

Závěr

Z uvedených výsledků vyplývá, že bakterie *E. coli* se v syrovém kravském mléce a mléčných filtrech běžně vyskytují. U žádného ze získaných izolátů však nebyla zjištěna přítomnost sledovaných genů virulence, které bývají detekovány u Shigatoxin produkujících kmenů. U izolátů *E. coli* pocházejících z jedné farmy byla zjištěna přítomnost genů *tetA*, *tetB* a *bla_{SHV}*. Tyto geny se mohou přenášet horizontálně i na další gramnegativní bakterie a proto představují potenciální riziko jejich dalšího šíření v potravinovém řetězci.

Poděkování: Práce vznikla za finanční podpory projektu KUS QJ 1230044, AdmireVet CZ.1.05/2.1.00/01.0006 - ED0006/01/01 a IGA 15/2013/FVHE.

Literatura

- BENNETT P. M. (2008): Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153, s. 347-357.
- BRI?AS L., ZARAZAGA M., SÁENZ Y., RUIZ-LARREA F., TORRES C. (2002): β -lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, s. 3156-3160.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2006a): *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Ninth Edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute dokument M2-A9. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 37 s.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2006b): *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement*. Clinical and Laboratory Standards Institute dokument M100-S16. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 183 s.
- COSTA D., VINUÉ L., POETA P., COELHO A. C., MATOS M., SÁENZ Y., SOMALO S., ZARAZAGA M., RODRIGUES J., TORRES C. (2009): Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Veterinary Microbiology*, 138, s. 339-44.
- FAGAN P. K., HORNITZKY M. A., BETTELHEIM K. A., DJORDJEVIC S. P. (1999): Detection of shiga-like toxin (*stx1* and *stx2*), intimin (*eaeA*), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, s. 868-872.
- LEI T., TIAN W., HE L., HUANG X. H., SUN Y. X., DENG Y. T., SUN Y., LV D. H., WU C. M., HUANG L. Z., SHEN J. Z., LIU J. H. (2010): Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals, animal food products and companion animals in China. *Veterinary Microbiology*, 146, s. 85-89.
- LEWIS J. S. II, HERRERA M., WICKES B., PATTERSON J. E., JORGENSEN J. H. (2007): First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, s. 4015-4021.
- NG L. K., MARTIN I., ALFA M., MULVEY M. (2001): Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes*, 15, no. 4, s. 209-215.
- OJER-USOZ E., GONZÁLEZ D., VITAS A. I., LEIVA J., GARCÍA-JALÓN I., FEBLES-CASQUERO A., ESCOLANO MDE L. (2013): Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in meat products sold in Navarra, Spain. *Meat science*, 93, no. 2, s. 316-321.
- SAWANT A. A., HEGDE N. V., STRALEY B. A., DONALDSON S. C., LOVE B. C., KNABEL S. J., JAYARAO B. M. (2007): Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, s. 156-163.
- TUCKMAN M., PETERSEN P. J., HOWE A. Y. M., ORLOWSKI M., MULLEN S., CHAN K., BRADFORD P. A., JONES C. H. (2007): Occurrence of tetracycline resistance genes among *Escherichia coli* isolates from the phase 3 clinical trials for tigecycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, s. 3205-3211.

Přijato do tisku 21. 5. 2013

Lektorováno 6. 6. 2013

IDENTIFIKACE MIKROBIÁLNÍCH PŮVODCŮ VAD MLÉKÁRENSKÝCH VÝROBKŮ MODERNÍMI MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÝMI METODAMI

Iva Jebavá¹, Sabina Purkrtová², Jana Hanušová³, Dana Savická², Eva Šviráková¹, Irena Němečková³, Kateřina Demnerová²

¹ Ústav mléka, tuků a kosmetiky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

² Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

³ Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

Identification of microbial agents causing defects of dairy products by modern molecular-biological methods

Abstrakt

Mezi mikrobiální původce různých vad mlékárenských výrobků a surovin patří často zdravotně i technologicky rizikové bakterie (např. *Staphylococcus* sp., *Serratia* sp., *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Clostridium* sp.), ale také kvasinky (např. *Candida* sp., *Cryptococcus* sp., *Debaryomyces* sp., *Sporobolomyces* sp., *Yarrowia* sp.) a nejružnější plísně. Některé mikroorganismy mohou být někdy obtížně detekovatelné klasickými kultivačními mikrobiologickými metodami, které jsou časově náročné. Vhodnou alternativu k těmto metodám představují moderní molekulárně-biologické metody, poskytující vysoce spolehlivé výsledky v relativně rychlém čase. V této práci byly rizikové bakterie a kvasinky, izolované z mlékárenských výrobků a surovin, identifikovány pomocí třech různých metod (sekvenční analýzy vybraných genů rRNA, metody MALDI-TOF MS a biochemických testů). Výsledky získané z experimentů této práce mohou být uplatnitelné v oblasti zvyšování jakosti mlékárenských výrobků, a také při zajišťování úrovně výrobního standardu, za pomoci vhodných metod aplikovatelných v praxi.

Klíčová slova: sekvenční analýza genů rRNA, MALDI-TOF MS, biochemické testy, identifikace, bakterie, kvasinky

Abstract

Microbial agents of various defects of dairy products and raw materials are often classified as healthy and technologically hazardous bacteria (e.g. *Staphylococcus* sp., *Serratia* sp., *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Clostridium* sp.), but also yeasts (e.g. *Candida* sp., *Cryptococcus* sp., *Debaryomyces* sp., *Sporobolomyces* sp., *Yarrowia* sp.) and various moulds. Some microorganisms may be detected

with difficulties by conventional cultivation microbiological methods sometimes, which are time-consuming. Modern molecular-biological methods, providing highly reliable results in relatively short time, present a suitable alternative to these methods. In this work hazardous bacteria and yeasts, isolated from dairy products and raw materials, were identified by three different methods (the sequence analysis of selected rRNA genes, the MALDI-TOF MS method, and the biochemical tests). Results obtained from experiments of this work may be applicable in improving the quality of dairy products, and also maintaining the level of production standards, using appropriate methods applicable in practice.

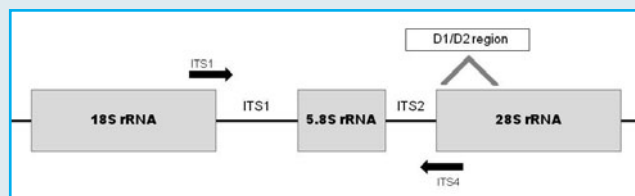
Key words: sequence analysis of rRNA genes, MALDI-TOF MS, biochemical tests, identification, bacteria, yeasts

Úvod

Mezi nejčastější mikrobiální původce vad mlékařských výrobků se řadí bakterie a kvasinky. V provozních podmínkách se k jejich identifikaci obvykle používají rychlé postupy, které ne vždy vedou k jejich přesné identifikaci. V praxi je nutné obdržet výsledky pokud možno co nejrychleji kvůli případným nápravným opatřením. V mlékařské provozní praxi se nejčastěji používají selektivní nebo chromogenní média, umožňující již v rámci primokultivací předběžné určení technologicky rizikových mikroorganismů. K přesnější identifikaci mikroorganismů se ve specializovaných laboratořích používá kombinace různých fenotypových a genotypových metod.

Genotypové metody určené pro identifikaci bakterií a kvasinek jsou založeny na odlišnostech v sekvencích nukleových kyselin (DNA nebo RNA). Převážná většina těchto metod je založená na principu polymerázové řetězové reakce (PCR). Nejspolehlivější metodou identifikace mikroorganismů je určování primární struktury (sekvenování) ubiquitních multikopiových genů kódujících ribosomální RNA (rRNA). Získané sekvence genů je možné následně porovnávat se sekvencemi ve veřejně přístupných databázích. Nutno však podotknout, že se genotypové metody relativně pomalu dostávají mezi spektrum rutinních diagnostických postupů, navzdory klesající ceně vlastních analýz a přístrojovému vybavení. Základním taxonomickým parametrem bakterií se stala primární struktura genu 16S rRNA (Stackebrandt a kol., 2002). U kvasinek se jedná o využití různých genů rRNA (např. 18S rRNA, 5,8S rRNA, 28S rRNA) a jejich podjednotek (viz Obr. 1) (Las Heras-Vazquez a kol., 2003; Mu a kol., 2012; Oslan a kol., 2012; Santo a kol., 2012).

Další perspektivní molekulárně-biologickou metodu představuje fenotypová metoda MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight), založená na analýze buněčných proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (Wieser a kol., 2012). Peptidy a bílkoviny jsou zde separovány na základě poměrů svých hmotností (m) a nábojů (z). Získaný proteinový profil je následně pomocí specifického softwaru porovnán s databází proteinových profilů různých mikroorganismů. Spolehlivost identifikace



Obr. 1 Identifikace kvasinek podle sekvence genu 5,8S rRNA: místa přisedání primerů ITS1 a ITS4 (Las Heras-Vazquez a kol., 2003) v ribosomální kazetě.

závisí nejenom na velikosti, ale i rozsahu používané databáze proteinových profilů. Využití MALDI-TOF MS v diagnostické praxi je prozatím limitováno vysokou pořizovací cenou přístroje a dostupných komerčních databází. Příklady proteinových spekter testovaných bakterií a kvasinek jsou uvedeny v části Materiál a metody.

Pro biochemickou identifikaci bakterií a kvasinek, založenou především na testování schopnosti utilizace různých zdrojů uhlíku a popř. dusíku, je k dispozici též řada biochemických souprav i detekčních systémů (např. Vitek, bioMérieux, FR).

Cílem této práce byla aplikace moderních molekulárně-biologických metod (sekvenace genů rRNA, metoda MALDI-TOF MS) pro identifikaci bakterií a kvasinek izolovaných z mlékařských fermentovaných a nefermentovaných výrobků vykazujících jakostní vady, pro získání spolehlivého a rychlého výsledku identifikace.

Materiál a metody

Izolace bakterií a kvasinek z mlékařských výrobků

Testované bakterie a kvasinky byly izolovány ze syrového mléka, také z nejakostních mlékařských fermentovaných výrobků (bílé sýry a solné nálevy) a nefermentovaných výrobků (zahuštěná slazená mléka, mléka UHT). Vzorky byly získány jak z mlékařských provozů, tak z tržní sítě.

Kultivace a biochemická identifikace bakteriálních izolátů

Bakteriální izoláty narostlé na agaru GTK (Oxoid, USA) bylo podrobena: makroskopickému vyhodnocení morfologie kolonií, Gramovu barvení s následným mikroskopickým vyhodnocením morfologie buněk, testům na produkci katalasy a oxidasy (bioMérieux, FR), schopnosti růstu na vybraných růstových médiích za individuálních kultivačních podmínek. Kultivační podmínky bakterií: enterobakterie a bacily: PCA (Merck, SRN), 37 °C, 24 h, aerobně; laktokoky: M17 (Oxoid, VB), 30 °C, 48 - 72 h, aerobně; laktobacily: MRS agar (Oxoid, VB), 30 °C, 48 - 72 h, anaerobně; stafylokoky: krevní agar (Merck, SRN), 37 °C, 24 - 48 h, aerobně; klostridie: agar dle Brewera (Merck, SRN), 37 °C, 48 - 72 h, anaerobně. Biochemická identifikace byla následně provedena soupravami: ENTEROtest 24, STAPHYtest 24, STREPTOtest 24, ANEROtest 23 (všechny testy: Erba Lachema, ČR), Microgen® Bacillus ID (Microbiology International, USA).

Kultivace a biochemická identifikace kvasinkových izolátů

Kvasinkové izoláty, narostlé na agaru GKCH (Oxoid, USA) a kultivované na Sabouraudově agaru s 2 % glukosy (Merck, SRN), 25 °C, 3 - 5 dnů, aerobně, byly podrobeny: makroskopickému vyhodnocení morfologie kolonií a mikroskopickému vyhodnocení morfologie buněk barvených methylenovou modří. Biochemická identifikace byla provedena soupravami API® 20C AUX 20 C (bioMérieux, FR). U dvou sporných izolátů byla provedena identifikace pomocí dalších fenotypových znaků: schopnosti fermentace uhlíkatých substrátů, produkce ureasy, schopnosti utilizace dusíku ve formě dusičnanů, schopnosti tvorby pseudohýf a sporulace. Údaje byly porovnány s platnou taxonomickou literaturou (Kurtzman a kol., 2011).

Izolace DNA z bakterií a kvasinek

DNA byla z buněk bakterií i kvasinek izolována pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, SRN) dle instrukcí výrobce, s předchozími modifikovanými kroky lyzí buněk v závislosti na jejich typu (grampozitivní bakterie, gramnegativní bakterie, kvasinky).

Amplifikace a sekvenace podjednotek rRNA

U bakterií byl amplifikován a analyzován gen kódující 16S rRNA za použití obecných primerů W001 a W002 (Godon a kol., 1997), specifických pro doménu *Bacteria*; u kvasinek gen kódující 5,8S rRNA s využitím specifických primerů ITS1 a ITS4 (Las Heras-Vazquez a kol., 2003) (viz Obr. 1). Produkty PCR byly přečištěny kitem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA) dle instrukcí výrobce a zaslány k sekvenaci do Mikrobio-

logického ústavu AV ČR, v.v.i. Získané sekvence byly analyzovány programem BLAST® (NCBI, 2013).

Identifikace bakterií a kvasinek metodou MALDI-TOF MS

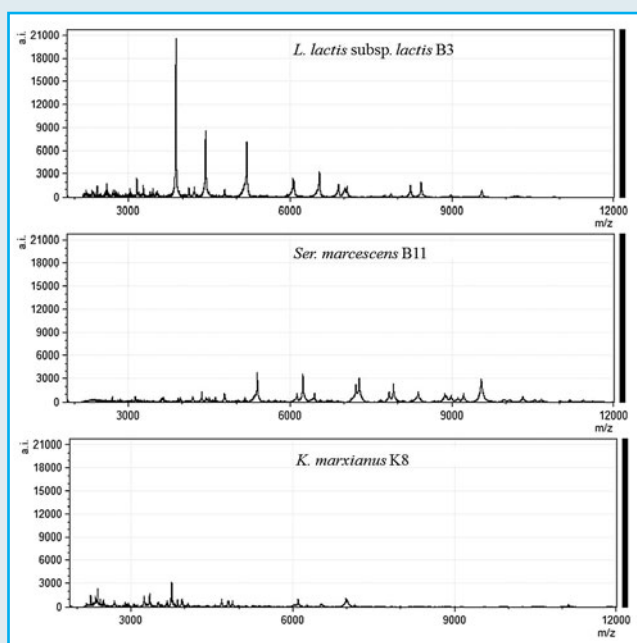
Metody přípravy vzorků závisely na robustnosti buněčné stěny mikroorganismů. Bakterie byly nanášeny z jedné izolované kolonie přímo na kovovou desku. Kolonie kvasinek byly podrobeny extrakční metodě (ethanol - 70% kyselina mravenčí - acetonitril; vše: Sigma Aldrich, SRN) a nanášeny jako lyzát (1 µl). Byl použit proteinový standard (1 µl): Bruker Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics, SRN). Zaschlé vzorky, včetně proteinového standardu, byly překryty matricovým roztokem (1 µl) a ponechány krystalizaci. Matricový roztok: nasycený roztok α -kyano-4-hydroxy kyseliny skořicové (Bruker Daltonics, SRN) v 50 % acetonitrilu s 2,5 % kyseliny trifluoroctové (vše: Sigma-Aldrich, SRN). Měření bylo provedeno na Ústavu biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha: přístroj Bruker Biflex IV MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, SRN), komerční databáze MALDI Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics, SRN). Vizualizace proteinových profilů vybraných bakterií a kvasinek programem mMass 5 (Strohalm a kol., 2010) je presentována na Obr. 2.

Výsledky a diskuse

Za pomoci třech výše zmíněných metod bylo identifikováno celkem 12 kmenů bakterií a 10 kmenů kvasinek. Porovnání získaných výsledků a spolehlivosti identifikace je uvedeno pro bakterie v Tab. 1, a pro kvasinky v Tab. 2. Spolehlivost identifikace je v případě použití metody sekvenace a biochemických testů uvedena v procentech, v případě použití metody MALDI-TOF MS jako kategorie spolehlivosti odvislá od hodnoty skóre (míra shody získaného a referenčního proteinového profilu) - viz Tab. 1. Od r. 1980 se taxonomické řazení prokaryotních mikroorganismů řídí především primární strukturou genu kódujícího 16S rRNA (Stackebrandt, 2000; Konstantinidis a Tiedje, 2005). Ovšem, v některých případech je tento gen až příliš konzervativní na to, aby spolehlivě odlišil fylogeneticky blízké druhy. V mlékárenské technologii se může jednat například o homofermentativní laktobacily (Huang a kol., 2012). Správná identifikace mikroorganismů často vyžaduje, kromě znalosti genotypových parametrů, také i znalost fenotypových parametrů. V případě odlišné identifikace se upřednostňuje identifikace získaná genotypovými metodami.

Vybrané morfologické a fyziologické znaky bakterií a kvasinek je proto vhodné ověřovat při jakémkoliv identifikačním postupu, včetně použití molekulárně-biologických metod využívajících např. sekvenaci a MALDI-TOF MS.

Pro grampozitivní a gramnegativní bakterie byly navrženy a optimalizovány metody pro izolaci DNA. Koncentrace izolované DNA se pohybovala v rozmezí hodnot 100 - 200 ng/µl. Pro všechny testované kmeny byl získán produkt PCR o očekávané velikosti 1500 bp



Obr. 2 Příklad spekter MALDI-TOF MS získaných pro vybrané testované kmeny grampozitivních bakterií (*L. lactis subsp. lactis B3*), gramnegativních bakterií (*Ser. marcescens B11*) a kvasinek (*K. marxianus K8*).

Tab. 1 Identifikace bakterií pomocí sekvenace genů 16S rRNA, MALDI-TOF MS a biochemických testů

Označení izolátů	Sekvenace 16S rRNA		MALDI-TOF MS			Biochemická identifikace			Výsledná identifikace*
	Identifikace	Spolehlivost (%)	Identifikace	Skóre (0-3)	Spolehlivost (kategorie)	Použitý test	Výsledek	Spolehlivost (%)	
B1	<i>Lact. rhamnosus</i>	100	<i>Lact. rhamnosus</i>	1,717	+	ANAERO	<i>Lact. rhamnosus</i>	100	<i>Lact. rhamnosus</i>
B2	<i>Staph. hominis</i>	99,9	<i>Staph. hominis</i>	1,848	+	STAPH	<i>Staph. hominis</i>	97	<i>Staph. hominis</i>
B3	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99,9	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	2,084	++	STREPTO	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	93,9	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
B4	<i>Staph. epidermidis</i>	100	<i>Staph. epidermidis</i>	2,131	++	STAPH	<i>Staph. epidermidis</i>	97	<i>Staph. epidermidis</i>
B5	<i>Cl. tyrobutyricum</i>	100	<i>Cl. chauvoei</i>	1,581	-	ANAERO	N†	N†	<i>Cl. tyrobutyricum</i>
B6	<i>Staph. epidermidis</i>	100	<i>Staph. epidermidis</i>	1,926	+	STAPH	<i>Staph. epidermidis</i>	99,8	<i>Staph. epidermidis</i>
B7	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	1,958	+	STREPTO	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	98,2	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
B8	<i>B. licheniformis</i>	100	<i>B. licheniformis</i>	2,266	++	BAC ID	<i>B. licheniformis</i>	95,9	<i>B. licheniformis</i>
B9	<i>Staph. epidermidis</i>	100	<i>Staph. epidermidis</i>	1,939	+	STAPH	<i>Staph. epidermidis</i>	99,5	<i>Staph. epidermidis</i>
B10	<i>Staph. equorum</i>	99,9	<i>Staph. equorum</i>	2,187	++	STAPH	<i>Staph. equorum</i>	98,9	<i>Staph. equorum</i>
B11	<i>Ser. marcescens</i>	99,8	<i>Ser. marcescens</i>	2,009	++	ENTERO	<i>Ser. marcescens</i>	100	<i>Ser. marcescens</i>
B12	<i>Ser. liquefaciens</i>	95,4	<i>Ser. liquefaciens</i>	1,728	+	ENTERO	<i>Ser. liquefaciens</i>	94,4	<i>Ser. liquefaciens</i> **

Poznámka 1: B... *Bacillus*, Cl... *Clostridium*, Lact... *Lactobacillus*, L... *Lactococcus*, Staph... *Staphylococcus*, Ser... *Serratia*, N... neidentifikováno daným protokolem.

*... výsledná identifikace odpovídá identifikaci izolátů metodou sekvenace při spolehlivosti vyšší než 99,5 %; **... izolát primárně identifikovaný metodou sekvenace se spolehlivostí nižší nebo rovno 99,5 %, následně identifikovaný i dalšími fenotypovými testy; †... test nemožňuje identifikaci *Cl. tyrobutyricum* na úrovni druhu.

Poznámka 2: Biochemická identifikace pomocí následujících testů: ANAERO... ANAEROtest 23, BAC ID... Microgen® Bacillus ID, ENTERO... ENTEROtest 24, STAPH... STAPHYtest 24, STREPTO... STREPTOtest 24.

Poznámka 3: Hodnocení spolehlivosti identifikace mikroorganismů pomocí metody MALDI-TOF MS (rozsah skóre...symbol...kategorie spolehlivosti):

2,300 - 3,000...+++...vysoce pravděpodobná druhová identifikace; 2,000 - 2,299...++...bezpečná rodová identifikace, pravděpodobná druhová identifikace;

1,700 - 1,999...+...pravděpodobná rodová identifikace; 0 - 1,699...-...nespolehlivá identifikace.

Tab. 2 Identifikace kvasinek pomocí sekvenace genů 5,8S rRNA, MALDI-TOF MS a biochemického testu API® 20C AUX

Označení izolátů	Sekvenace 5,8S rRNA			MALDI-TOF MS			Biochemická charakterizace dle testu API® 20C AUX		Výsledná identifikace
	Velikost amplifikátu (bp)	Identifikace	Spolehlivost (%)	Identifikace	Skóre (0-3)	Kategorie spolehlivosti	Identifikace	Spolehlivost (%)	
K1	600	<i>D. hansenii</i>	100	<i>D. hansenii</i>	1,736	+	<i>D. hansenii</i>	93,9	<i>D. hansenii</i>
K2	600	<i>D. hansenii</i>	99,8	<i>D. hansenii</i>	1,634	-	<i>D. hansenii</i>	99,9	<i>D. hansenii</i>
K3	600	<i>D. hansenii</i>	99,8	<i>P. guilliermondii</i>	1,526	-	<i>D. hansenii</i>	99,9	<i>D. hansenii</i>
K4	600	<i>D. hansenii</i>	99,8	<i>Clav. lusitaniae</i>	1,53	-	N	N	<i>D. hansenii</i>
K5	500	<i>C. parapsilosis</i>	98,6	<i>C. parapsilosis</i>	1,96	+	<i>C. parapsilosis</i>	92,9	<i>C. parapsilosis</i>
K6	600	<i>D. hansenii</i>	99,5	<i>Clav. lusitaniae</i>	1,58	-	<i>F. neoformans</i>	77,9	<i>D. hansenii</i> **
K7	600	<i>D. hansenii</i>	99,7	<i>D. hansenii</i>	1,566	-	<i>D. hansenii</i>	89,9	<i>D. hansenii</i>
K8	800	<i>K. marxianus</i>	99,8	<i>K. marxianus</i>	2,038	++	<i>D. hansenii</i>	98,2	<i>K. marxianus</i>
K9	350	<i>Y. lipolytica</i>	76,5	<i>Y. lipolytica</i>	1,948	+	<i>P. kudriavzevii/C. inconspicua</i>	98,9	<i>Y. lipolytica</i> **
K10	600	<i>S. metaroseus</i>	99,6	<i>S. metaroseus</i>	1,812	+	N	N	<i>S. metaroseus</i>

Poznámka 1: C... *Candida*, Clav... *Clavispora*, Cr... *Cryptococcus*, D... *Debaryomyces*, F... *Filobasidiella*, K... *Kluyveromyces*, P... *Pichia*, S... *Sporodibolus*, Sp... *Sporobolomyces*,

Y... *Yarrowia*, *... výsledná identifikace odpovídá identifikaci izolátů metodou sekvenace při spolehlivosti vyšší než 99,5 %, **... izolát primárně identifikovaný metodou sekvenace se spolehlivostí nižší nebo rovno 99,5 %, následně identifikovaný i dalšími fenotypovými testy (kromě testu API® 20C AUX), N... neidentifikováno.

Poznámka 2: Názvy testovaných kvasinek (teleomorfa/anamorfa): *Clav. lusitaniae/C. lusitaniae*, *D. hansenii/C. famata*, *F. neoformans/Cr. neoformans*, *P. kudriavzevii/C. krusei*, *K. marxianus/C. kefyri*, *P. guilliermondii/C. guilliermondii*, teleomorfa není známa/*C. inconspicua*, *S. metaroseus/Sp. roseus*, *Y. lipolytica/C. lipolytica*.

Poznámka 3: Hodnocení spolehlivosti identifikace mikroorganismů pomocí metody MALDI-TOF MS (rozsah skóre... symbol... kategorie spolehlivosti):

2,300 - 3,000...+++... vysoce pravděpodobná druhová identifikace; 2,000 - 2,299...++... bezpečná rodová identifikace, pravděpodobná druhová identifikace;

1,700 - 1,999...+... pravděpodobná rodová identifikace; 0 - 1,699...-... nespolehlivá identifikace.

(Stackebrandt a kol., 2002). Porovnáním primární struktury tohoto produktu PCR s genovou bankou byly průkazně prokázány všechny kmene, kromě kmene *Ser. liquefaciens* B12, se spolehlivostí vyšší než 99,9 %. Shodné výsledky byly získány i při použití metody MALDI-TOF MS, a to pro 11 ze 12 testovaných kmenů, avšak s nižší spolehlivostí (bezpečná či pravděpodobná rodová identifikace). Jeden kmen (*Cl. tyrobutyricum* B7) se podle použitého pracovního protokolu nepodařilo identifikovat na úroveň druhu.

Výsledky získané za pomoci souprav biochemických testů (u 50 % izolátů byla spolehlivost vyšší než 98 %) se shodovaly s výsledky sekvenace a MALDI-TOF MS. Lze tedy konstatovat, že všechny tři použité metody poskytly stejné výsledky, ovšem s různou mírou spolehlivosti.

Z experimentálně získaných výsledků vyplynulo, že procentuálně nejspolehlivější metodou identifikace bakterií byla metoda sekvenace genu 16S rRNA. Avšak, v případech velmi příbuzných druhů by bylo nutné detekovat či porovnávat navíc i jiné geny nebo použít jiné doplňkové identifikační metody. Spolehlivost metody MALDI-TOF MS se odvíjí především od počtu proteinových profilů jednotlivých druhů, kmenově specifických, vedených v používané databázi, a s ohledem na optimalizaci procesu přípravy vzorku, včetně kultivačních podmínek (Croxatto a kol., 2012). MALDI-TOF MS nabízí rychlou a provozně nenáročnou identifikaci bakterií, ideální pro skrínění velkého počtu izolátů. V případě nižší spolehlivosti identifikace bakterií je nutno výsledky ověřit vhodnými

doplňkovými testy (testování morfologických, fyziologických a biochemických charakteristik).

U eukaryotních organismů, ke kterým se řadí i kvasinky, je taxonomické řazení stále závislé i na fyziologické charakterizaci. Tato charakterizace je časově náročná a vyžaduje nemalé zkušenosti. Z tohoto důvodu byly v této práci odzkoušeny takové moderní a rychlé metody, které by zavedenou identifikaci kvasinek urychlily a usnadnily.

Za metodu s nižší spolehlivostí identifikace kvasinek byla označena metoda MALDI-TOF MS. Pouze v jednom případě, a u to kmene *Kluyveromyces marxianus* K8, byla spolehlivost identifikace na úrovni "bezpečné rodové" a "pravděpodobné druhové" identifikace. Další čtyři kmeny byly identifikovány na úrovni "pravděpodobné rodové" identifikace; u zbylých pěti kmenů byla identifikace zjištěna jako nespolehlivá. Přesto, získané výsledky byly ze 70 % shodné s analýzou sekvence genů 5,8S rRNA. Důvodem nižší spolehlivosti identifikace může být nižší počet proteinových profilů jednotlivých druhů kvasinek v používané databázi, stejně jako další faktory, včetně modifikace metod pro přípravu vzorků (Qian a kol., 2008). Na rozšiřování databáze proteinových profilů a na optimalizaci dalších metod příprav vzorků pro kvasinky i bakterie se v současné době dále pracuje.

Při sekvenaci genů 5,8S rRNA se kvasinkové izoláty překvapivě navzájem lišily, především ve velikosti sekvenovaného amplikonu (produktu PCR). Pro druhy *Debaryomyces hansenii* a *Sporidiobolus metaroseus* byly získány produkty PCR o velikosti 600 bp, pro druh *C. parapsilosis* o velikosti 500 bp, pro druh *K. marxianus* o velikosti 800 bp, a pro druh *Yarrowia lipolytica* o velikosti 350 bp (viz Tab. 2). Ve všech případech, kromě izolátu *Y. lipolytica* K9, byla spolehlivost identifikace velmi vysoká (> 98,0 %). U dvou izolátů (*D. hansenii* K6, *Y. lipolytica* K9), kde byla spolehlivost identifikace pomocí sekvenace nižší nebo rovna než 99,5 %, byl její výsledek též potvrzen klasickou identifikací pomocí fenotypových znaků.

Použití pouze testů API® (konkrétně testu API® 20C AUX), které jsou považovány za spolehlivé a řadou autorů používány jako referenční identifikační systém, bylo spolehlivé pouze u části zástupců druhu *D. hansenii* a u zástupce *C. parapsilosis*. V tomto případě je především nutno vzít v úvahu, že auxanografická metoda typu API® je konstruována přednostně pro identifikaci klinických izolátů kvasinek. Při identifikaci kvasinek, izolovaných zvláště z potravin, je třeba provést další fenotypové testy.

Závěr

V práci byla potvrzena vysoká spolehlivost a univerzálnost genotypové metody sekvenace různých podjednotek genů rRNA pro identifikaci bakteriálních a kvasinkových původců vad mlékařenských výrobků a surovin. Nezanedbatelnou výhodou této metody je mj. nezaplatněné poskytnutí sekvencí z genových bank, také klesající cena sekvenční analýzy. Výsledky získané při použití fenotypové metody MALDI-TOF MS potvrdily vhodnost této

metody pro identifikaci bakteriálních, a po další optimalizaci také kvasinkových, původců vad, s vyšším nárokem na komplexní odbornou interpretaci výsledků. Výhodou této metody je možnost rychlé analýzy relativně velkého počtu vzorků; nevýhodou je vysoká pořizovací cena přístroje a zpoplatnění referenčních databází. Výsledky této práce mohou být aplikovatelné v praxi v úzké vazbě na zvyšování jakosti mlékařenských výrobků a surovin, včetně zajišťování úrovně výrobního standardu, za pomoci vhodných identifikačních metod mikrobiálních původců vad.

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV), Komplexní udržitelné systémy v zemědělství 2012-2018, projektu QJ1210300 - Systémy jištění kvality a bezpečnosti mlékařenských výrobků vhodnými metodami aplikovatelnými v praxi.

Literatura

- CROXATTO A., PROD'HOM G., GREUB G. (2012): Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, s. 380-407.
- GODON J.J., ZUMSTEIN E., DABERT P., HABOUZIT F., MOLETTA R. (1997): Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2802 - 2813.
- HUANG C.H., CHANG M.T., HUANG M.C., WANG L.T., HUANG L., LEE F.L. (2012): Discrimination of the *Lactobacillus acidophilus* group using sequencing, species-specific PCR and SNaPshot mini-sequencing technology based on the recA gene. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, s. 2703-2708.
- KONSTANTINIDIS K.T., TIEDJE J.M. (2005): Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *Journal of Bacteriology*, 187, s. 6258-6264.
- KURTZMAN C.P., FELL J.W., BOEKHOUT T. (edit.) (2011): *The Yeasts: a Taxonomic Study* (5.vyd.), London, UK, Elsevier.
- LAS HERAS-VAZQUEZ F.J., MINGORANCE-CAZORLA L., CLEMENTE-JIMENEZ J.M., RODRIGUEZ-VICO F. (2003): Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research*, 3, s. 3-9.
- MU Z., YANG X., YUAN, H. (2012): Detection and identification of wild yeast in Koumiss. *Food Microbiology*, 31, s. 301-308.
- NCBI (2013): *The National Center for Biotechnology Information (NCBI), Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®)* (on-line). Staženo 23.5.2013. Dozupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- OSLAN S.N., SALLEH A.B., ABD RAHMAN R.N.Z.R., BASRI M., CHOR A.L.T. (2012): Locally isolated yeasts from Malaysia: identification, phylogenetic study and characterization. *Acta Biochimica Polonica*, 59, s. 225-229.
- QIAN J., CUTLER J.E., COLE B.R., CAI Y. (2008): MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, s. 439-449.
- SANTO D.E., GALEGO L., GONÇALVES T., QUINTAS C. (2012): Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits' fermentations. *Food Research International*, 47, s. 45-50.
- STACKEBRANDT E. (1999): Defining taxonomic ranks. Ve: DWORKIN M. (edit.): *The Prokaryotes - An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3.edice (pp. 29-57). New York, USA, Springer-Verlag.
- STACKEBRANDT E., FREDERIKSEN W., GARRITY G.M., GRIMONT P.A.D., KÄMPFER P., MAIDEN M.C.J., NESME X., ROSSELLÓ-MORA R., SWINGS J., TRÜPER H.G. (2002): Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, s. 1043-1047.
- STROHALM M., KAVAN D., NOVÁK P., VOLNÝ M., HAVLIČEK V. (2010): mMass 3: a cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. *Analytical Chemistry*, 82, s. 4648-4651.
- WIESER A., SCHNEIDER L., JUNG J., SCHUBERT S. (2012): MALDI-TOF in microbiological diagnostics - identification of microorganisms and beyond. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, s. 965-974.