

i jejich supernatantem. Laktobacily nejméně inhibovaly růst *Enterobacter aerogenes* CNCTC 5572. V práci Elkins a kol. (2008) byla také prokázána inhibiční aktivita kmenů laktobacilů *Lbc. acidophilus* (6 kmenů), *Lbc. casei* (1 kmen), *Lbc. gasseri* (3 kmene) ke kmenům *Staphylococcus aureus*.

Z výsledků vyplývá, že by laktobacily pro nejlepší antimikrobiální ochranu a tudíž i ovlivnění zdravotního stavu hostitele měly být v životaschopné formě a izolované z trávicího traktu člověka. Z hlediska technologického využití by mohl být kmen *Lbc. casei* ZU10 použit jako doplňková probiotická kultura, ostatní izoláty dostatečné růstové a kysací vlastnosti v mléce neprokázaly. *Lbc. acidophilus* Z3 prokázal nejvyšší autoagregační schopnost a hydrofobicitu povrchu buněk ze všech kmenů izolovaných z trávicího traktu a proto by měl být schopen nejlepší adheze ke střevní stěně. Ostatní kmene v porovnání s vlastnostmi komerčního probiotického kmene *Lbc. acidophilus* LA-5 a sbírkového kmene *Lbc. acidophilus* CCDM 406 vykazují probiotické vlastnosti v menším rozsahu. Dále se prokázalo, že autoagregace a hydrofobicitu povrchu buněk jsou kmenově specifické vlastnosti.

Autoři článku děkují Doc. Ing. Evě Vlkové, PhD. z ČZÚ v Praze za poskytnutí izolátů laktobacilů.

Práce byla podpořena grantem MZe ČR č. QI 111B053 z programu Výzkum v agrárním komplexu VAK s počátkem řešení projektů v roce 2011.

Literatura

- BOTES M., VAN REENEN C.A., DICS L.M.T. (2008): Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastro-intestinal model with infant milk formulations as substrate. *International Journal of Food Microbiology*, 128, s. 362-370.
- COLLADO M.C., MERILUOTO J., SALMINEN S. (2007): Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: In vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods*, 71, s. 71-74.
- COLLADO M.C., MERILUOTO J., SALMINEN S. (2008): Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research Technology*, 226, s. 1065-1073.
- ELKINS C.A., MUÑOZ M.E., MULLIS L.B., STINGLEY R.L., HART M.E. (2008): Lactobacillus-mediated inhibition of clinical toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus* strains and its relation to acid and peroxide production. *Anaerobe*, 14, s. 261-267.
- FRÍČ P. (2005): Probiotika v terapii chorob trávicího ústrojí. *Interní medicína pro praxi*, 10, s. 434-437.
- GUGLIELMOTTI D.M., BRIGGILER M.M., GOLOWCZYC M., REINHEIMER J.A., QUIBERONI A.L. (2007): Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *International Dairy Journal*, 17, s. 916-925.
- IANNITTI T., PALMIERI B. (2010): Therapeutic use of probiotic formulations in clinical practice. *Clinical Nutrition*, 29, s. 701-725.
- IZQUIERDO E., MARCHIONI E., AOUDE-WERNER D., HASSELMANN C., ENNAHAR S. (2009): Smearing of soft cheese with *enterococcus faecium* WHE 81, a multibacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 26, s. 16-20.
- KANG C.I., SONG J.H., KO K.S., CHUNG D.R., PECK K.R. (2011): Clinical features and outcome of *Staphylococcus aureus* infection in elderly versus younger adult patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 15, s. 58-62.
- KOHOUT P. (2010): Probiotika, historie a současnost. *Medicína pro praxi*, 2, s. 1-10.
- KÖNIG H., FRÖHLICH J. (2009): Lactic Acid Bacteria. Ve: KÖNIG, H., UNDEN, G., FRÖHLICH, J. (edit.): *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. kap. 1, (s. 3-29). Berlin, Springer-Verlag.

- KOS B., ŠUŠKOVIĆ J., VUKOVIĆ S., ŠIMPRAGA M., FRECE J., MATOŠIĆ S. (2003): Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94, s. 981 - 987.
- KOTZAMANIDIS C., KOURELIS A., LITPOPOULOU-TZANETAKI E., TZANETAKIS N., YIANGOU M. (2010): Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic *Lactobacillus* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 14, s. 154-163.
- KUČEROVÁ K., KORBOVÁ I., HORÁČKOVÁ Š., ŠVIRÁKOVÁ E., PLOCKOVÁ M. (2009): Influence of Enterococci and Lactobacilli on *Listeria*. *Czech Journal of Food Science, Special Issue*, 27, s. 12-17.
- MARAGKOUKAKIS P.A., ZOUMPOPOULOU G., MIARIS C., KALANTZOPOULOS G., POT B., TSAKALIDOV E. (2006): Probiotic potencial of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16, s. 186-199.
- MISHRA V., PRASAD D.N. (2005): Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103, s. 109- 115.
- RIVERA-ESPINOZA Y., GALLARDO-NAVARRO Y. (2010): Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27, s. 1-11.
- SERVIN A.L. (2004): Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, s. 405-440.
- VINDEROLA C.G., REINHEIMER J.A. (2003): Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36, s. 895-904.

Přijato do tisku 3. 11. 2011

Lektorováno 16. 11. 2011

IDENTIFIKACE KMENŮ BAKTERIÍ RODU *CLOSTRIDIUM* IZOLOVANÝCH ZE SÝRŮ

^aBohuslav Rittich, ^bMaria Chroboková,

^aBarbora Gregušová, ^aAlena Španová

^a Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická,
Purkyňova 118, 612 00 Brno,

^b MILCOM, a.s., Výzkumný stav mlékárenský, 390 02 Tábor

Identification of bacterial *Clostridium* strains isolated from cheese

Souhrn

Byl analyzován soubor 40 kmenů, které byly izolovány z mléka a sýrů s pozdním duřením. Pomocí rodově specifické PCR bylo potvrzeno zařazení kmenů do rodu *Clostridium*. Pomocí druhově specifických PCR bylo 5 kmenů zařazeno do druhu *C. butyricum* a 26 kmenů do druhu *C. tyrobutyricum*. Variabilita jednotlivých kmenů v uvedených druzích byla posouzena pomocí rep-PCR a RAPD.

Abstract

PCR methods were used to analyse and identify the collection of 40 bacterial strains isolated from milk and late-blowing cheeses. It was proved that all of the strains belong to *Clostridium* genus. Species identification was achieved for 31 strains, where 5 strains were identified as *Clostri-*

dium butyricum and 26 strains as *Clostridium tyrobutyricum*. Variability of strains in the species was evaluated using rep-PCR and RAPD.

1. Úvod

Klostridie fermentují širokou škálu organických sloučenin. Během fermentace produkují kyseliny máselnou a octovou, butanol, aceton, oxid uhličitý a vodík. Klostridie rovněž produkují řadu extracelulárních enzymů, které degradují organické makromolekuly (např. proteiny, lipidy, kolagen, celulosu aj.) a proto hrají důležitou roli v biodegradčních procesech. Většina klostridií jsou saprofyty, ale některé jsou patogenní pro člověka, hlavně druhy *Clostridium perfringens*, *C. difficile* a *C. tetani* (Finegold a kol., 2002).

Některé druhy klostridií jsou významné i pro potravinářství (sýrašťví). Během dlouhé doby zrání sýrů se může projevit pozdní duření, které je způsobeno vývojem a růstem klostridiálních spór a později především aktivitou vegetativních buněk bakterií rodu *Clostridium*. Vznikající plyny způsobují duření sýrů (v extrémních případech může dojít až k puknutí sýrů). Pozdní duření se projevuje zejména u sýrů s dlouhou dobou zrání (Le Bourhis a kol., 2005; Tůma a kol., 2008).

Z genetického hlediska je rod *Clostridium* velmi rozmanitý. Na základě analýzy 16S rRNA genů lze tento rod rozdělit do několika podskupin (Song a kol., 2002). Podskupina I, která zahrnuje klostridia nacházející se ve zduřelých sýrech, se vyznačuje vysokým stupněm podobnosti (více než 90 %) (Le Bourhis a kol., 2007). V literatuře je značná pozornost soustředěna na identifikaci patogenních druhů (Song, 2005). Kombinace molekulárně biologických metod založených na DGGE a PCR se specifickými primery se osvědčila jako jedna z nejuvhodnějších metod pro identifikaci bakterií *Clostridium* sp. v sýrech poškozených pozdním duřením (Cocolin a kol., 2004). Ve zrajících sýrech se nejčastěji vyskytují spóry druhů *C. tyrobutyricum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. pasteurianum*, *C. tetanomorphum*, *C. tertium* a *C. perfringens* (Le Bourhis a kol., 2007).

Cíl práce

Cílem této práce byla identifikace a charakterizace vybraných kmenů bakterií rodu *Clostridium* izolovaných z mléka a sýrů pomocí DNA amplifikačních metod. Příbuznost mezi jednotlivými kmeny byla stanovena molekulárně typizačními metodami.

2. Materiál a metody

2.1. Chemikálie a bakteriální kultury

V experimentech byly použity následující chemikálie: agarosa pro elektroforézu DNA (Serva, Heidelberg, SRN), dodecylsulfát sodný (SDS) (Serva, Heidelberg, SRN), ethidiumbromid (EtBr) (Sigma, St.Louis, USA), ethylen-diamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg,

SRN), M.R.S. Broth (Oxoid, Velká Británie), proteinasa K (Sigma, St.Louis, USA). Primery pro PCR byly syntetizovány ve firmě Generi-Biotech (Hradec Králové, ČR); TaqI DNA polymerasa byla od firmy Bio-Tech (Praha, ČR), DNA standard 100 bp žebříček byl od fy Malamité (Moravské Prusy, ČR). Ostatní chemikálie byly čistoty p.a. a pocházely z běžných komerčních zdrojů.

Analyzované kmeny klostridií byly získány ze společnosti MILCOM Praha (pracoviště Tábor). Jedná se o bakteriální kmeny izolované z mléka a sýrů. Jako kontrola byly použity kmeny *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T a *Clostridium butyricum* DSM 10702 (DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) a *Clostridium sporogenes* CCM 4423^T z České sbírky mikroorganismů (CCM - Czech Collection of Microorganisms, Brno, ČR).

2.2. Zařízení

Koncentrace a čistota izolované DNA byla měřena na spektrofotometru NanoPhotometer (Implen, München, Německo). K amplifikaci PCR směsi byl použit programovatelný cyklátor Termocycler DNA Engine, Peltier Thermal Cycler-200 (Bio-Rad, Philadelphia, USA). K separaci amplikonů bylo použito zařízení pro elektroforézu Easy-Cast, B1 (Owl Scientific, Rochester, USA) a zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA). K identifikaci produktů PCR byl použit transiluminátor TVR-312A (Spectroline, Albany, USA) a výsledky byly dokumentovány digitálním fotoaparátém.

2.3. Metody

2.3.1. Kultivace buněk a izolace DNA

Lyofilizáty buněk rozpuštěné v tekutém RCM médiu (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie) byly naočkovány do tekutého RCM média a kultivovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Buňky z 1 ml kultury byly centrifugovány při 15 000 ot po dobu 5 min, promyty ve vodě a resuspendovány v 500 µl lyzačního pufru (10 mM Tris HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0; lysozym 3 mg/ml). Směs byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě a poté bylo přidáno 12,5 µl 20 % SDS (dodecylsulfát sodný - detergent) a 5 µl proteinasy K (100 µg/ml) a vzorky byly inkubovány při 55 °C přes noc (18 hodin). DNA byla extrahována metodou fenolové extrakce (Sambrook a Russel, 2001). DNA byla srážena ethanolom při -20 °C po dobu 15 min a následně centrifugována při 15 000 ot/min po dobu 15 minut. Supernatant byl slit a DNA byla vysušena v exsikatoru. Poté byla DNA rozpuštěna v 100 µl TE pufru (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.8). Přítomnost a integrita izolované bakteriální DNA byla zjišťována pomocí gelové elektroforézy na agarose. Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky z hodnoty absorbance při 260 nm (A_{260nm}) (Sinden, 1994). Z poměru hodnot absorbancí A_{260nm}/A_{280nm} byla stanovena čistota DNA. Po stanovení koncentrace byly vzorky DNA ředěny TE puftrem na výslednou koncentraci 10 ng/µl.

Tab. 1 Rodově a druhově specifické primery pro identifikaci bakterií rodu *Clostridium* sp. a jejich typizaci

Rod/druh	Primer	Sekvence 5' → 3'	Amplikon (bp)	Reference
Rod <i>Clostridium</i>	F1	CTCAACTTGGGTGCTGCATT	619	Rekha a spol., 2006
	F2	ATTGTAGTACGTGTGTAGCCC		
<i>C. tyrobutyricum</i>	Ct1F	AACTGAAACAGCATGACT	233	Herman a spol., 1995
	Ct1R	TGTAGATAAAGGTCAAGC		
<i>C. butyricum</i>	CBISF	CCTCCTTTCTATGGAGAAATCTAGCA	262	Nakanishi a spol., 2005
	CBISR	TGTAGCTTGACCTTTTAAAGTTTGA		
rep-PCR	(GTG) ₅	GTGGTGGTGGTGGTG	420-2 500	Gevers a spol., 2001
16S-23S rDNA	Pr1	GGTGC GGGA	500-1 460	Nakanishi a spol., 2005
16S-23S rDNA	Pr6	CCCCTCAGCA	230-1 550	

Tab. 2 Složení směsí pro PCR

Složka	Primer/objem (μl)				
	Rod <i>Clostridium</i>	<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	(GTG) ₅	RAPD
Voda pro PCR	19,0	12,5	18,0	8,0	12,0
Pufr pro PCR kompletní	2,5	2,5	2,5		0
Pufr pro PCR bez MgCl ₂	0	0	0	2,5	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	0	0	1,0	5,0	5,0
DMSO pro PCR	0	0	0	0,5	0,5
dNTP (10 mM)	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0
5' primer (10 pmol/μl)	0,5	1,0	0,5	2,0	2,0
3' primer (10 pmol/μl)	0,5	1,0	0,5	0	0
DNA polymerasa 1.1 (1 U/μl)	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0
Matrice DNA (10 ng/μl)	1,0	5,0	1,0	5,0	1,0

2.3.2. Amplifikační metody

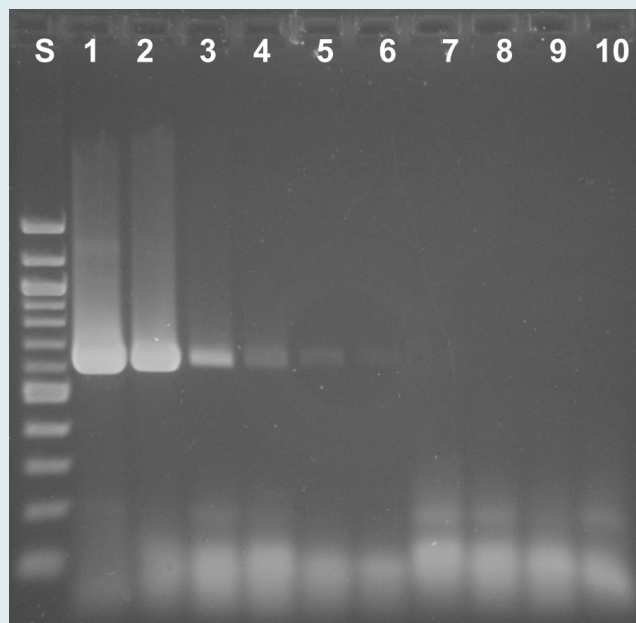
K určení identity použitých kmenů byla použita PCR specifická pro rod *Clostridium* a druhy *Clostridium tyrobutyricum* a *Clostridium butyricum*. Sekvence primerů je uvedena v Tabulce 1. Složení směsí použitých při amplifikaci je uvedeno v Tabulce 2. Celkový objem směsi pro PCR byl 25 μl. Amplifikace probíhala za podmínek: rod *Clostridium*: 95 °C/30 s - denaturace DNA, 53 °C/30 s - hybridizace primerů, 72 °C/1min - syntéza DNA řetězce; druh *Clostridium tyrobutyricum*: 95 °C/30 s - denaturace DNA, 60 °C/30 s - hybridizace primerů, 72 °C/30 s - syntéza DNA řetězce a druh *Clostridium butyricum*: 95 °C/30 s - denaturace DNA, 55 °C/30 s - hybridizace primerů, 72 °C/30 s - syntéza DNA řetězce. Amplifikace proběhla vždy v 30 cyklech. Před prvním cyklem byla směs zahřívána při 95 °C/5 min; v posledním cyklu byla syntéza řetězce při 72 °C prodloužena na 7 min. Poté byla reakční směs ochlazená na 10 °C.

K typizaci studovaných kmenů byla použita interrepetitivní polymerázová řetězová reakce (rep-PCR) s využitím primeru (GTG)₅, (Gevers a kol., 2001). Složení optimalizované směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 2. Amplifikace probíhala za podmínek: 94 °C/1 min - denaturace DNA, 46,3 °C/1min - hybridizace primerů, 72 °C/1 min - syntéza DNA řetězce. Amplifikace proběhla v 35 cyklech. Před prvním cyklem byla směs zahřívána při 94 °C/5 min; v posledním cyklu byla syntéza řetězce při 72 °C prodloužena na 10 min.

K typizaci studovaných kmenů byla použita RAPD s využitím primerů PR1 a PR6 (Nakanishi a kol., 2005). Složení optimalizované směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 2. Amplifikace probíhala za podmínek:

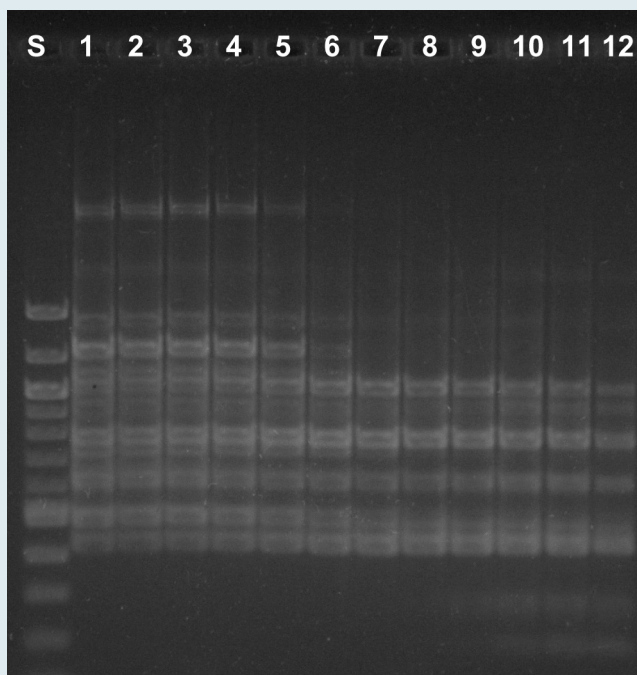
95 °C/1min - denaturace DNA, 36 °C/1min - hybridizace primerů, 72 °C/2 min - syntéza DNA řetězce. Amplifikace proběhla v 45 cyklech.

K separaci amplikonů byly použity gely o hustotě agarosu: 1,8 % pro rodově a druhově specifické PCR, 1,4 % při rep-PCR a RAPD.

Obr. 1 Citlivost rodově specifické PCR pro rod *Clostridium*

Podmínky: 1,8 % agarosový gel, TBE pufr (45 mM kyselina boritá, 45 mM Tris-base, 1 mM EDTA (pH 8.0)). Běhy - (S): DNA standard (100-1500 bp), (1) - (9): amplikony amplifikované z bakteriální DNA (10 ng, 1 ng, 100, 10, 1 pg, 100, 10, 1 fg, and 100 ag/μl), (10): negativní kontrola (bez DNA). DNA byla izolována z typového kmene *Clostridium butyricum* DSM 10702. Naneseno bylo 25 μl vzorku.

Obr. 2 Gelová elektroforéza produktů PCR na agarose při optimalizaci teploty hybridizace primeru (GTG)₅



Podmínky: 1,4 % agarosový gel, TBE pufr (45 mM kyselina boritá, 45 mM Tris-base, 1 mM EDTA (pH 8.0)). Běhy - (S): DNA standard (100-1500 bp), (1) - (11): amplikony amplifikované z bakteriální DNA (teplota hybridizace - 45,0; 45,4; 46,3; 47,5; 49,2; 51,4; 53,9; 56,0; 57,7; 58,8; 59,7 a 60,0 °C). DNA byla izolována z typového kmene *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T. Naneseno bylo 5 μ l produktu PCR.

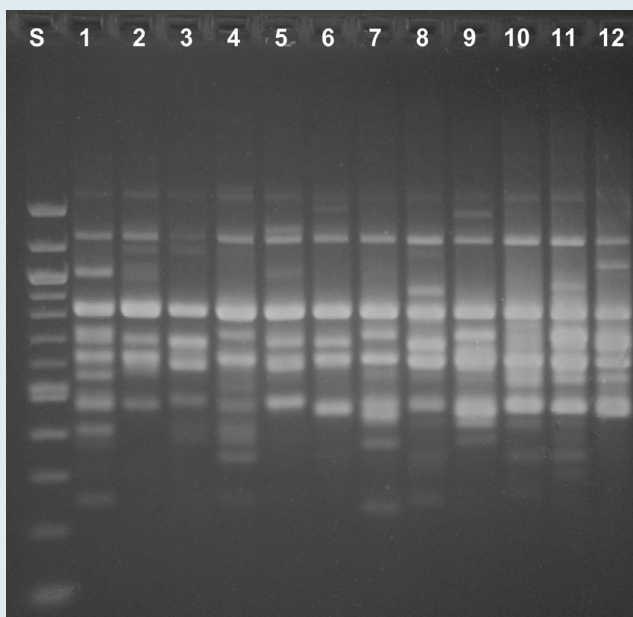
3. Výsledky a diskuze

Byl analyzován soubor 40 kmenů, které byly izolovány z mléka a sýrů s pozdním duřením. Pomocí rodově specifické PCR bylo potvrzeno zařazení izolátů do rodu *Clostridium*. Pomocí druhově specifických PCR bylo 5 kmenů zařazeno do druhu *C. butyricum* a 26 kmenů do druhu *C. tyrobutyricum*. Citlivost rodově specifické PCR je uvedena na Obr. 1. Nejnižší množství DNA, amplifikovatelné v PCR za vzniku detegovatelného produktu PCR, byl 1 pg (běh č. 5).

Při optimalizaci PCR primery specifickými pro druh *C. tyrobutyricum* byla zjištěna tvorba nespecifických ampikonů velikosti 300-500 párů bazí (bp). Nespecifické ampikony vznikaly při všech testovaných teplotách hybridizace (v rozmezí 50-60 °C) a to v intenzitě, která odpovídala intenzitě specifického produktu PCR. Výrazný vliv na intenzitu nespecifických produktů měla koncentrace DNA matrice. Tvorba slabých nespecifických ampikonů byla rovněž uváděna v původní práci (Nakanishi a kol., 2005).

Při identifikaci kmenů druhu *C. tyrobutyricum* byl použit vnější pár primerů z hnízdové PCR (Herman a kol., 1995). I když v původní práci je uvedeno, že vnější i vnitřní pár primerů jsou specifické pro druh *C. tyrobutyricum*, byla zjištěna tvorba nespecifických ampikonů. Stejný poznatek je popsán i v práci Tůma a kol., 2008. Primery byly odvozeny z mezerníkové oblasti 16S-23S rDNA a tvorba několika ampikonů může být způsobena variabilitou v mezerníkové oblasti (Garcia-Martinez a kol., 1996; Boyer a kol., 2001).

Obr. 3 Gelová elektroforéza produktů PCR na agarose při optimalizaci teploty hybridizace primeru Pr6 při RAPD



Podmínky: 1,4 % agarosový gel, TBE pufr (45 mM kyselina boritá, 45 mM Tris-base, 1 mM EDTA (pH 8.0)). Běhy - (S): DNA standard (100-1500 bp), (1) - (12): amplikony amplifikované z bakteriální DNA (teplota hybridizace - 33,0; 33,2; 33,5; 34,0; 34,7; 35,6; 36,6; 37,5; 38,1; 38,5; 38,9 a 39,0 °C). DNA byla izolována z typového kmene *Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637^T. Naneseno bylo 5 μ l produktu PCR.

Variabilita jednotlivých kmenů v uvedených druzích byla hodnocena pomocí rep-PCR a RAPD. Vliv teploty hybridizace primeru (GTG)₅ na počet ampikonů je uveden na Obr. 2. Jako optimální teplota hybridizace primeru (GTG)₅ byla zvoleno 46 °C. Interrepetivní polymerázová řetězová reakce (rep-PCR), založená na amplifikaci repetitivních elementů, byla použita v řadě případů i při typizaci mikroorganismů, které se značně odlišovaly od mikroorganismu, ve kterém repetitivní sekvence byly původně nalezeny (*Escherichia coli*) (Versalovic a kol., 1991). Primery (GTG)₅ pro rep-PCR byly s úspěchem použity k identifikaci a charakterizaci bakterií druhů *Bifidobacterium* (Křížová a kol., 2008), *Lactobacillus* (Gevers a kol., 2001) a *Lactococcus* (Prodělalová a kol., 2005). Dále byl optimalizován vliv teploty hybridizace primerů PR1 a PR6 na počet ampikonů. Jako optimální teplota hybridizace primerů Pr1 a Pr6 bylo zvoleno 36,0 °C. Tato teplota hybridizace se shoduje s teplotou uváděnou v literatuře (Nakanishi a kol., 2005). Jako vhodnější se jevila amplifikace za použití primeru PR6. Vliv teploty pro primer PR6 je uveden na Obr. 3.

Při použití typizačních metod však nedošlo k vytvoření oddělených shluků, které by zahrnovaly kmeny pouze jednoho druhu. Vzhledem k malému počtu kmenů *C. butyricum* v analyzovaném souboru je předčasné vyvozovat závěry o vhodnosti použití některé z výše uvedených typizačních metod.

4. Závěr

Postupy uvedené v práci jsou vhodné pro rodovou a druhovou identifikaci druhů *Clostridium tyrobutyricum* a *Clostridium butyricum*, které se nejčastěji vyskytují v sýrech s vadou pozdního duření. Použití metod rep-PCR

a RAPD k charakterizaci výše uvedených bakteriálních druhů vyžaduje další ověření.

Poděkování

Tato práce byla podporována grantem č. 2B08070 poskytnutým MŠMT ČR.

Literatura

- BOYER S. L., FLECHTNER V. R., JOHANSEN J. R. (2001): Is the 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region a Good Tool for Use in Molecular Systematics and Population Genetics? A Case Study in Cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 18, s. 1057-1069.
- COCOLIN L., INNOCENTE N., BIASUTTI M., COMI G. (2004): The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology*, 90, s.83-91.
- FINEGOLD S.M., SONG Y. L., LIU C. X. (2002): Taxonomy - General comments and update on taxonomy of clostridia and anaerobic cocci. *Anaerobe*, 8, s. 283-285.
- GARCÍA-MARTÍNEZ J., MARTÍNEZ-MURCIA A. ANTÓN A. I., RODRÍGUEZ-VALERA F. (1996): Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the RNA operons of some *Escherichia coli* strains of the ECOR collection and *E. coli* K12. *Journal of Bacteriology*, 178, s. 6374-6377.
- GEVERS D., HUYS G., SWINGS J. (2001): Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205, s. 31-36.
- HERMAN L. M. F., DE BLOCK J. H., WAES, G. M. (1995): A direct PCR detection method for *Clostridium tyrobutyricum* spores in up to 100 milliliters of raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 12, s. 4141-4146.
- KŘÍŽOVÁ J., ŠPANOVÁ A., RITTICH B. (2008): RAPD and rep-PCR fingerprinting for characterization of *Bifidobacterium* species. *Folia Microbiologica*, 53, s. 99-104.
- LE BOURHIS A. G., SAUNIER K., DORE J., CARLIER J. P., CHAMBA J. F., POPOFF M. R., THOLOZAN J. L. (2005): Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1, s. 29-38.
- LE BOURHIS A. G., DORE J., CARLIER J. P., CHAMBA J. F., POPOFF M. R., THOLOZAN J. L. (2007): Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 113, s. 154-163.
- NAKANISHI S., KUWAHARA T., NAKAYAMA H., TANAKA M., OHNISHI, Y. (2005): Rapid Species Identification and Partial Strain Differentiation of *Clostridium butyricum* by PCR Usin 16S-23S rDNA Intergenic Space Regions. *Microbiology and Immunology*, 49, s. 613-621.
- PRODĚLALOVÁ J., ŠPANOVÁ A., RITTICH B. (2005): Application of PCR, rep-PCR and RAPD techniques for typing of *Lactococcus lactis* strains. *Folia Microbiologica*, 50, s. 150-154.
- REKHA R., RIZVI M., JAISHREE P. (2006): Designing and validation of genus-specific primers for human gut flora study. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5, s. 505-512. Dostupný z www: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue5/full/2/>>.
- SAMBROOK J., RUSSEL, D., W. (2001): Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Press. New York..
- SINDEN R. R. (1994): DNA Structure and Function. Academic Press, San Diego, s. 34.
- SONG Y. L., LIU, C. X., MOLITORIS D., TOMZYNSKI T. J., MC TEAGUE M., READ E., FINEGOLD S. M. (2002): Use of 16S-23S rRNA spacer-region (SR)-PCR for identification of intestinal clostridia. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, s. 528-535.
- SONG Y. L. (2005): PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe*, 11, s. 79-91.
- TUMA Š., KUČEROVÁ K., PLOCKOVÁ M. (2008): Isolation of Anticlostridially Active *Lactobacilli* from Semi-hard Cheese. *Czech Journal of Food Sciences*, 26, s. 324-332.
- VERSALOVIC J., KOEUTH T., LUPSKI J. R. (1991): Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19, s. 6823-6831.

Přijato do tisku 8. 11. 2011

Lektorováno 18. 11. 2011

VYUŽITÍ SYSTÉMU DIVERSILAB™ PRO DRUHOVOU IDENTIFIKACI BIFIDOBAKTERIÍ

Vladimír Dráb, Gabriela Kunová, Lucie Volná

MILCOM a.s., Ke dvoru 12, 16000 Praha 6

v.drab@vum-tabor.cz

Using DiversiLab™ system for species identification of bifidobacteria

Abstrakt

Cílem práce bylo zjištění použitelnosti systému DiversiLab™ pro druhovou identifikaci bifidobakterií pomocí repetitivní PCR s dvěma různými primery AA a (GTG)₅. Oba primery umožňovaly (při použití rozšířeného Jaccardova algoritmu pro shlukovou analýzu) odlišení 20 různých druhů typových kmenů bifidobakterií. Jako templát byla pro amplifikaci použita jak purifikovaná DNA, tak DNA z hrubých lyzátů buněk. Při použití DNA z hrubých lyzátů buněk je možné zpracovat a identifikovat 25 kmenů v rámci jednoho pracovního dne.

Abstract

The aim of this work was to determine the applicability of the instrument DiversiLab™ for species identification of bifidobacteria using repetitive PCR with two different primers, AA and (GTG)₅. Both primers allowed (with the use of extended Jaccard algorithm for cluster analysis) distinguishing of 20 different species of type strains of bifidobacteria. Both purified DNA so DNA in crude cell lysates can be used as template for amplification. In the case of using DNA from cell lysates, it is possible to process and identify 25 strains within one working day.

1. Úvod

Metoda rep-PCR je typizační metoda, při které se amplifikují úseky DNA oddělené v genomu různými typy repetitivních, např. repetitivní mimogenový (mezerníkový) palindrom, REP - Repetitive Extragenic Palindrome (35-40 bp), konvenční enterobakteriální intergenová repetice, ERIC - Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence (124-127 bp) a BOX element (154 bp). Uvedené repetice jsou typické pro genomy mnoha bakteriálních druhů a v řadě případů i pro jednotlivé kmeny. Kratší repetice jako (GTG)₅ se také nacházejí v mnoha kopiích v mikrobiálních genomech a byla prokázána jejich použitelnost pro PCR fingerprinting (Versalovic a kol., 1994). Odpovídající protokoly se popisují jako REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR a (GTG)₅-PCR. Velkou výhodou rep-PCR je, že reprodukovatelné fingerpriny získáme jak při použití purifikované DNA, tak DNA z hrubých lyzátů buněk, narostlých