

- NEJESCHLEBOVÁ H., HANUŠ O., BARTÁKOVÁ K., SAMKOVÁ E., VORLOVÁ L., NAVRÁTILOVÁ P., BORKOVÁ M., KUČERA J., HASOŇOVÁ L., HÁLOVÁ K., KOPECKÝ J. (2023): Vybrané analytické a interpretační aspekty obsahu laktoferinu v kravském mléce. Selected analytical and interpretative aspects of lactoferrin content in cow milk. *Mlékařské Listy – Zpravodaj*, 34, (1), s. 1–7.
- NIERO G., THOMAS S. A., MOURATIDOU K., VISENTIN G., DE MARCHI M., PENASA M., CASSANDRO M. (2023): Lactoferrin concentration in bovine milk: validation of radial immunodiffusion technique, sources of variation, and association to udder health status. *Italian Journal of Animal Science*, 22, (1), s. 230–238.
- SAMKOVÁ E., ŠPIČKA J., HANUŠ O., ROUBAL P., PECOVÁ L., HASOŇOVÁ L., SMETANA P., KLIMEŠOVÁ M., ČÍTEK J. (2020): Comparison of fatty acid proportions determined by mid-infrared spectroscopy and gas chromatography in bulk and individual milk samples. *Animals*, 10, (6), 1095.
- SEGURA M. M., MARTÍNEZ-MIRÓ S., LÓPEZ M. J., MADRID J., GONZÁLEZ V., HERNÁNDEZ F. (2024): The effect of the season on the time dependent changes in colostrum lactoferrin level in Murciano–Granadina goats in intensive system farming. *Animals*, 14, (17), 2580.
- SØRENSEN M., SØRENSEN S. P. L. (1939): The proteins in whey. *Comptes Rendus Des Travaux Du Laboratoire Carlsberg*, 23, s. 55–99.
- SOYEURT H., BASTIN C., COLINET F. G., ARNOULD V. M.-R., BERRY D. P., WALL E., DEHARENG F., NGUYEN H. N., DARDENNE P., SCHEFERS J., VANDENPLAS J., WEIGEL K., COFFEY M., THÉRON L., DETILLEUX J., REDING E., GENGLER N., MCPARLAND S. (2012): Mid-infrared prediction of lactoferrin content in bovine milk: potential indicator of mastitis. *Animal*, 6, (11), s. 1830–1838.
- SOYEURT H., COLINET F. G., ARNOULD V. M.-R., DARDENNE P., BERTOZZI C., RENAVILLE R., PORTETELLE D., GENGLER N. (2007): Genetic variability of lactoferrin content estimated by mid-infrared spectrometry in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 90, (9), s. 4443–4450.
- SOYEURT H., DARDENNE P., GILLON A., CROQUET C., VANDERICK S., MAYERES P., BERTOZZI C., GENGLER N. (2006): Variation in fatty acid contents of milk and milk fat within and across breeds. *Journal of Dairy Science*, 89, (12), s. 4858–4865.
- SOYEURT H., GRELET C., MCPARLAND S., CALMELS M., COFFEY M., TEDDE A., DELHEZ P., DEHARENG F., GENGLER N. (2020): A comparison of 4 different machine learning algorithms to predict lactoferrin content in bovine milk from mid-infrared spectra. *Journal of Dairy Science*, 103, (12), s. 11585–11596.
- WANG J., SHI H., ZHANG T., HUANG J., LI Z., MA G., ZHANG X. (2018): The lactoferrin content variation and its related factors in milk of Xinong Saanen goats. *Journal of Applied Animal Research*, 46, (1), s. 1032–1035.

Korespondující autor: Mgr. Hana Nejeschlebová
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,
160 00 Praha 6, email: hana.nejeschlebova@seznam.cz

Přijato do tisku: 18. 4. 2025

Lektorováno: 27. 5. 2025

ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ IZOLOVANÝCH ZE SÝRŮ TYPU GOUDA

**Eva Musilová¹, Blanka Vrchotová¹, Hana Sýkorová²,
Sabina Purkrťová², Šárka Horáčková¹**

¹ Ústav mléka, tuků a kosmetiky, VŠCHT Praha

² Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Gouda-type cheeses

Abstrakt

Antibiotická rezistence mikroorganismů je v současné době důležitým vědeckým tématem, mimo jiné i v souvislosti s rizikem přenositelných genů antibiotické rezistence, které se mohou vyskytovat i u bakterií mléčného kvašení. V práci byl proveden mikrobiologický rozbor tří sýrů typu Gouda od různých českých výrobců se zaměřením na sledování počtů bakterií mléčného kvašení na půdách M17, Rogosa agaru a MRS agaru s přídavkem antibiotik. Z těchto půd bylo získáno 34 izolátů presumptivních nezákysových bakterií mléčného kvašení, u kterých byla dále provedena repetitivní PCR a stanovena citlivost k antibiotikům na agaru difúzní metodou. Na základě těchto testů bylo vybráno 12 izolátů, které byly metodou MALDI-TOF MS identifikovány jako *Lactiplantibacillus plantarum* ($n = 8$) a *Latilactobacillus curvatus* ($n = 4$). U těchto izolátů byla stanovena minimální inhibiční koncentrace antibiotika pomocí diluční metody v mikrotitračních destičkách s vybranými antibiotiky (vankomycin, ampicilin, gentamicin, streptomycin, kanamycin, erythromycin, klindamycin, tetracyklin, chloramfenikol) na základě pokynů pro charakterizaci mikroorganismů EFSA. Kromě rezistence k vankomycinu byla u více než 80 % vybraných izolátů zaznamenána vyšší minimální inhibiční koncentrace u antibiotik ze skupiny aminoglykosidů, než je mezní hodnota stanovená v pokynech EFSA.

Klíčová slova: nezákysové bakterie mléčného kvašení, sýr, Gouda, aminoglykosidy, tetracyklin, chloramfenikol

Abstract

Antibiotic resistance of microorganisms is currently a significant scientific concern, particularly due to the potential risk of transferable antibiotic resistance genes, which can also occur in lactic acid bacteria. In this study, a microbiological analysis was conducted on three samples of Gouda-type cheese from different Czech producers, focusing on quantifying the number of lactic acid

bacteria using M17, Rogosa, and MRS agar media supplemented with antibiotics. From these media, a total of 34 presumptive non-starter lactic acid bacteria isolates were obtained and subsequently analyzed by repetitive PCR and tested for antibiotic susceptibility using the agar diffusion method. Based on these analyses, 12 representative isolates were selected and identified by MALDI-TOF MS as *Lactiplantibacillus plantarum* ($n = 8$) and *Latilactobacillus curvatus* ($n = 4$). The minimum inhibitory concentrations of selected antibiotics (vancomycin, ampicillin, gentamicin, streptomycin, kanamycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, chloramphenicol) were determined for these isolates using the dilution method in microtiter plates following the EFSA guidelines on the characterization of microorganisms. Apart from intrinsic resistance to vancomycin, more than 80 % of the selected strains exhibited a higher minimum inhibitory concentration for aminoglycoside antibiotics, exceeding the EFSA-defined cut-off values.

Key words: non-starter lactic acid bacteria, cheese, Gouda, aminoglycosides, tetracycline, chloramphenicol

Úvod

Antibiotická rezistence bakterií je v současné době považována za jedno z největších globálních zdravotních rizik (Naghavi a kol., 2024). Závažným faktorem přispívajícím k jejímu šíření je horizontální přenos genů rezistence mezi mikroorganismy, který umožňuje i nepříbuzným bakteriálním druhům získat schopnost odolávat antibiotikům. V této souvislosti se řada vědeckých studií věnuje také výskytu rezistence u bakterií mléčného kvašení (BMK) vzhledem k jejich širokému využití v potravinářství a jako probiotik. I když jsou BMK všeobecně považovány za bezpečné, některé kmeny vykazují rezistenci vůči antibiotikům, což může představovat riziko přenosu rezistence na patogenní bakterie (Colautti a kol., 2022). Přirozená rezistence je specifická pro bakteriální druh nebo rod. Má minimální možnost horizontálního přenosu. Naproti tomu získaná rezistence, která bývá typická pro kmen odolný vůči konkrétnímu antibiotiku patřící mezi sledované skupiny dle EFSA (European Food Safety Authority) (EFSA, 2018), má vysokou možnost horizontálního přenosu. Zde je pak nezbytné odlišit rezistenci indukovanou chromozomálními mutacemi od rezistence indukované zís-

kanými geny, vzhledem k jejich vyšší možnosti přenosu z důvodu možné lokace na mobilních genetických elementech, jako jsou plazmidy nebo transpozony (Colautti a kol., 2022; Partridge a kol., 2018). Dle nejnovějších pokynů EFSA (EFSA, 2018) se doporučuje zkoumat sekvence celého genomu na přítomnost genů rezistence a vyřadit z fermentačních technologií potravinářského průmyslu, výroby probiotik nebo krmiv kmeny obsahující mobilní genetické elementy nesoucí geny rezistence (EFSA, 2018; WHO, 2016). Využití fenotypových i genotypových metod umožňuje přesnější vyhodnocení rezistence, neboť mikroorganismus může nést geny, jejichž exprese je inhibována, ale mohou být přeneseny do jiných druhů (Campedelli a kol., 2019; Fatahi-Bafghi a kol., 2022).

U BMK byly doposud popsány kmeny s jedno i vícenásobnou rezistencí k antibiotikům (Seyirt a kol., 2024; Silva a kol., 2025). V tomto směru je stále větší pozornost věnována rezistenci nezákysových bakterií mléčného kvašení (NSLAB, non-starter lactic acid bacteria), které se na rozdíl od přesně definovaných zákysových bakterií dostávají do výrobků, hlavně sýrů, náhodně z různých exogenních zdrojů, např. z mléka nebo z prostředí výroby (Anastasiou a kol., 2022). Pro heterofermentativní druhy z původního rodu *Lactobacillus* jako hlavních zástupců NSLAB je typická jejich přirozená rezistence vůči vancomycinu. Z dalších rezistencí je nejčastěji uváděna odolnost vůči tetracyklinu, erythromycinu a skupině aminoglykosidových antibiotik (Colautti a kol., 2022).

Cílem této studie bylo zhodnotit mikrobiální diverzitu u sýrů typu Gouda od českých výrobců se zaměřením na celkový počet bakterií mléčného kvašení (BMK), počet zástupců původního rodu *Lactobacillus* se zvýšenou rezistencí vůči vybraným antibiotikům, dále získat izoláty presumptivních heterofermentativních laktobacilů z těchto sýrů, identifikovat je a fenotypicky otestovat minimální inhibiční koncentraci (MIC) vybraných antibiotik u těchto kmenů.

Materiál a metody

Mikrobiologický rozbor sýrů

Úprava vzorků pro mikrobiologický rozbor tří vzorků sýrů typu Gouda (dále jako G2, G6, G7) od různých českých výrobců zakoupených v tržní síti byla provedena dle ČSN EN ISO 6887-5 s použitím citranu sod-

Tab. 1 Použitá kultivační média a podmínky kultivace pro jednotlivé skupiny mikroorganismů

Skupina mikroorganismů	Kultivační médium (výrobce)	Suplement (výrobce)	Podmínky kultivace
Laktobacily (původní rod)	Rogosa agar (Merck Milipore, USA)		dvojitý přeliv; 72 h; 30 °C
Koky	M17 agar (Merck Milipore)		dvojitý přeliv; 72 h; 30 °C
Laktobacily se zvýšenou rezistencí k antibiotikům	MRS agar (Merck Milipore)	Vancomycin 20 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA)	dvojitý přeliv; 72 h; 30 °C
		Kanamycin 64 µg/ml* (Sigma-Aldrich)	dvojitý přeliv; 72 h; 30 °C
		Ampicilin 2 µg/ml* (Sigma-Aldrich)	dvojitý přeliv; 120 h; 30 °C
		Tetracyklin 8 µg/ml* (Sigma-Aldrich)	dvojitý přeliv; 120 h; 30 °C
		Erythromycin 1 µg/ml* (Sigma-Aldrich)	dvojitý přeliv; 120 h; 30 °C

* koncentrace zvoleny na základě EFSA (EFSA, 2018)

ného dihydrátu (20 g/l, pH 7,5 ± 0,2 po sterilaci) jako ředícího roztoku. Po homogenizaci (Stomacher, 3 min) a příslušném ředění fyziologickým roztokem byly stanoveny počty mikroorganismů dle ČSN EN ISO 7218. Jednotlivé kultivační půdy a kultivační podmínky jsou uvedeny v Tab. 1.

Izolace kmenů

Z kultivačních médií Rogosa agaru a MRS agaru s antibiotiky bylo na základě různé morfologie vybráno jedna až třináct kolonií, které byly pasážovány a kultivovány v MRS bujónu (24 – 72 h, 30 °C, aerobně). Po mikroskopické kontrole a katalasovém testu byly Gram pozitivní, katalasa negativní tyčinky uchovány ve 25 % obj. glycerolu při –55 °C až do dalšího použití.

Genotypová charakterizace

DNA z izolátů byla získána metodou tepelné lyze (95 °C; 20 min) a dále použita pro repetitivní PCR (rep-PCR) s GTG5 primerem (5'-GTGGTGGTG-GTGGTG-3') v 15 µl s FIRE Pol Master Mix Ready to Load (Solis BioDyne). PCR amplifikace byla provedena s počáteční denaturací (94 °C; 5 min) následována 30 cykly denaturace (94 °C; 30 s), nasedání primerů (33 °C; 30 s) a polymerace (72 °C; 2 min), s konečnou polymerací (72 °C; 10 min) a zchlazením na 15 °C. Vizualizace produktů reakce byla provedena v 1,5 % agarosovém gelu při napětí 5 V/cm. Velikost PCR produktů byla stanovena v programu GelAnalyzer 19.1. Na základě počtu a velikosti PCR produktů byla provedena genotypizace izolátů pomocí klastrové analýzy v programu Past 3.22 (Algoritmus: UPGMA; Index podobnosti: Euclidean).

Screening antibiotické rezistence

Screening antibiotické rezistence byl proveden měřením velikosti inhibičních zón při diskové difúzní metodě na LSM agaru (MRS, Merck, SRN; ISO-Sensitest™, Oxoid, VB) (ČSN ISO 10932) po 24 a 48 h kultivace při 30 °C, aerobně. Byly použity následující disky: vankomycin 30 µg; klindamycin 2 µg; ampicilin 10 µg; tetracyklin 30 µg; kanamycin 30 µg a erythromycin 15 µg (Oxoid, Velká Británie). Výsledky byly zpracovány pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) v programu Past 3.22.

Identifikace metodou MALDI-TOF MS

Z izolátů byly pomocí extrakce etanolem a kyselinou mravenčí získány intracelulární proteiny (extrakce dle návodu Bruker Daltonics, Německo), které byly nanášeny na spoty ocelové MALDI desky a překryty maticí α-kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny a měřeny na hmotnostním spektrometru Autoflex Speed. Při práci bylo postupováno podle metod doporučených výrobcem (Anonymous, 2011). Po měření na MALDI-TOF MS

byly izoláty identifikovány na základě porovnání získaných proteinových profilů s databází MALDI Biotyper 3.4 (Bruker Daltonics, Německo).

Stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotika

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) devíti antibiotik byla stanovena dle pokynů pro charakterizaci mikroorganismů EFSA (EFSA, 2018) pomocí mikrodilučního testu v komerčních mikrotitračních destičkách MIKROLATEST® MIC G+ (Erba Lachema, ČR) nebo v laboratorně připravených mikrotitračních destičkách podle normy ČSN ISO 10932.

Výsledky a diskuse

V první části práce byl proveden mikrobiální rozbor zaměřený na sledování počtů BMK u tří sýrů typu Gouda z tržní sítě vyrobených různými výrobci v České republice. Výsledky rozboru jsou uvedeny v Tab. 2.

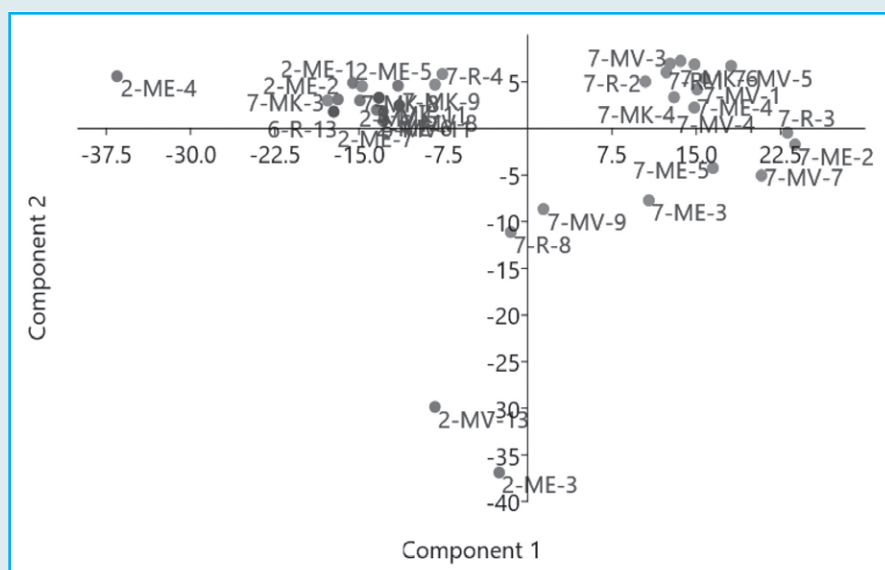
Tab. 2 Počty bakterií stanovených na Rogosa agaru, M17 agaru a MRS agaru s různými antibiotiky ve vzorcích sýrů typu Gouda

Vzorek sýru	Počet mikroorganismů [KTJ/g]					
	Rogosa agar	M17 agar	MRS agar s přidavkem antibiotika			
			VAN	AMP	KAN	TET ERY
G2	3,0·10 ⁷	4,1·10 ⁷	2,9·10 ⁷	<10 ¹	6,0·10 ⁵	<10 ¹ 6,7·10 ³
G6	1,8·10 ⁷	1,8·10 ⁷	2,0·10 ⁷	<10 ¹	1,8·10 ⁷	<10 ¹ >3,0·10 ⁵
G7	7,6·10 ⁷	7,0·10 ⁷	6,2·10 ⁷	<10 ¹	9,3·10 ⁶	<10 ¹ >3,0·10 ⁵

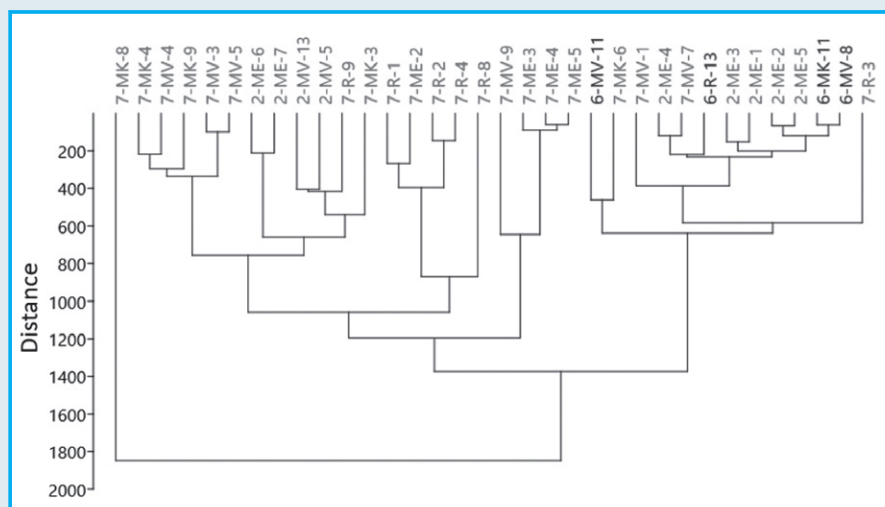
Koncentrace antibiotika v médiu: vankomycin (VAN) 20 µg/ml; ampicilin (AMP) 2 µg/ml; kanamycin (KAN) 64 µg/ml; tetracyklin (TET) 8 µg/ml; erythromycin (ERY) 1 µg/ml

Pro stanovení jednotlivých skupin bakterií byla využita specifická kultivační média pro BMK. Počty laktobacilů byly stanoveny na Rogosa agaru, zatímco pro detekci koků byl použit M17 agar. Přestože tato média nemusí být zcela selektivní, bylo několikanásobnou mikroskopickou kontrolou potvrzeno, že na Rogosa agaru byly zachyceny pouze bakterie tyčinkovitého tvaru a na M17 agaru pouze bakterie ve tvaru koků. Ke stanovení heterofermentativních laktobacilů, zástupců NSLAB, bylo využito médium MRS suplementované vankomycinem. Vankomycin byl k selekci heterofermentativních laktobacilů použit z důvodu jejich přirozené rezistence k tomuto antibiotiku. Rezistence je dána specifickou změnou ve struktuře peptidoglykanu v jejich buněčné stěně (Colautti a kol., 2022). Dále byly použity varianty MRS agaru s přidavkem různých antibiotik (ampicilin, kanamycin, tetracyklin, erythromycin) odpovídající mezním hodnotám EFSA za účelem sledování rezistence k antibiotiku v bakteriální populaci a zisku izolátů s potenciální antibiotickou rezistencí.

Celkové počty BMK stanovené na uvedených kultivačních médiích se mezi jednotlivými tržními vzorky významně nelišily. Počty mikroorganismů na Rogosa a M17 agaru se pohybovaly v řádech 10⁷ KTJ/g. Podobné počty byly zaznamenány i na médiu s přidavkem vankomycinu. V této práci nebyl při stanovení sledován



Obr. 1 Analýza hlavních komponent (PCA) vycházející z testu citlivosti k antibiotikům (ozn.: 2 = izoláty ze sýrů G2, 6 = ze sýrů G6, 7 = ze sýrů G7)



Obr. 2 Fylogenetický strom izolátů ze sýrů (ozn.: 2 = izoláty ze sýrů G2, 6 = ze sýrů G6, 7 = ze sýrů G7) sestrojený na základě produktů rep-PCR (GTG5)

výskyt zástupců rodu *Leuconostoc*, u nichž byla rezistence k vankomycinu rovněž potvrzena (Ogier a kol., 2008). Počet mikroorganismů, které by byly rezistentní vůči zvolené koncentraci ampicilinu a tetracyklinu, byl $<10^1$ KTJ/g. Výrazně vyšší počet kolonií byl zaznamenán na médiu s přidavkem kanamycinu ve srovnání s ostatními testovanými antibiotiky. Tento výsledek naznačuje, že NSLAB mohou být přirozeně rezistentní také vůči tomuto antibiotiku, obdobně jako je tomu u vankomycinu (Campedelli a kol., 2019; Colautti a kol., 2022).

Po enumeraci počtů BMK byly z kultivačních médií získány izoláty ze všech vzorků sýrů. Celkem 34 izolátů, které byly charakterizovány jako Gram pozitivní, katalasa negativní tyčinky, bylo dále otestováno na citlivost k antibiotikům difúzní agarovou metodou a byla u nich provedena rep-PCR.

Analýza hlavních komponent (Obr. 1) ukazuje, že na základě citlivosti měřené pomocí diskové difúzní me-

tody, lze většinu izolátů rozdělit do dvou velkých skupin s podobnými vlastnostmi a na několik odlišných izolátů. Skupina lokalizovaná v grafu nahoře vpravo je tvořena izoláty, které k nárůstu na LSM médiu potřebovaly 48 hodin, skupina nahoře vlevo je tvořena izoláty se sníženou citlivostí ke kanamycinu. Izolát 2-ME-4 měl nižší citlivost k erythromycinu, izoláty lokalizované dole u svislé osy vykazovaly sníženou citlivost (2-MV-13) nebo byly až rezistentní (2-ME-3) k ampicilinu. Izoláty vpravo pod vodorovnou osou měly nižší citlivost k ampicilinu a vyšší citlivost k tetracyklinu (7-R-8, 7-MV-9 a 7-ME-3) a izoláty 7-ME-5, 7-R-3, 7-MV-7 a 7-ME-2 měly vyšší citlivost k erythromycinu, klindamycinu a kanamycinu.

Fylogenetický strom (Obr. 2) ukazuje, že izoláty lze na základě příbuznosti rozdělit na tři klastry, z čehož jeden je tvořen pouze jedním izolátem 7-MK-8. Tato analýza nerozdělila izoláty dle původu vzorku sýru, tzn. že u každého výrobce byly zjištěny mikroorganismy z různých klastrů.

Na základě výsledků screeningové agarové difúzní metody pro stanovení rezistence k antibiotikům a na základě rozdílnosti profilu z rep-PCR bylo vybráno celkem 12 kmenů pro další testování. Jednalo se o čtyři izoláty ze vzorku G2, tři ze vzorku G6 a pět ze vzorku G7.

Tyto izoláty byly identifikovány metodou MALDI-TOF MS. Výsledky identifikace jsou uvedeny v Tab. 3.

Osm izolátů bylo identifikováno jako *Lactiplantibacillus plantarum* a čtyři jako *Latilactobacillus curvatus*. Kmeny *L. curvatus* byly izolovány pouze z jednoho vzorku sýru, konkrétně G7. V tomto vzorku byl současně zjištěn i *L. plantarum*. Oba druhy byly prokázány u sýrů typu Gouda i v zahraničních studiích, a to často společně s rodem *Lactocaseibacillus* (Decadt a kol., 2023; Salazar a kol., 2021). Zástupce tohoto rodu se však v této studii nepodařilo zachytit.

V poslední části práce byly u identifikovaných izolátů stanoveny MIC antibiotik diluční metodou. Dle mezních hodnot stanovených EFSA (EFSA, 2018) bylo vyhodnoceno, zda jsou kmeny rezistentní nebo senzitivní. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4 pro *L. plantarum* a v Tab. 5 pro *L. curvatus*. EFSA stanovuje konkrétní mezní hodnoty pro *L. plantarum*. Pro *L. curvatus* byly

Tab. 3 Identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF MS

Vzorek sýru	Izolát	Identifikace	Skóre
G2	2-ME-4	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,37
	2-MV-13	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,31
	2-ME-3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,32
	2-ME-6	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,43
G6	6-MV-11	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,44
	6-R-13	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,42
	6-MK-11	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,40
G7	7-ME-5	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	1,77
	7-MV-9	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	2,22
	7-R-3	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	2,12
	7-R-8	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	1,92
	7-MK-8	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2,31

Hodnota skóre: velmi pravděpodobná identifikace na úrovni druhu 2,300–3,000; pravděpodobná identifikace na úrovni druhu 2,000–2,299; pravděpodobná identifikace na úrovni rodu 1,700–1,999

získané MIC porovnány s hodnotami pro fakultativně heterofermentativní skupinu laktobacilů, kam se tento druh zařazuje.

U všech izolátů došlo k opětovnému potvrzení, že patří do skupiny heterofermentativních laktobacilů, vzhledem k jejich přirozené rezistenci k vankomycinu. Minimální inhibiční koncentrace tohoto antibiotika nebyla stanovena z důvodu nárůstu izolátů i v přítomnosti nejvyšší testované koncentrace antibiotika (16 µg/ml).

U sedmi izolátů identifikovaných jako *L. plantarum* byla zaznamenána vyšší MIC, než je stanovená mezní hodnota u antibiotik gentamicin a kanamycin. Tato antibiotika patří do skupiny aminoglykosidů, stejně jako streptomycin. U streptomycinu není však stanovena mezní koncentrace pro *L. plantarum*, nicméně stanovená MIC přesahovala hodnotu 64 µg/ml u více než 50 % izolátů identifikovaných jako *L. plantarum*. Právě 64 µg/ml je mezní hodnotou pro fakultativně heterofermentativní laktobacily, kam se řadí i *L. plantarum*.

Podobné výsledky byly zjištěny i u izolátů identifikovaných jako *L. curvatus*. U všech těchto izolátů byla zaznamenána vyšší MIC, než je stanovená mezní hodnota u antibiotik gentamicin a streptomycin, a zároveň u tří z nich byla zaznamenána i rezistence ke kanamycinu. Re-

zistence k aminoglykosidům byla již dříve popsána jako přirozeně se vyskytující u některých kmenů laktobacilů, kdy byla spojena s nepřítomností cytochromem zprostředkovaného transportu v buňce (Campedelli a kol., 2019). Kromě rezistence k aminoglykosidům byla dále u dvou izolátů potvrzena rezistence k tetracyklinu a chloramfenikolu. Naměřené hodnoty MIC dosahovaly dvojnásobku mezní hodnoty pro daná antibiotika.

Výsledky stanovení MIC v této práci se shodují s výsledky studie Campedelli a kol. (2019), ve které většina testovaných kmenů *L. plantarum* vykazovala zvýšenou rezistenci alespoň k jednomu zástupci aminoglykosidů. *L. curvatus* se řadí do skupiny s *Latilactobacillus sakei*, který byl v citované studii také testován. U *L. sakei* byla zaznamenána rezistence k aminoglykosidům i rezistence k tetracyklinu. Zástupci původního rodu *Lactobacillus* jsou obecně citliví k chloramfenikolu, nicméně ve výše uvedené studii, kdy bylo testováno 182 zástupců původního rodu *Lactobacillus*, byla zaznamenána rezistence u 49 % testovaných izolátů.

V rámci této práce byla hodnocena antibiotická rezistence pouze na základě fenotypového projevu. Do budoucna by však bylo přínosné provést i genotypovou analýzu izolátů, která by umožnila hlubší porozumění mechanismům rezistence, a to, zda se jedná o rezistenci přirozenou, či rezistenci získanou s potenciálem šíření se v mikrobiální populaci.

Závěr

Mikrobiologické analýzy prokázaly přítomnost heterofermentativních laktobacilů ve všech testovaných vzorcích sýrů typu Gouda od různých českých výrobců, a to v koncentraci 10⁷ KTJ/g. Z těchto vzorků bylo získáno 34 izolátů, které byly dále analyzovány pomocí rep-PCR a testů citlivosti k antibiotikům. Na základě výsledků bylo vybráno 12 izolátů, které byly následně identifikovány jako *Lactiplantibacillus plantarum* a *Latilactobacillus curvatus*. U těchto izolátů byla stanovena MIC vybraných antibiotik. U deseti z nich byla zjištěna hodnota přesahující mezní hodnoty stanovené EFSA pro všechna testovaná aminoglykosidová antibiotika

Tab. 4 Hodnocení rezistence a senzitivity izolátů *Lactiplantibacillus plantarum* v porovnání s mezními hodnotami minimální inhibiční koncentrace (EFSA, 2018)

Antibiotikum	Mezní hodnota [µg/ml]	Izoláty <i>L. plantarum</i>							
		2-ME-4	2-MV-13	2-ME-3	2-ME-6	6-MV-11	6-R-13	6-MK-11	7-MK-8
Ampicilin	2	0,5/S	1/S	1/S	0,5/S	0,5/S	0,5/S	0,5/S	1/S
Erythromycin	1	0,5/S	0,5/S	1/S	0,5/S	1/S	0,5/S	0,5/S	0,5/S
Klindamycin	4	0,12/S	0,12/S	0,12/S	0,12/S	0,12/S	0,12/S	0,12/S	0,12/S
Chloramfenikol	8	8/S	8/S	8/S	8/S	8/S	8/S	8/S	8/S
Tetracyklin	32	16/S	32/S	16/S	32/S	16/S	16/S	32/S	16/S
Gentamicin	16	16/S	128/R	128/R	128/R	128/R	128/R	128/R	128/R
Vankomycin	n.p.	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
Streptomycin	n.p.	128	64	128	64	128	128	128	64
Kanamycin	64	256/R	256/R	128/R	256/R	256/R	256/R	512/R	256/R

n.p. – není požadována; S (senzitivní): MIC ≤ mezní hodnota; R (rezistentní): MIC > mezní hodnota

Tab. 5 Hodnocení rezistence a senzitivity izolátů *Latilactobacillus curvatus* v porovnání s mezními hodnotami minimální inhibiční koncentrace pro fakultativně heterofermentativní laktobacily (EFSA, 2018)

Antibiotikum	Mezní hodnota [μg/ml]	Izoláty <i>L. curvatus</i>			
		7-ME-5	7-MV-9	7-R-3	7-R-8
Ampicilin	4	0,5/S	2/S	2/S	1/S
Erythromycin	1	0,5/S	1/S	0,5/S	0,5/S
Klindamycin	4	0,12/S	0,12/S	0,12/S	0,12/S
Chloramfenikol	4	8/R	2/S	8/R	4/S
Tetracyklin	8	32/R	8/S	32/R	8/S
Gentamicin	16	128/R	128/R	128/R	128/R
Vankomycin	n.p.	> 16	> 16	> 16	> 16
Streptomycin	64	128/R	256/R	128/R	256/R
Kanamycin	64	512/R	128/R	256/R	64/S

n.p. – není požadována; S (senzitivní): MIC ≤ mezní hodnota; R (rezistentní): MIC > mezní hodnota

a u dvou ještě pro tetracyklin a chloramfenikol. Výsledky jsou založené výhradně na fenotypovém projevu a stanovení MIC. V dalším období budou tyto kmeny včetně vybraných kmenů, u nichž nebyly překročeny mezní hodnoty MIC, testovány z genetického hlediska pro potvrzení, zda jsou geny rezistence kódovány na chromosomu nebo na plazmidu. Je nutné věnovat pozornost možnosti horizontálního přenosu antibiotické rezistence z mikroorganismů běžně se vyskytujících v potravinách na případné patogenní mikroorganismy.

Poděkování

Tato práce byla podpořena grantem Národní agentury pro zemědělský výzkum Ministerstva zemědělství ČR, grant č. QL24010251.

Literatura

- ANASTASIOU, R., KAZOU M., GEORGALAKI M., AKTYPIS A., ZOUMPOPOULOU G., TSAKALIDOU E. (2022): Omics approaches to assess flavor development in cheese. *Foods*, 11(2), s. 188.
- ANONYMOUS (2011): Bruker Daltonics, https://assets.www.criver.com/storage-account-container/resources/doc_a/InstructionsforUsing-MALDI-Biotarget48.pdf; staženo 24. 1. 2025.
- CAMPEDELLI, I., MATHUR H., SALVETTI E., CLARKE S., REA M. C., TORRIANI S., ROSS R. P., HILL C., O'TOOLE P.W. (2019): Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp.. *Appl. Environ. Microbiol.*, 85(1), s. 1718–1738.
- COLAUTTI, A., ARNOLDI M., COMI G., IACUMIN L. (2022): Antibiotic resistance and virulence factors in lactobacilli: something to carefully consider. *Food Microbiol.*, 103, 103934.
- ČSN EN ISO 6887-5 Mikrobiologie potravin a krmiv – Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinasobných ředění – Část 5: Specifické pokyny pro vzorky mléka a mléčných výrobků.
- ČSN EN ISO 7218 Mikrobiologie potravin a krmiv – Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení.
- ČSN ISO 10932 Mléko a mléčné výrobky – Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibiotik pro bifidobakterie a bakterie mléčného kvašení (LAB) s výjimkou enterokoků.
- DECADT, H., WECKX S., DE VUYST L. (2023): The rotation of primary starter culture mixtures results in batch-to-batch variations during Gouda cheese production. *Front. Microbiol.*, 14, 1128394.

EFSA, FEEDAP Panel, RYCHEN G., AQUILINA G., AZIMONTI G., BAMPIDIS V., BASTOS M. L., BORIES G., CHESSON A., COCCONCELLI P. S., FLACHOWSKY G., GROPP J., KOLAR B., KOUBA M., LÓPEZ-ALONSO M., LÓPEZ PUENTE S., MANTOVANI A., MAYO B., RAMOS F., SAARELA M., VILLA R. E., WALLACE R. J., WESTER P., GLANDORF B., HERMAN L., KÄRENlampi S., AGUILERA J., ANGUIA M., BROZZI R., GALOBART J. (2018): Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA Journal* 2018, 16(3):5206.

FATAHI-BAFGHI, M., NASERI S., ALIZEHI A. (2022): Genome analysis of probiotic bacteria for antibiotic resistance genes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 115(3), s. 375–389.

NAGHAVI, M., VOLLSET S. E., IKUTA K. S., SWETSCHINSKI L. R., GBD 2021 ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS (2024): Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, 404(10459), s. 1199–1226.

OGIER, J.-C., CASALTA E., FARROKH C., SÄIHI A. (2008): Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.*, 126(3), s. 286–290.

PARTRIDGE, S. R., KWONG S. M., FIRTH N., JENSEN S. O. (2018): Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 31(4).

SALAZAR, J. K., GONSALVES L. J., FAY M., RAMACHANDRAN P., SCHILL K. M., TORTORELLO M. L. (2021): Metataxonomic profiling of native and starter microbiota during ripening of gouda cheese made with *Listeria monocytogenes*-contaminated unpasteurized milk. *Front. Microbiol.*, 12, 642789.

SEYIRT, S., TEZEL B. U., ŞANLIBABA P. (2024): Identification and antibiotic resistance of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from manufactured probiotic dairy products. *J. Food Process. Preserv.*, 2024(1), 1619353.

SILVA, J. F. M., ALONSO B. V., ALMEIDA P. A. A., BARBOSA I. V., DE PAULA O. A. B., BARBOSA L. R., BRUNO L. M., MENEZES L. D. M., SILVA M. R., DA COSTA G. M., RODARTE M. P., RIBEIRO J. B. (2025): Searching for antibiotic-susceptible bioprotective lactic acid bacteria to control dangerous biological agents in artisanal cheese. *Food Microbiol.*, 2025, 130, 104762.

WHO (2016): Global action plan on antimicrobial resistance. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>; staženo 20. 5. 2025.

Korespondující autor:

doc. Ing. Šárka Horáčková, CSc.,
Ústav mléka, tuků a kosmetiky, VŠCHT,
Technická 5, 166 28 Praha 6,
e-mail: sarka.horackova@vscht.cz

Přijato do tisku: 16. 5. 2025

Lektorováno: 5. 6. 2025