

IDENTIFIKACE *BACILLUS* SP. IZOLOVANÝCH Z MLÉKÁRENSKÝCH VÝROBKŮ A VÝROBNÍHO ZAŘÍZENÍ POMOCÍ PCR A MALDI TOF MS

Eva Šviráková¹, Jana Hanušová², Andrea Múhlhansová³, Iva Jebavá⁴, Sabina Purkrťová⁴

¹ Ústav konzervace potravin, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

² Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

³ Ústav mléka, tuků a kosmetiky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

⁴ Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Identification of *Bacillus* sp. isolated from dairy products and production facility using PCR and MALDI TOF MS

Abstrakt

Druhy *Bacillus* sp. patří mezi obávané zdravotně i technologicky rizikové aerobní sporulující bakterie vyskytující se v různých surovinách, potravinách a na výrobním zařízení. Bacily mohou být relativně rychle detekovány s vysokou spolehlivostí na úroveň rodu, druhu či kmene pomocí různých metod, včetně biologických, instrumentálních a biochemických. V této práci byly bacily, izolované z mlékárenských výrobků, surovin a výrobních zařízení, identifikovány na úroveň druhu pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a MALDI - TOF hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS). Výsledky této práce mohou být užitečné při zajišťování jakosti nejenom mléka a mlékárenských výrobků, ale obecně při zajišťování hygienické úrovně potravinářských výrob, s využitím vhodné detekce technologicky rizikových mikroorganismů.

Klíčová slova: *Bacillus* sp., technologické riziko, málo kyselé potraviny, identifikace, PCR, MALDI-TOF MS

Abstract

Bacillus species belong to one the dreaded health and technologically risky aerobic spore-forming bacteria occurring in various raw materials, foods and on producing facility. Bacilli can be detected relatively quickly with high reliability at the genus, species or strain level using different methods; including biological, instrumental and biochemical methods. In this work, bacilli, which were isolated from dairy products, raw materials and processing equipment, were identified at species level by means of the polymerase chain reaction (PCR) and the MALDI - TOF Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). The results of this

study may be useful for quality assurance not only milk and dairy products, but in general for ensuring the hygiene level of the other food productions, using a proper detection of technologically risk microorganisms.

Key words: *Bacillus* sp., technological risk, low-acid foods, identification, PCR, MALDI-TOF MS

Úvod

Mezi často a četně se vyskytující mikrobiální původce, izolované z např. z mléka, mlékárenských výrobků a výrobního zařízení, patří mimo jiné i aerobní sporulující bakterie, které představují nezanedbatelné zdravotní a/nebo technologické riziko. Řadí se zde především široká skupina bacilů, pro něž je typická tepelná resistance jejich spor, které mohou přežívat v tepelně opracovaných potravinách a způsobovat tak následné vady výrobků.

Bakterie rodu *Bacillus* jsou řazeny do čeledi Bacillaceae, řádu Bacillales, třídy Bacilli, oddělení Firmicutes a domény Bacteria. Rod *Bacillus* je fylogeneticky dělen na skupinu patogenních bacilů (např. *B. cereus*, *B. anthracis*), skupinu půdních bacilů (např. *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*), skupinu podmořských bacilů (např. *Geobacillus kaustophilus*, *Oceanobacillus iheyensis*), skupinu vodních bacilů (např. *B. cohaulensis*) a skupinu halofilních bacilů (např. *B. halodurans*, *B. clausii*) (Alcaraz a kol., 2010).

Buňky rodu *Bacillus* tvoří tyčinky o velikosti 0,5 - 2,5 x 1,2 - 10 μm, které jsou často řazené do párů nebo řetězků, se zakulacenými konci. Buňky jsou grampozitivní a pohyblivé pomocí peritrichálních bičičků. Endospory jsou oválné, někdy kulovitěho nebo cylindrického tvaru, velmi odolné k mnoha nepříznivým podmínkám. Bacily jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní, se širokou rozmanitostí fyziologických vlastností v závislosti na teplotě, pH a přítomnosti chloridu sodného. Jsou chemoorganotrofní s fermentativním a respiračním metabolismem, obvykle katalasa pozitivní. Jedná se o ubikvitně se vyskytující bakterie. Některé druhy (např. *B. anthracis* a *B. cereus*) jsou patogenní pro obratlovce i bezobratlé (Holt a kol., 1994). Mezofilní druhy (např. *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. luteus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*) rostou v teplotním rozmezí 15 až 45 °C, termofilní druhy (např. *B. stearothermophilus*) mají optimální teplotu růstu vyšší než 45 °C (McClure, 2006).

Zástupci rodu *Bacillus*, konkrétně druhy *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. lentus*, *B. sphaericus*, *B. cereus* a *B. circulans*, se podílejí na kažení především málo kyselých potravin o pH 4,6 a vyšším, které byly podrobeny nízké pasteraci a následně zchlazeny, dále na kažení komerčně sterilizovaných potravin (tj. potravin ošetřených záhřevem UHT), a nebo na kažení kyselých potravin podrobených pasteraci s následným skladováním při pokojové teplotě. *Bacillus* sp. a příbuzné mikroorganismy způsobují kažení díky proteolytické, lipolytické, sacharolytické a pektinolytické aktivitě. Syrové materiály, jako jsou mléko, maso a zelenina, bývají bacily kontami-

minovány již v prvovýrobě a jejich endospory přežívají následně použité tepelné procesy. K bacilárním zástupcům s tepelně vysoce resistantními sporama patří např. druhy *B. sporothermodurans* a *B. coagulans* (McClure, 2006).

U mlékárenských výrobků se na jejich trvanlivosti, a také na potenciálním rozvoji mikroflóry zodpovědné za kažení, podílí mnoho faktorů. Výrobky jsou v určité fázi výroby obvykle podrobeny pasteraci, primárně navržené k odstranění infekce ve formě vegetativních forem mikroorganismů (např. *Coxiella burnetti* a *Mycobacterium tuberculosis*), přičemž tepelný proces zároveň inaktivuje enzymy přirozeně se v mléce vyskytující. V minulých letech došlo v mlékárenském průmyslu k rozvoji pasterace a vývoji dalších tepelných procesů (např. vysoká pasterace nebo UHT pasterace, UHT sterilizace, sterilizace v obalu) (Boor a Murphy, 2002), což umožnilo větší diferenciaci technologických postupů pro cílenou eliminaci tepelně rezistentních aerobních sporulujících bakterií. Pro kontrolu účinnosti zvolených technologických postupů jsou nezbytné spolehlivé a co nejrychlejší metody identifikace mikroorganismů minimálně na úroveň rodu či druhu.

Rozlišení zástupců rodu *Bacillus* na druhové úrovni je relativně obtížné, jednak z důvodu vysokého počtu druhů, jednak díky nekompletnímu popisu taxonomicky nově zařazených druhů. V potravinářské provozní praxi lze k identifikaci bacilů použít plotnovou metodu s využitím různých diagnostických selektivních médií; pro stanovení *B. cereus* jsou to např. média PEMBA a MYPA (Němečková a kol., 2011). Ovšem, ostatní druhy bacilů se při rutinních analýzách obvykle nestanovují. Ve specializovaných laboratořích lze pro spolehlivou identifikaci aerobních sporulujících bakterií při odhadu jejich patogenity, rizikovitosti, a při zajišťování kvality mléka a mlékárenských výrobků, využít další metody, např. molekulárně-biologické, instrumentální či biochemické.

Metody je možné dále dělit jednak na genotypové, identifikující mikroorganismy na základě odlišností v sekvenci DNA a jednak na fenotypové, založené na analýze enzymů, jejich metabolických produktů a dalších exprimovaných proteinů (Kämpfer a Glaeser, 2012). Převážná většina genotypových metod je založena na amplifikaci DNA metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) s využitím rodově či druhově specifických primerů - oligonukleotidů o definovaných sekvencích, které se komplementárně specificky váží k vybraným oblastem v DNA. V případě, že nelze využít specifických primerů, je možné využít metodu sekvenování, která podá informace o primární struktuře vybraných konzervovaných genů či ve výjimečných případech i celého genomu bakterií (Kämpfer a Glaeser, 2012).

Naopak, fenotypová metoda MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight) je založená na analýze buněčných proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (Wieser a kol., 2012). Peptidy a bílkoviny jsou touto metodou separovány na základě poměrů svých hmotností (m) a nábojů (z). Získaný proteinový profil je následně, pomocí specifického softwaru, porovnán s data-

bází proteinových profilů různých mikroorganismů. Spolehlivost identifikace závisí nejenom na velikosti (tzn. na počtu přítomných druhů), ale i na rozsahu (tzn. na množství přítomných kmenů jednoho mikrobiálního druhu) používané databáze proteinových profilů. Využití MALDI-TOF MS v diagnostické praxi je prozatím limitováno vysokou pořizovací cenou přístroje a dostupných komerčních databází. Postupně se však stává standardním vybavením, zvláště v klinických laboratořích, a identifikace metodou MALDI-TOF MS v těchto případech bývá metodou první volby (Böhme a kol., 2006; Croxatto a kol., 2012; Sandrin a kol., 2012).

Cílem této práce bylo použití molekulárně-biologické metody PCR využívající rodově i druhově specifické primery a instrumentální metody MALDI-TOF MS pro spolehlivou a rychlou identifikaci technologicky rizikových bacilů, izolovaných z mlékárenských výrobků a výrobních zařízení, způsobujících vady výrobků.

Materiál a metody

Izolace bakterií z mlékárenských výrobků

Bakterie rodu *Bacillus* byly izolovány z různých potravinářských výrobků, nejčastěji z mlékárenských, a také ze stěrů výrobního zařízení mlékárenských závodů.

Kultivace a biochemická identifikace bakteriálních izolátů

Bakteriální izoláty narostlé na agaru Columbia s 5 % (obj.) beraní krve (Bio-Rad, USA), při 37 °C, po dobu 24 h, byly podrobeny makroskopickému vyhodnocení morfologie kolonií, Gramovu barvení s následným mikroskopickým vyhodnocením morfologie buněk, a také testům na produkci katalasy a oxidasy (bioMérieux, FR).

Identifikace bacilů metodou PCR

Identifikace bacilů metodou PCR s individuálně navrženými specifickými primery byla provedena na Ústavu mléka, tuků a kosmetiky, VŠCHT Praha. Primery pro druh *B. licheniformis* (BLICH-F a BLICH-R) vykazovaly 100 % komplementaritu se sbírkovým kmenem *B. licheniformis* ATCC 14580. Primery designované pro druh *B. cereus* (BCER-F a BCER-R) vykazovaly 82 % komplementaritu se sbírkovým kmenem *B. cereus* ATCC 14579. Primery navržené pro druh *B. subtilis* (BSUB-F a BSUB-F) vykazovaly 100 % komplementaritu s kmenem *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168.

DNA byla izolována pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, SRN) dle instrukcí výrobce pro grampozitivní bakterie (Jebavá a kol., 2011). K identifikaci bacilů byly použity rodově a druhově specifické primery amplifikující 16S rRNA (Němečková a kol., 2011), rekapitulované v Tab 1. Reakční směs (20 µl) byla složena z následujících reagentů: 13 µl demineralizované vody, 4 µl 5x HOT FIREPol EvaGreen Mix Plus (Solis BioDyne, Estonsko), 0,5 µl forward primeru (50 µM, Generi Biotech, ČR), 0,5 µl reverse primeru (50 µM, Generi Biotech, ČR), 2 µl izolo-

Tab. 1 Primery specifické pro 16SrRNA (Němečková a kol., 2011), pro níže uvedené druhy bacilů, použité pro qPCR

Bakteriální druh	Označení primeru	Sekvence DNA (5' - 3')	Produkt PCR (bp)	T _{annealing} (°C)	t _{extension} (s)
<i>Bacillus</i> sp.	BAC-R	GCTGGTTAGAGCGCACGCCCTGATA	263	65	30
	BAC-F	CATCCACCGTGCGCCCTTTCTAAC			
<i>Bacillus cereus</i>	BCER-F	GAGAGTTCAATAAAAAGTATT	282	45	30
	BCER-R	CACTGTATTCTAGTTTTCAAAGAA			
<i>Bacillus licheniformis</i>	BLICH-F	GACAGGTGCGTTTGGATCTTG	300	50	30
	BLICH-R	CAGAAAATTCTTGTGAATGTCTAC			
<i>Bacillus subtilis</i>	BSUB-F	CAGAACGTTCCCTGCTCTTTTAG	284	50	30
	BSUB-R	GTTACTAATTGAATGTGATGTCTA			

T_{annealing} (°C)... teplota nasedání primerů,

T_{extension} (s)... doba potřebná k syntéze komplementárního řetězce DNA

vané DNA (C_{DNAmin} = 50 µg/ml). K amplifikaci byl použit CFX96 Real-Time detekční systém (Biorad, USA), termické cykly probíhaly následovně: (i) počáteční denaturace 95 °C po dobu 15 min (Hot start), následovalo (ii) 40 cyklů: 95 °C / 30 s, T_{annealing} (viz Tab. 1) / 30 s a 72 °C / t_{extension} (viz Tab. 1), ukončené (iii) analýzou HRM při 55 - 95 °C, se změnou 0,5 s / 0,5 °C (Němečková a kol., 2011; Safdar a Abastyantk, 2013). Velikost produktu qPCR byla následně zjištěna za pomoci horizontální elektroforézy (konstantní napětí 90 V, doba 1,5 h) v agarosovém gelu (1% hm. agarosa).

Spolehlivost identifikace byla v případě rodové a druhově specifické PCR, která byla realizována jako qPCR s použitím interkalačního barviva EvaGreen a analýzy křivky tání, vyjádřena jako shoda mezi křivkou tání referenčního vzorku a neznámého vzorku.

Identifikace bacilů metodou MALDI-TOF MS

Identifikace bacilů metodou MALDI-TOF MS byla provedena na Ústavu biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, pomocí přístroje Bruker Autoflex Speed a komerční databáze MALDI Biotyper 3.0 a metodami doporučenými výrobcem v závislosti na stavbě buněčné stěny (Anonymous, 2014). Při metodě přímé aplikace je mikrobiální kultura z jedné izolované kolonie nanesena na spoty kovové desky přímo, ve dvou paralelách o rozdílném množství nanesených buněk. Extrakční metoda využívá extrakci s použitím ethanolu a 70 % kyseliny mravenčí. Mikrobiální kultura o objemu cca 10 µl byla resuspendována ve 300 µl sterilní destilované vody (vortexování, 5 - 10 s), smíchána s 900 µl 98 % ethanolu (Lachner, ČR) a dvakrát odstředěna (15 000 g, 2 min); supernatant byl pokaždé pečlivě odstraněn. Po vysušení na vzduchu (10 min) byla peleta vortexováním resuspendována v 50 µl 70 % kyseliny mravenčí (Sigma Aldrich, SRN), důkladně promíchána s 50 µl acetonitrilu (Sigma Aldrich, SRN) a odstředěna (15 000 g, 2 min). Na spoty kovové desky byly ihned naneseny ve dvou paralelách 2 µl supernatantu. Proteinový standard Bruker Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics, SRN) byl nanášen v paralele o objemu 1 µl. Zaschlé vzorky (10 min), včetně proteinového standardu, byly překryty matricovým roztokem (1 µl) a ponechány krystalizovat (10 min). Matricový roztok je nasycený roztok (10 mg/ml)

α-kyano-4-hydroxy kyseliny skořicové (4-HCCA; Sigma Aldrich, USA) v 50 % acetonitrilu s 2,5 % kyseliny trifluoroctové (vše: Sigma-Aldrich, SRN; složení 1 ml: 250 µl sterilní destilované vody, 500 µl acetonitrilu, 250 µl 10 % kyseliny trifluoroctové), rozpuštěný za intenzivního třepání (10 min, 25 °C). Vizualizace proteinových profilů byla provedena programem mMass 5 (Strohalm a kol., 2010).

Spolehlivost metody MALDI-TOF MS byla vyjádřena v kategoriích spolehlivosti (viz Tab. 2), závislých na hodnotě skóre, tj. dekadického logaritmu míry shody získaného a referenčního proteinového profilu, které nabývá hodnot v rozmezí 0 (žádná shoda) až 3 (maximální shoda). Tato spolehlivost se odvíjí především od počtu proteinových profilů jednotlivých druhů, kmenově specifických, uvedených v používané databázi, a zahrnuje i optimalizaci procesu přípravy vzorku, včetně kultivačních podmínek (Croxatto a kol., 2012).

Výsledky a diskuse

V rámci této práce bylo pomocí metod PCR a MALDI TOF MS zkoumáno 36 izolátů z potravin, které se při předchozím morfologickém a biochemickém testování jeví jako zástupci rodu *Bacillus*. Získané výsledky jsou shrnuty v Tab. 2.

V případě metody MALDI-TOF MS bylo zjištěno, že standardně doporučovaná přímá metoda nanesení vzorků nemusí být dostatečně vhodná pro některé druhy bacilů, jako jsou např. *B. licheniformis* (výsledky nejsou v článku prezentovány). Získané výsledky vykazovaly výrazně nižší průměrné skóre spolehlivosti. Problémem pro standardně spolehlivé provedení přímé aplikace vzorku je kožovitý charakter a tvorba slizu u kolonií *B. licheniformis*. Identifikace byla proto provedena metodou extrakce ethanolem a 70 % kyselinou mravenčí.

Všechny izoláty, kromě jednoho - označeného jako 181, byly spolehlivě identifikovány jako zástupci rodu *Bacillus*, a to jak pomocí rodově specifické PCR, tak pomocí MALDI-TOF MS. Izolát 181 byl shodně oběma metodami určen jako nepatřící do rodu *Bacillus* a za pomoci metody MALDI-TOF MS byl identifikován jako *Lysinibacillus fusiformis*.

Na úrovni druhu se shodně podařilo oběma metodami spolehlivě identifikovat 22 izolátů (61,1 %); jednalo se o zástupce druhů *B. licheniformis* (19 izolátů) a *B. cereus* (2 izoláty). V 10 případech (27,8 %) nebylo možné rozhodnout o shodnosti, jelikož pro příslušné druhy bacilů nebyly k dispozici druhově specifické primery. Jednalo se o druh *B. pumilus*, u kterého byla identita na úrovni rodu potvrzena oběma metodami, ovšem na úrovni druhu pouze pomocí MALDI-TOF MS. U 5 izolátů (13,9 %) nebylo dosaženo shody ve druhové identifikaci oběma metodami, přestože byly k dispozici druhově specifické primery. V případě izolátů 203, 204 (*B. cereus*) a 192, 214, 348

Tab. 2 Identifikace bakteriálních izolátů pomocí PCR a MALDI TOF MS

Označení izolátu	Identifikace PCR	Identifikace MALDI-TOF MS		Výsledná shoda
		Druh	Spolehlivost	
41	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. pumilus</i>	+	ND
42	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. pumilus</i>	+	ND
43	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	++	A
44	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. pumilus</i>	++	ND
45	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	+++	A
47	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	+++	A
60	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. pumilus</i>	+	ND
62	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. pumilus</i>	++	ND
168	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	+++	A
169	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	+	A
172	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	+++	A
174	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	+++	A
181	není <i>Bacillus</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	+	A
192	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. licheniformis</i>	+++	N
203	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. cereus</i>	+++	N
204	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. cereus</i>	+++	N
207	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. pumilus</i>	+	ND
210	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	+++	A
211	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	+++	A
212	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	+++	A
213	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	+++	A
214	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. licheniformis</i>	+++	N
215	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	++	A
217	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. pumilus</i>	++	ND
310	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	+++	A
312	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	+++	A
316	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. pumilus</i>	+	ND
347	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	+	A
348	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. licheniformis</i>	++	N
349	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	++	A
350	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	++	A
351	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	++	A
352	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	+++	A
514	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. pumilus</i>	-	ND
823	<i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i>	+++	A
824	<i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i>	+++	A

+... pravděpodobná rodová identifikace, ++... spolehlivá rodová a pravděpodobná druhová identifikace, +++... spolehlivá rodová a druhová identifikace, A... ano, N... ne, ND... nelze posoudit vzhledem k dostupným metodám

(*B. licheniformis*) neodpovídala identifikace pomocí PCR spolehlivým výsledkům z MALDI-TOF MS, potvrzeným biochemickými a morfologickými vlastnostmi izolátů (typický vzhled kolonií, u *Bacillus cereus* schopnost hemolýzy a charakteristický růst na diagnosticko-selektivním médiu MYP případně identifikace biochemickou soupravou Microgen™ *Bacillus* ID, Microgen Products, VB). Druhově specifické primery pro *Bacillus licheniformis* tedy vykazovaly u 13,6 % těchto izolátů falešnou negativitu, u žádného izolátu však nevykazovaly falešnou pozitivitu. V případě druhově specifických primerů pro *Bacillus cereus* byla falešná negativita zjištěna u 50 % těchto izolátů, též však nikdy falešná pozitivita. Taktéž nebyla zjištěna falešná pozitivita u druhově specifických primerů

pro identifikaci *Bacillus subtilis*. Tuto skutečnost je možné vysvětlit tím, že i přes vysokou homologii 16S rRNA může být v některých případech obsažena mutace, která znemožní hybridizaci specifických primerů a následnou amplifikaci (Stackebrandt a Goebel, 1994; Stackebrandt a kol., 2002; Coenye a kol., 2005). Od r. 1980 se taxonomické řazení prokaryotních mikroorganismů řídí především primární strukturou genu kódujícího 16S rRNA (Stackebrandt a kol., 2002; Konstantinidis a Tiedje, 2005). Ovšem, u některých kmenů, např. u "divokých kmenů", může tento gen dosahovat variability mutace (SNP - Single Nucleotide Polymorphism) (Stackebrandt a Goebel, 1994; Stackebrandt a kol., 2002; Coenye a kol., 2005). Přesná identifikace mikroorganismů tedy stále vyžaduje, kromě znalosti genotypových parametrů, také i znalost fenotypových parametrů a potvrzení alespoň dvěma nezávislými metodami. Metoda MALDI-TOF MS nabízí rychlou a provozně nenáročnou identifikaci bakterií, ideální pro skrining velkého počtu izolátů. V případě nižší spolehlivosti identifikace bacilů je nutno výsledky ověřit vhodnými doplňkovými testy (např. testováním morfologických, fyziologických a biochemických charakteristik).

Závěr

Výsledky získané pomocí genotypové metody PCR, s využitím kombinací specifických primerů a v uspořádání systému qPCR, lze považovat za velmi přijatelné. Výhodou této metody je snadná interpretace získaných dat, relativní rychlost a snadnost použití, ovšem za předpokladu, že jsou k dispozici specifické primery.

Výsledky získané při použití fenotypové metody MALDI-TOF MS potvrdily vhodnost této metody pro identifikaci technologicky rizikových aerobních sporulujících bakterií *Bacillus* sp., izolovaných z mlékárenských výrobků a výrobního zařízení. Výhodou této metody je možnost rychlé analýzy relativně velkého počtu vzorků, nevýhodou je naopak vysoká pořizovací cena přístroje a zpoplatnění referenčních databází.

Poznatky z této práce mohou být aplikovatelné v potravinářské výrobní praxi, s využitím vhodných metod pro identifikaci zdravotně i technologicky rizikových aerobních sporulujících bakterií, s hlavním cílem zajistit bezpečnost, jakost a stabilitu vyráběných potravin.

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 mlékárenských výrobků vhodnými metodami aplikovatelnými v praxi.

Literatura je k dispozici u autorů.

Přijato do tisku: 13. 9. 2014

Lektorováno: 30. 9. 2014