce)

Matrice	MALDI-TOF	16S rRNA
Kiwi – lyofilizované	-	*Comamonas* sp. (97,38 %)
Kiwi – sušené	*Escherichia coli*	
Mango – sušené	-	*Pantoea stewartii* (94,07 %)
Mango – lyofilizované	-	*Ochrobactrum* sp. (99,92 %)
	-	*Acinetobacter pittii* (94,84 %)
Banánové – plátky	-	*Comamonas* sp. (99,37 %)
	-	*Stenotrophomonas* sp. (99,85 %)
	-	*Enterobacter* sp. (99,75 %)
Hruška – lyofilizovaná	-	*Acinetobacter radioresistens* (98,92 %)
	-	*Acinetobacter radioresistens* (97,91 %)

Tvorba biofilmu

Tabulka 4: Tvorba biofilmu u vybraných izolátů

Sbírkové kmeny			
Název		**A ± SD [-]**	**Tvorba biofilmu**
***P. aeruginosa* CCM 1961**		(1,0681 ± 0,1475)	Silně tvoří biofilm
***E. coli* CCM 4517**		(0,1083 ± 0,2709)	Netvoří biofilm
Izoláty ze sušeného ovoce			
Název	**Matrice**	**A ± SD [-]**	**Tvorba biofilmu**
***Ochrobactrum* sp. (14A)**	Mango lyofilizované	(0,0769 ± 0,0542)	Netvoří biofilm
***A. radioresistens* (28)**	Hruška lyofilizovaná	(0,0702 ± 0,1464)	Netvoří biofilm
***Enterobacter* sp. (16B)**	Banánové plátky	(0,0387 ± 0,0213)	Netvoří biofilm
***E. coli* (2)**	Kiwi sušené	(0,0241 ± 0,0125)	Netvoří biofilm

Izoláty ze sušeného mléka/kaší			
Název	**Matrice**	**A ± SD [-]**	**Tvorba biofilmu**
***A. nosocomialis* (P59)**	Rýžová bez ochucení	(1,0238 ± 0,2890	Silně tvoří biofilm
***A. baumannii* (P75)**	Pšenično-rýžová s banánem a kakaem	(0,2235 ± 0,3133	Slabě tvoří biofilm
***A. radioresistens* (PA52)**	Ovesná se švestkami a jablkem	(0,0975 ± 0,3158	Netvoří biofilm
***A. radioresistens* (PA64)**	Sušené kozí mléko plnotučné 31 %	(0,0177 ± 0,0123	Netvoří biofilm
***C. sakazakii* (P14)**	Rýžová bez ochucení	(0,0066 ± 0,0303	Netvoří biofilm
***P. atacamensis* (P3)**	Pokračovací mléčná kojenecká výživa	(0,4601 ± 0,3940	Silně tvoří biofilm
***E. hermannii* (PA56)**	Ovesná se švestkami a jablkem	(0,1629 ± 0,2838	Slabě tvoří biofilm

Tvorba biofilmu – vybrané izoláty

- Produkce biofilmu byla zjištěna u *Acinetobacter* spp. izolovaných z potravin[12]
- Lepší přežívání v nepříznivých podmínkách, zvýšené riziko infekcí
  - Shenkutie et al.: 59.6% z klinických izolátů *A. baumannii* schopno vytvořit biofilm[13]
  - Anghel et al.: ~ 63% klinických kmenů *A. baumannii* = producenti biofilmu[14]

Tabulka 5: Vypočtené limitní hodnoty

Absorbance [-]	Kategorie
A595 ≤0,1149	Netvořící biofilm
0,1149 <A595 <0,2298	Slabě tvořící biofilm
A595 >0,2298	Intenzivně tvořící biofilm

Literatura k dispozici u autorky

Antibiotická rezistence – vybrané izoláty

Tabulka 6: Antibiotická rezistence u vybraných izolátů

		Ampicilin	Amoxyclav (amoxycilin/kla-vulanová kys.)	Piperacilin-tazobaktam	Cefepim	Ceftazidim	Imipenem	Meropenem	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Amikacin	Tobramycin	Aztreonam	Tetracyklin	Azitromycin	Chloramfenikol
Sbírkové kmeny	***P. aeruginosa* CCM 1961**	NI (6)	NI (6)	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	NI (6)	NI (27)	NI (10)
	***E. coli* CCM 4517**	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	NI (31)	a
Izoláty ze sušeného mléka/kaší	***P. atacamensis* (P3)**	NI (6)	NI (6)	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	NI (17)	NI (31)	NI (14)
	***C. sakazakii* (P14)**	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	NI (32)	a
	***A. nosocomialis* (P59)**	NI (14)	NI (16)	a	a	a	b	b	b	b	b	b	NI (13)	NI (17)	NI (28)	NI (11)
	***A. baumannii* (P75)**	NI (38)	NI (31)	a	a	a	b	b	b	b	b	b	NI (6)	NI (28)	NI (39)	NI (38)
	***A. radioresistens* (PA52)**	NI (18)	NI (21)	a	a	a	b	b	b	b	b	b	NI (16)	NI (22)	NI (24)	NI (16)
	***E. hermannii* (PA56)**	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	NI (30)	a
	***A. radioresistens* (PA64)**	NI (16)	NI (11)	a	a	a	b	b	b	b	b	b	NI (8)	NI (16)	NI (28)	NI (14)
Izoláty ze sušeného ovoce	***E. coli* (2)**	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	NI (32)	a
	***Ochrobactrum* sp. (14A)**	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	NI (29)	c
	***Enterobacter* sp. (16B)**	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	NI (27)	a
	***A. radioresistens* (28)**	NI (20)	NI (19)	a	a	a	b	b	b	b	b	b	NI (12)	NI (22)	NI (25)	NI (18)

a – CLSI (příslušné izolátu); b – EUCAST (příslušné izolátu); c – Zástupné breakpointy pro Enterobacterales.; NI (x) – *Absence breakpoitů, předpoklad rezistence, x – inhibiční zóna*

Biofilm a antibiotická rezistence – *Acinetobacter* spp.

Tabulka 7: Antibiotická rezistence a tvorba biofilmu u vybraných *Acinetobacter* spp.

			Ampicilin	Amoxyclav	Piperacilin-tazobaktam	Cefepim	Ceftazidim	Imipenem	Meropenem	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Amikacin	Tobramycin	Aztreonam	Tetracyklin	Azitromycin	Chloramfenikol
***A. nosocomialis* (P59)**	Rýžová bez ochucení	Silně tvoří biofilm	NI (14)	NI (16)	a	a	a	b	b	b	b	b	b	NI (13)	NI (17)	NI (28)	NI (11)
***A. baumannii* (P75)**	Pšenično-rýžová s banánem a kakaem	Slabě tvoří biofilm	NI (38)	NI (31)	a	a	a	b	b	b	b	b	b	NI (6)	NI (28)	NI (39)	NI (38)
***A. radioresistens* (PA52)**	Ovesná se švestkami a jablkem	Netvoří biofilm	NI (18)	NI (21)	a	a	a	b	b	b	b	b	b	NI (16)	NI (22)	NI (24)	NI (16)
***A. radioresistens* (PA64)**	Sušené kozí mléko plnotučné 31 %	Netvoří biofilm	NI (16)	NI (11)	a	a	a	b	b	b	b	b	b	NI (8)	NI (16)	NI (28)	NI (14)
***A. radioresistens* (28)**	Hruška lyofilizovaná	Netvoří biofilm	NI (20)	NI (19)	a	a	a	b	b	b	b	b	b	NI (12)	NI (22)	NI (25)	NI (18)

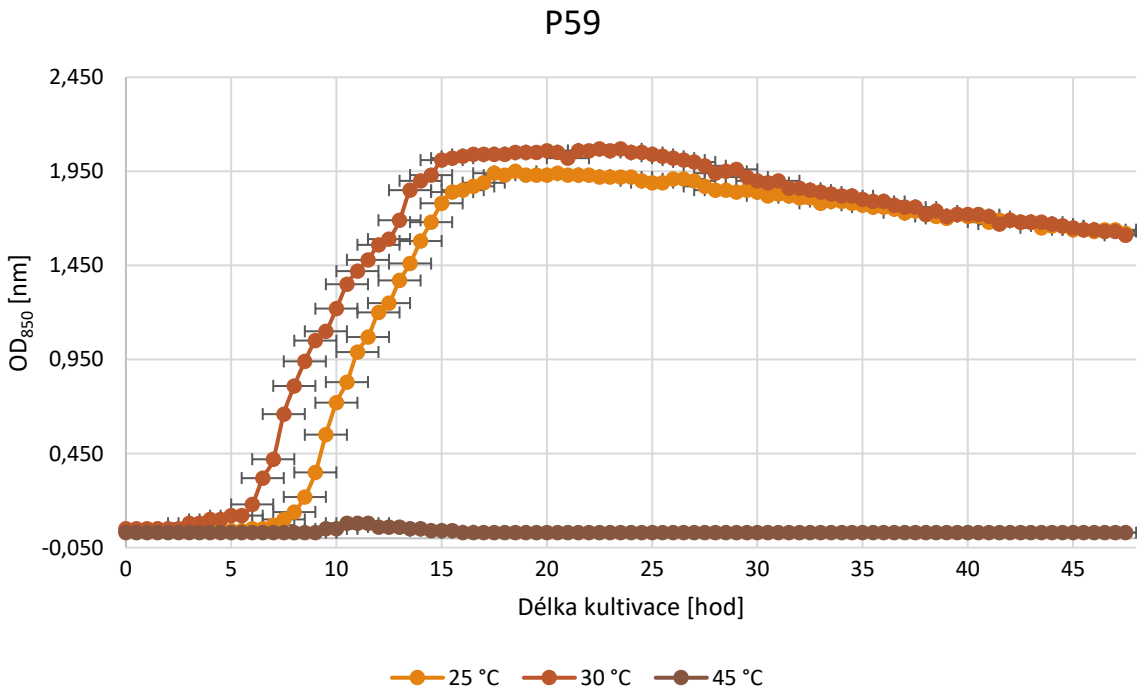
a – CLSI (příslušné izolátu); b – EUCAST (příslušné izolátu); c – Zástupné breakpointy pro Enterobacterales.; NI (x) – *Absence breakpoitů, předpoklad rezistence, x – inhibiční zóna*

Biofilm a antibiotická rezistence – *Acinetobacter* spp.

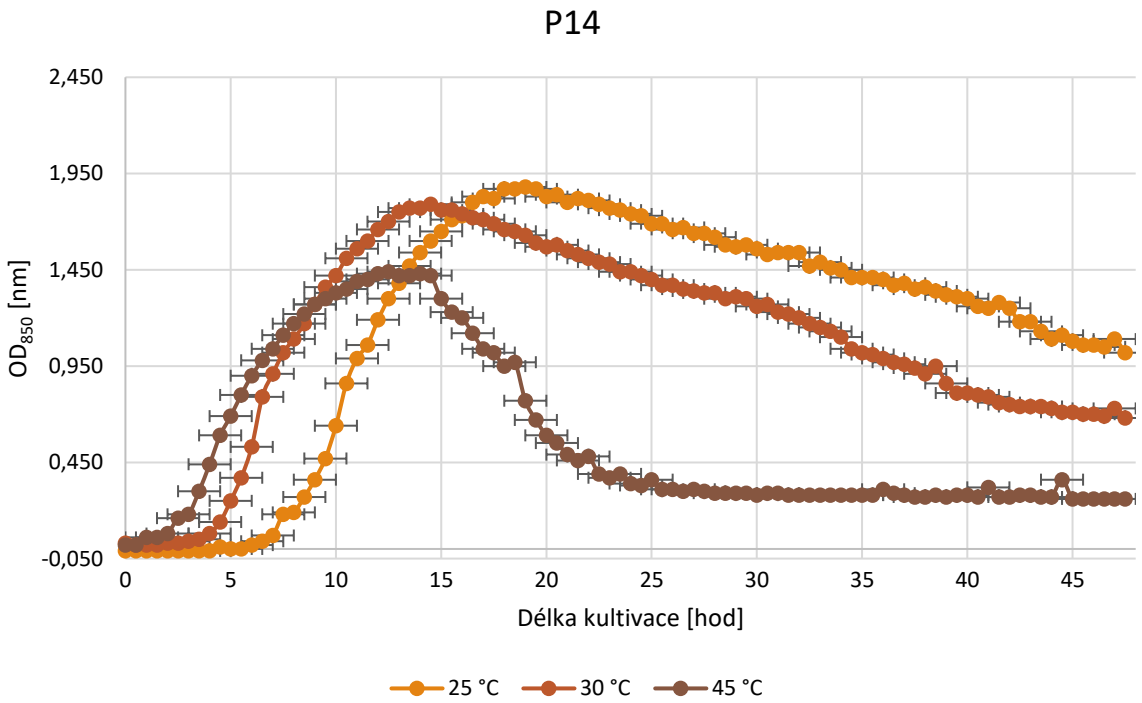
- Role produkce biofilmu na snížení citlivosti k antibiotikům– 2 typy pozorování:
  - Kmeny tvořící biofilm odolnější vůči působení antibiotik
  - *A. baumannii* tvořící biofilm citlivější na působení antibiotik
- Možné vysvětlení: tvorba biofilmu umožňuje přežití citlivých kmenů při vystavení antibiotikům[13]

Literatura k dispozici u autorky

Růstové křivky – různé bakterie, stejná matrice

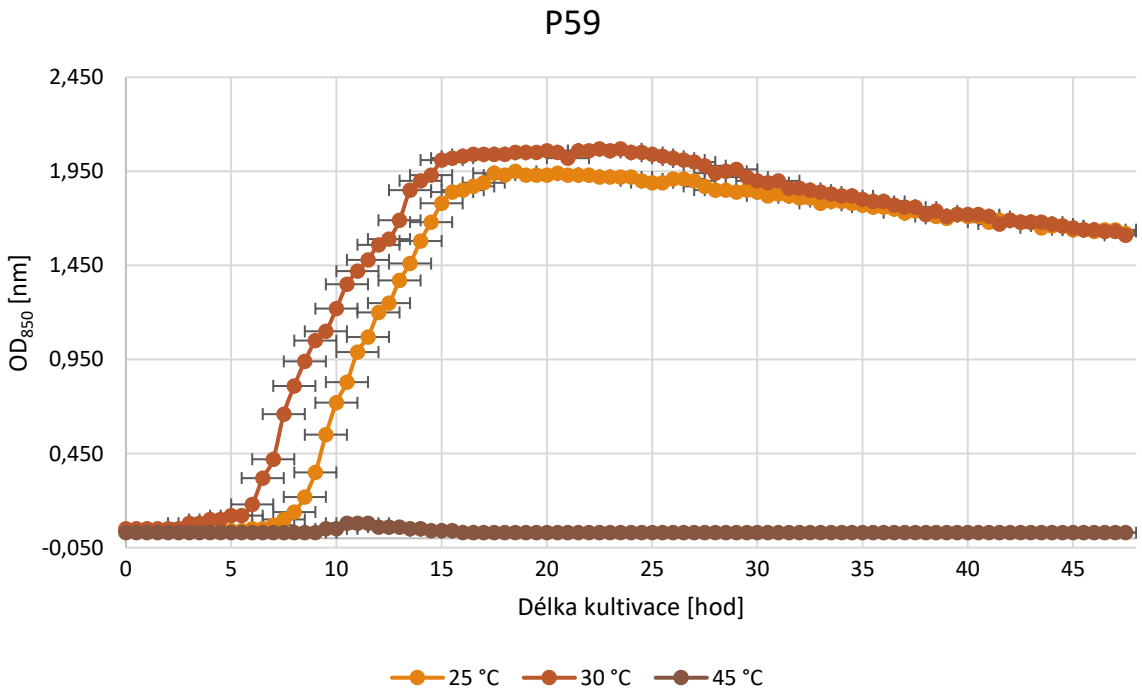


Graf 5: Růstová křivka *A. nosocomialis* (P59; rýžová bez ochucení; RTS-1C Personal Bioreactor, Biosan)

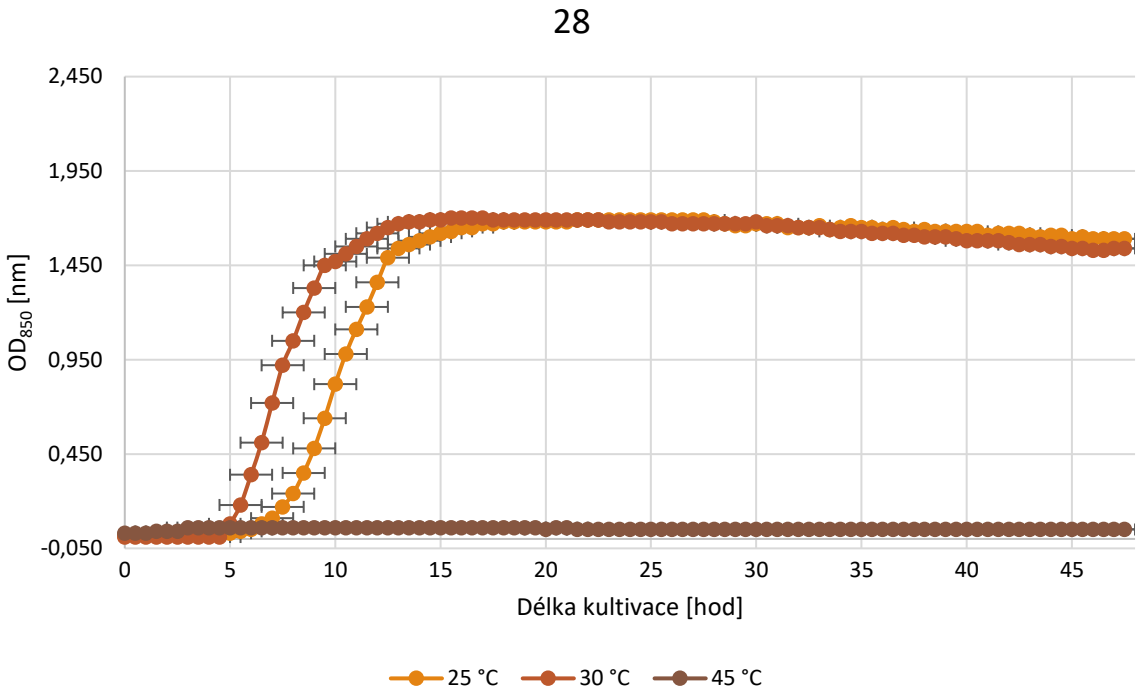


Graf 6: Růstová křivka *C. sakazakii* (P14) rýžová bez ochucení; RTS-1C Personal Bioreactor, Biosan)

Růstové křivky – *Acinetobacter* spp., různé matrice



Graf 5: Růstová křivka *A. nosocomialis* (P59; rýžová bez ochucení; RTS-1C Personal Bioreactor, Biosan)



Graf 7: *A. radioresistens* (28, hruška lyofilizovaná; RTS-1C Personal Bioreactor, Biosan)

Shrnutí

- Zaměření na potraviny s nízkou aktivitou vody (sušená dětská mléčná výživa, kaše a jejich suroviny)
- Gramnegativní bakterie přežívající v potravinách s nepříznivými podmínkami růstu
- Charakterizace:
  - Tvorba biofilmu
  - Fenotypové antibiotické rezistence
  - Stanovení růstových křivek při různých kultivačních teplotách
  - U vybraných izolátů -> vliv faktorů prostředí na tvorbu biofilmu a působení rostlinných extraktů

Děkuji za pozornost.