

Nejsnáze byly odstraněny biofilmy kmenů *D. hansenii* N6 a 21Z, *R. mucilaginosa* E13 a *K. servazii*. Naopak nejodolnější biofilmy tvořila *Y. lipolytica* 10S.

Závěr

Pomocí metody barvení biofilmu krystalovou violetí na mikrotitračních destičkách bylo prokázáno, že izoláty kvasinek z mlékařských vzorků mohou mít v závislosti na konkrétním kmenu schopnost tvořit biofilmy. Jak planktonické buňky kvasinek, tak buňky biofilmu, jsou různým způsobem a různou měrou ovlivňovány používanými sanitačními roztoky. V závislosti na typu aktivní látky mohou mít některé roztoky silný antimikrobiální účinek, jiné mohou účinně odstraňovat již vytvořený biofilm a jiné mohou inhibovat jeho tvorbu, přičemž žádný z testovaných roztoků nepatřil k nejlepším ve všech těchto oblastech. Výzkum tvorby biofilmů a účinnosti sanitačních roztoků se ukázal jako zajímavé a komplexní téma a bude i nadále pokračovat.

Poděkování

Tato práce vznikla s finanční podporou Ministerstva zemědělství ČR, Národní agentury pro zemědělský výzkum, a to s institucionální podporou dle rozhodnutí RO1417 a s účelovou podporou na řešení projektu QK1710156 v programu ZEMĚ.

Literatura

- CORBO M.R., LANCIOTTI R., ALBENZIO M., SINIGAGLIA M. (2001): Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *Int. J. Food Microbiol.* 69, s. 147 - 152.
- DE FREITAS A.R., BAEZA L.C., IECHER FARIA M.G., DALBEN DOTA K.F., MARTÍNEZ P.G., SVIDZINSKI T.I.E. (2014): Yeasts isolated from nosocomial urinary infections: Antifungal susceptibility and biofilm production. *Revista Iberoamericana de Microbiología*, 31/2, s. 104 - 108.
- DJORDJEVIC D., WIEDMANN M., MCLANDSBOROUGH L.A. (2002): Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, s. 2950 - 2958.
- GARNIE L., VALENCE F., PAWTOWSKI A., AUHUSTSINAVA-GALERNE L., FROTTÉ N., BARONCELLI R., DENIEL F., COTON E., MOUNIER J. (2017): Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 241, s. 191 - 197.
- KUNOVÁ G., ROUBAL P., JAGLIČ Z., PAZLAROVÁ J., PECHAČOVÁ M., PEROUTKOVÁ J.: Monitorování účinnosti sanitace a prevalence některých mikroorganismů v mlékařských provozech. Kroměřížské mlékařské dny 2010, Kroměříž, Kromilk, a.s., s. 61 - 65.
- KVASNIČKOVÁ E. (2014): Problematika infekcí kloubních implantátů. *Bioprospect*, 24/4, s. 87.
- LIM E.S., LEE J.E., KIM J.S., KOO O.K. (2017): Isolation of indigenous bacteria from a cafeteria kitchen and their biofilm formation and disinfectant susceptibility. *LWT - Food Sci. & Technol.*, 77, s. 376 - 382.
- NĚMEČKOVÁ I., HANUŠOVÁ J., HAVLÍKOVÁ Š., KVASNIČKOVÁ E., KEJMAROVÁ M., KUNOVÁ G., ROUBAL P., PURKRTOVÁ S., JEBAVÁ I., KALHOTKA L., ŠUSTOVÁ K. (2012): Mikrobiální původci vad mlékařských výrobků. Kroměřížské mlékařské dny 2012, Kroměříž, Kromilk, a.s., s. 79 - 84.
- SALO S., WIRTANEN G. (2005): Disinfectant efficacy on foodborne spoilage yeast strains. *Food and Bioprocess Technology*, 83 (C4), s. 288 - 296.
- SUZUKI L.C., KATO I.T., PRATES R.A., SABINO C.P., YOSHIMURA T.M., SILVA T.O., RIBERIO M.S. (2017): Glucose modulates antimicrobial photodynamic inactivation of *Candida albicans* in biofilms. *Photodiag. & Photodynam. Therapy*, 17, s. 173 - 179.

- WESTALL S., FILTENBORG O. (1998): Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere. *Food Microbiol.* 15/2, s. 243 - 249.

Korespondující autor:

Ing. Irena Němečková, Ph.D.,
Výzkumný ústav mlékařský s.r.o.,
Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6, Česká republika,
nemeckova@milcom-as.cz.

Přijato do tisku: 13. 3. 2017

Lektorováno: 27. 3. 2017

METODY IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE POTRAVINÁŘSKÝCH PRŮMYSLOVÝCH IZOLÁTŮ *PSEUDOMONAS* SPP.

Eva Šviráková¹, Sabina Purkrťová¹, Irena Němečková²,
Renáta Karpíšková³, Markéta Jelínková⁴, Jürgen
Felsberg⁴

¹ Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

² Výzkumný ústav mlékařský, s. r. o.

³ Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

⁴ Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, v. v. i.

Methods for identification and characterization of food industrial isolates *Pseudomonas* spp.

Abstrakt

Tato práce se zabývala problematikou identifikace a charakterizace 10 neznámých potravinářských průmyslových izolátů *Pseudomonas* spp., včetně třech sbírkových kmenů *Pseudomonas* spp. Testované kmeny pseudomonád byly spolehlivě identifikovány na úroveň druhu za pomoci chemotaxonomické metody MALDI-TOF MS s krokem extrakce a molekulárně-biologické metody sekvenování genu pro 16S rRNA. Z kolekce 10 izolátů došlo při srovnání za pomoci obou použitých metod k identifikační shodě u 8 z nich. U testovaných pseudomonád byly po identifikaci zjišťovány následující charakteristiky: makroskopie a mikroskopie; růstová aktivita v Trypton-sójovém bujónu / agaru; tolerance k různým kultivačním teplotám (4 °C a 30 °C), k různým hodnotám pH kultivačního média (4,0; 5,0 a 7,0), k různým koncentracím NaCl v kultivačním médiu (0 a 8 %); resistance k vybraným antibiotikům (gentamicinu, 10 µg; ciprofloxacinu, 5 µg; colistinu, 10 µg; cefotaximu, 30 µg; meropenemu, 10 µg). Získané výsledky mohou být využity v potravinářském průmyslu, zejména mlékařském, při cíleném zajišťování zdravotní bezpečnosti a jakosti surovin a finálních výrobků s využitím moderních identifikačních metod, včetně fenotypových charakterizačních metod z oblasti klasické mikrobiologie.

Klíčová slova: *Pseudomonas* spp., technologicky rizikové bakterie, identifikace, MALDI-TOF MS, sekvenování genu pro 16S rRNA.

Abstract

This work was dedicated to issues of identification and characterization of 10 unknown food industrial isolates *Pseudomonas* spp., including three collection strains *Pseudomonas* spp. Tested pseudomonadas strains were reliably identified at the species level using the chemotaxonomic MALDI-TOF MS method with the extraction step and the molecularly-biological method of sequencing the 16S rRNA gene. Comparing the results of both used methods the identification correspondence occurred to 8 out of 10 tested isolates. In tested pseudomonadas were determined following characteristics after their identification: macroscopy and microscopy; the growth activity in Tryptic-soya broth / agar; the tolerance to different cultivation temperatures (4°C and 30°C), tolerance to different pH values of cultivation medium (4,0; 5,0 and 7,0), tolerance to different NaCl concentration in cultivation medium (0 and 8 %); the resistance to chosen antibiotics (gentamicin, 10 µg; ciprofloxacin, 5 µg; colistin, 10 µg; cefotaxim, 30 µg; meropenem, 10 µg). Obtained results can be used in the food industry, especially in dairy industry, at aimed ensuring health safety and quality of raw materials and final products taking advantage of modern identification methods, including phenotypic characterization methods from the classical microbiology area.

Key words: *Pseudomonas* spp., technologically hazardous bacteria, identification, MALDI-TOF MS, sequencing the 16S rRNA gene.

Úvod

Bakterie rodu *Pseudomonas* byly poprvé popsány v roce 1894 Walterem Migulou (Palleroni, 2010) a představují jednu z nejvíce různorodých a ubikvitních bakterií, jejichž druhy byly izolovány po celém světě z nejrůznějších prostředí (Peix a kol., 2009). Název rodu pochází z řeckého slova "pseudes", znamenající v překladu "zdaňlivý" nebo "falešný"; druhá část slova "monas" charakterizuje "jednotku" (Palleroni, 2010).

Taxonomie pseudomonád byla po mnoho let sporná. Jejich přesnější taxonomické zařazení bylo umožněno až zdokonalením technik pro charakterizaci a klasifikaci bakterií s cílem nastavit správnou fylogenetickou klasifikaci bakteriálního druhu (Peix a kol., 2009). Taxonomicky jsou pseudomonády řazeny následovně (sestupně): doména *Bacteria*, oddělení *Proteobacteria*, třída *Gammaproteobacteria*, řád *Pseudomonadales*, čeleď *Pseudomonadaceae*, rod *Pseudomonas* (Palleroni, 2008).

Bakterie rodu *Pseudomonas* se řadí mezi ubikvitní mikroorganismy a lze je nalézt v přírodním prostředí všech podnebných pásů Země, včetně různých potravinářských i klinických zdrojů. Pseudomonády byly v přírodních zdro-

jích izolovány z nejrůznějších rostlin (včetně jejich kořenové sféry) a hub, zemin, sedimentů a pouštních písků, ze zdrojů sladkovodních vod i z moří, z kontaminovaných rostlin a nemocných zvířat apod. (Peix a kol., 2009).

Pseudomonády se vyskytují i v celé řadě potravin, především v mléce a mléčných výrobcích, mase, rybách, syrovém ovoci a zelenině (Caldera a kol., 2015). Dokonce i u mléka a mléčných výrobků ošetřených technologií UHT byla zjištěna mikrobiální kontaminace pseudomonádami; konkrétně šlo o druhy *P. fragi*, *P. lundensis* a *P. fluorescens* (Marchand a kol., 2009). Jiné vzorky kontaminovaného a zkaženého polotučného a plnotučného mléka UHT původem z Taiwanu byly podrobeny mikrobiálnímu rozboru s výsledkem výskytu gramnegativní psychrotrofní mikroflóry složené z 67 % z bakterií rodu *Pseudomonas* a z 22 % z bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (Chen a kol., 2011). Literární studie (Carrascosa a kol., 2015) přinesla poznatky o původci modrého nedifundujícího pigmentu vyskytujícího se na povrchu čerstvých sýrů s využitím klasických mikrobiologických a molekulárně-biologických metod. Primárně byl producent pigmentu identifikován pomocí testu API (Analytical Profile Index test) jako druh *P. aeruginosa*, ovšem později bylo díky sekvenování úseku genu pro 16S rRNA potvrzeno, že šlo o druh *P. fluorescens*.

Bakterie rodu *Pseudomonas* se řadí mezi ubikvitní oportunistické patogeny spojované s mnoha nemocničními infekcemi, jako jsou např. zápal plic a septikémie (Hossain, 2014). Lze je nalézt i u pacientů trpících cystickou fibrózou, očními infekcemi, popáleninami a AIDS (Zago a Chugani, 2009). Pseudomonády se podílí také na řadě gastrointestinálních onemocnění lidí a zvířat. Některé studie uvedly, že druh *P. fluorescens* má silnou spojitost s chronickými nespecifickými střevními záněty známými např. jako Crohnova nemoc (Hossain, 2014). Přenos pseudomonád je ve výše uvedených případech spojován s požitím kontaminovaných potravin a vody.

Bakterie rodu *Pseudomonas* tvoří pravidelné, gramnegativní, nesporulující tyčinky obvykle o velikosti 0,5-1,0 µm (šířka) a 1,5-4,0 µm (délka). Jsou chemoorganotrofní s respiračním metabolismem, nefermentující, katalasa pozitivní. Některé druhy jsou fakultativně chemolitotrofní a využívají vodík nebo oxid uhelnatý jako zdroj energie. Molekulární kyslík je univerzálním akceptorem elektronů. Některé druhy jsou schopné denitrifikace a využívají dusičnany jako alternativní akceptory. Jsou striktně aerobní s výjimkou druhů, které jsou schopné denitrifikace. V DNA se obsah G+C pohybuje v rozmezí 58-70 % (Palleroni a Doudoroff, 1972).

Tolerance pseudomonád k teplotě je variabilní, protože jsou schopny růstu v širokém teplotním rozmezí od 4 °C až do 45 °C (Caldera a kol., 2015). Optimální hodnoty pH pro růst pseudomonád se pohybují v rozmezí 7,0-7,5 (Thomas a kol., 1994). Pseudomonády jsou schopné růst v prostředí o koncentraci chloridu sodného až 5 % (Egamberdieva a kol., 2015). Většina pseudomonád je přirozeně resistentních k penicilinu a jemu podobným antibiotikům.

Pseudomonády jsou citlivé k antibiotikům, jako jsou piperacilin, imipenem, tikarcilin nebo ciprofloxacín (Neidhardt a kol., 2004). Nejvyšší resistenci k antibiotikům vykazuje druh *P. aeruginosa*, který představuje významný lidský patogen (Hancock, 1998).

Mezi moderní metody identifikace pseudomonád se dají řadit různé molekulárně-biologické metody založené např. na principu sekvenování buď celého bakteriálního genomu nebo jen určitého úseku DNA/RNA, např. genu kódujícího 16S rRNA. Mezi další vhodné metody se dá zařadit metoda polymerázové řetězové reakce (PCR). Pseudomonády je možné identifikovat i za pomoci instrumentální metody hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpce a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry), která je považována za moderní, spolehlivou a rychlou metodu pro potvrzení identity mikroorganismů (Lindsay a kol., 2014). Dále je zde možné zmínit fenotypové rozlišující testy založené na vyhodnocení morfologických znaků, nutričních požadavků, rezistencí k různým druhům látek včetně antibiotik, teplotních tolerancí a na poměrně malém počtu biochemických (enzymových) testů (Hochel, 2009), např. testů API 20 E (bioMérieux, 2017).

Cílem této práce byla druhová identifikace technologicky rizikových bakterií *Pseudomonas* spp., izolovaných z nefermentovaných i fermentovaných mlékárenských surovin a výrobků, pomocí chemotaxonomické metody MALDI-TOF MS s krokem extrakce a molekulárně-biologické metody sekvenování genu kódujícího 16S rRNA. Identifikované pseudomonády byly podrobeny zjištění jejich morfologických znaků, růstové charakteristice, tolerancím k vnějším růstovým faktorům a resistenci k antibiotikům.

Materiál a metody

Izolace technologicky rizikových bakterií z prostředí mlékárenských závodů

Neznámé bakterie byly izolovány ze vzorků syrového mléka, mlék před zakysáním pro výrobu sýrů, tvarohu jemného a ze vzorku solného nálevu. Pro záchyt a kultivaci izolátů byla použita plotnová metoda s využitím růstu bakterií na různých agarových médiích. Pro růst bakterií byl před jejich identifikací použit Columbia agar s 5 % beraní krve (Bio-Rad, USA). Pro identifikaci bylo použito 10 neznámých průmyslových izolátů a tři sbírkové kmeny pseudomonád (viz Tab. 1).

Identifikace bakteriálních izolátů - pseudomonád pomocí metody MALDI-TOF MS

Za první metodu pro identifikaci neznámých bakteriálních izolátů - pseudomonád byla zvolena metoda MALDI-TOF MS, v modifikaci s krokem extrakce (Šviráková a kol., 2015). K identifikaci byl použit přístroj Bruker Autoflex Speeds s využitím komerční databáze

Tab. 1 Použité sbírkové a izolované kmeny pseudomonád

| Označení kmene / izolátu | Druh kmene / izolátu | Původ kmene / izolátu |
|--------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| CCM 2115 ^T | <i>P. fluorescens</i> | Výrobní tank (před filtrací) |
| CCM 7517 ^T | <i>P. brenneri</i> | Přírodní minerální voda (nápoj) |
| CCM 1974 ^T | <i>P. fragi</i> | Botanický ústav AV ČR, v. v. i. |
| 040 | <i>Pseudomonas</i> sp. | Syrové mléko |
| 021 | <i>Pseudomonas</i> sp. | Syrové mléko |
| 041 | <i>Pseudomonas</i> sp. | Syrové mléko |
| 10992-1 | <i>Pseudomonas</i> sp. | Solný nálev |
| 044 | <i>Pseudomonas</i> sp. | Syrové mléko |
| 047 | <i>Pseudomonas</i> sp. | Syrové mléko |
| 058 | <i>Pseudomonas</i> sp. | Syrové mléko |
| 45-AM-1A | <i>Pseudomonas</i> sp. | Mléko před zakysáním (výroba sýrů) |
| 68-GKCH-0 | <i>Pseudomonas</i> sp. | Mléko před zakysáním (výroba sýrů) |
| 45-GTKM6,5-1B | <i>Pseudomonas</i> sp. | Tvaroh jemný (spotřebitelské balení) |

MALDI Biotyper 3.0, spolu s metodami doporučenými výrobcem (Anonymous, 2017). Vizualizace proteinových profilů pseudomonád byla uskutečněna pomocí programu mMass 5 (Strohalm a kol., 2010).

Identifikace bakteriálních izolátů - pseudomonád pomocí metody sekvenování genu pro 16S rRNA

Druhou metodou pro identifikaci neznámých bakteriálních izolátů - pseudomonád byla zvolena metoda sekvenování genu pro 16S rRNA. Vlastnímu sekvenování předcházela izolace chromozomální DNA z testovaných pseudomonád pomocí komerční soupravy DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, SRN). Existuje řada univerzálních primerů pro amplifikaci celé 16S rRNA či jejich částí (výběr viz Tab. 2). Na základě izolované chromozomální DNA a pomocí univerzálních primerů 0028F a 1521R (viz Tab. 2) byly amplifikovány PCR fragmenty o délce přibližně 1 500 bp, kódující bakteriální 16S rRNA. Po přečištění na kolonkách MinElute (Qiagen, SRN) byly tyto fragmenty sekvenovány pomocí univerzálních sekvenačních primerů 0028F, 0534F, 1098R a 1521R (viz Tab. 2) a fluorescenčně značených dideoxy nukleotidových terminátorů podle Sangera (Sanger a kol., 1977). Produkty sekvenačních reakcí byly rozděleny a analyzovány na automatických sekvenátorech ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems). Sestavené a editované sekvence byly porovnány s databází GenBank pomocí programu BLAST (Altschul a kol., 1990).

Tab. 2 Univerzální amplifikační a sekvenační primery (NC-IUB, 1985)

| Primer | Sekvence (3 → 5) | Citační zdroj |
|---------------------|----------------------------|------------------------------------|
| 0028F ^{a)} | AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG | Edwards a kol. (1989) |
| 0534F ^{b)} | GCC-AGC-AGC-CGC-GGT-AA | Lane a kol. (1985) |
| 1115F ^{b)} | GYA-ACG-AGC-GCA-ACC-C | Tuner a kol. (1999) (modifikace) |
| 0514R ^{b)} | TTA-CCG-CGG-CTG-CTG-GCA-C | Lane a kol. (1985) |
| 1098R ^{b)} | GGG-TTG-CGC-TCG-TTR-C | Tuner a kol. (1999) (modifikace) |
| 1521R ^{a)} | AAG-GAG-GTG-ATC-CAR-CCG-CA | Edwards a kol. (1989) (modifikace) |

F... forward primer, R... reverse primer, ^{a)}... univerzální primer, ^{b)}... primer pro sekvenační reakci, Y... představuje C (cytosin) nebo T (thymín), R... představuje A (adenin) nebo G (guanin)

Sledování makroskopických znaků pseudomonád

Testované kmeny pseudomonád byly kultivovány na Trypton-sójovém agaru (agaru TSA) (Merck KGaA, SRN), při teplotě 30 °C, po dobu 72 h, aerobně. Následně byla vizuálně sledována morfologie narostlých kolonií kmenů na agaru.

Sledování mikroskopických znaků pseudomonád

Testované pseudomonády byly mikroskopicky vyšetřeny za pomoci optického USB video-mikroskopu DMBA 310 PC, s použitím imerzního oleje, při celkovém zvětšení 1000x. Velikost buněk byla měřena za pomoci okulárového měřítka a objektivového mikrometru.

Stanovení růstové aktivity pseudomonád

Růstová aktivita testovaných pseudomonád byla stanovována po jejich jednorázových kultivacích v Trypton-sójovém bujónu (bujónu TSB) (Merck KGaA, SRN) za optimálních růstových podmínek, tj. při teplotě 30 °C, po dobu 18 h, aerobně. Následně byly zjištěny počty pseudomonád (KTJ·ml⁻¹) plotnovou metodou na agaru TSA (technikou přelivu), při teplotě 30 °C, po dobu 72 h, aerobně. Zjištěné výsledky představovaly průměr ze dvou skutečných měření.

Stanovení tolerance pseudomonád k různým teplotám

Tolerance testovaných pseudomonád k různým růstovým teplotám byla zjišťována po jejich kultivacích v bujónu TSB, při teplotách 4 °C a 30 °C, po dobu 18 h, aerobně. Následně byly stanoveny počty pseudomonád (KTJ·ml⁻¹) plotnovou metodou na agaru TSA (technikou přelivu), při teplotách 4 °C a 30 °C, po dobu 72 h, aerobně. Zjištěné výsledky představovaly průměr ze dvou skutečných měření.

Stanovení tolerance pseudomonád k různému pH

Pro testování tolerance pseudomonád k různým hodnotám pH byly vybrány hodnoty 4,0; 5,0 a 7,0. Kmeny byly kultivovány v bujónu TSB, při teplotě 30 °C, po dobu 18 h, aerobně. Následně byly vyhodnoceny počty pseudomonád (KTJ·ml⁻¹) plotnovou metodou na agaru TSA (technikou přelivu), při teplotě 30 °C, po dobu 72 h, aerobně. Zjištěné výsledky představovaly průměr ze dvou skutečných měření.

Stanovení tolerance pseudomonád k různým koncentracím NaCl

Pro testování tolerance pseudomonád k různým koncentracím NaCl byly vybrány hodnoty 0 a 8 %. Kmeny byly kultivovány v bujónu TSB, při teplotě 30 °C, po dobu 18 h, aerobně. Následně byly vyhodnoceny počty pseudomonád plotnovou metodou na agaru TSA (technikou přelivu), při teplotě 30 °C, po dobu 72 h, aerobně. Zjištěné výsledky představovaly průměr ze dvou skutečných měření.

Stanovení rezistence pseudomonád k různým antibiotikům

Pro stanovení rezistence pseudomonád k vybraným antibiotikům byla použita Kirkby-Bauerova disková difúzní metoda (Liao a kol., 2008). Princip metody spočíval v difúzi testovaného antibiotika do Müller-Hintonova agaru (MHA) (Viamar International s. r. o., ČR) s naočkovaným konkrétním kmenem pseudomonády. Inkubace probíhala při teplotě 30 °C, po dobu 24 h, aerobně. V případě potlačení růstu konkrétního kmene daným antibiotikem došlo k vytvoření tzv. inhibiční zóny, vyhodnocené dle kritérií CLSI (Ústavu pro tvorbu pokynů a norem v laboratorní medicíně). Testovanými antibiotiky byl gentamicin (10 µg), ciprofloxacín (5 µg), kolistin (10 µg), cefotaxim (30 µg) a meropenem (10 µg). Výsledkem stanovení bylo rozdělení

Tab. 3 Porovnání identifikace pseudomonád pomocí metody MALDI-TOF MS a metody sekvenování genu pro 16S rRNA

| Označení kmene / izolátu | MALDI-TOF MS | | | Sekvenování 16S rRNA | | | Shoda identifikace kmene / izolátu při použití obou metod |
|--------------------------|-----------------------------|---------------------|----------------------|---|-------------------------------|---|---|
| | Identifikace | Identifikační skóre | Identifikační úroveň | Identifikace | Počet SN z celkového počtu SN | Shoda počtu SN z celkového počtu SN (%) | |
| CCM 2115 ^T | <i>P. fluorescens</i> | 2,481 | +++ | <i>P. fluorescens</i> | 960 / 960 | 100,0 | Ano |
| CCM 7517 ^T | <i>P. brenneri</i> | 2,468 | +++ | <i>P. brenneri</i> | 809 / 809 | 100,0 | Ano |
| CCM 1974 ^T | <i>P. fragi</i> | 2,473 | +++ | <i>P. fragi</i> | 889 / 889 | 100,0 | Ano |
| 040 | <i>P. koreensis</i> | 2,166 | ++ | <i>P. fluorescens</i> / <i>P. putida</i> | 922 / 925 | 99,7 | Ne |
| 021 | <i>P. lundensis</i> | 2,383 | +++ | <i>P. lundensis</i> | 954 / 956 | 99,8 | Ano |
| 041 | <i>P. koreensis</i> | 2,349 | +++ | <i>P. koreensis</i> | 961 / 963 | 99,8 | Ano |
| 10992-1 | <i>P. fluorescens</i> group | 2,082 | ++ | <i>P. marginalis</i> / <i>P. azotoformans</i> | 956 / 962 | 99,4 | Ne |
| 044 | <i>P. gessardii</i> | 2,151 | ++ | <i>P. gessardii</i> | 982 / 983 | 99,9 | Ano |
| 047 | <i>P. fluorescens</i> | 1,995 | + | <i>P. fluorescens</i> | 957 / 958 | 99,9 | Ano |
| 058 | <i>P. fragi</i> | 2,341 | +++ | <i>P. fragi</i> | 1000 / 1002 | 99,8 | Ano |
| 45-AM-1A | <i>P. brenneri</i> | 2,294 | ++ | <i>P. brenneri</i> | 1155 / 1158 | 99,7 | Ano |
| 68-GKCH-0 | <i>P. putida</i> | 2,480 | +++ | <i>P. putida</i> | 1080 / 1081 | 99,9 | Ano |
| 45-GTKM6,5-1B | <i>P. brenneri</i> | 2,462 | +++ | <i>P. brenneri</i> | 1147 / 1147 | 100,0 | Ano |

+ ... pravděpodobná rodová identifikace, ++... spolehlivá rodová a pravděpodobná druhová identifikace, +++... spolehlivá rodová i druhová identifikace; SN... sekvenovaných nukleotidů

pseudomonád do dvou skupin. Do první skupiny byly zařazeny kmeny citlivé k testovaným antibiotikům, do druhé skupiny pak kmeny rezistentní.

Výsledky a diskuse

Identifikace pseudomonád na úroveň druhu

Identifikace pseudomonád pomocí metody MALDI-TOF MS

Jako první metoda pro identifikaci neznámých průmyslových izolátů - pseudomonád byla použita instrumentální metoda MALDI-TOF MS. Výsledky těchto experimentů jsou uvedeny v Tab. 3. Na základě získaných výsledků bylo konstatováno, že metoda MALDI-TOF MS byla pro identifikaci potravinářských průmyslových izolátů pseudomonád na úroveň druhu vhodná. Literární zdroj (Lindsay a kol., 2014) uvádí, že metoda MALDI-TOF MS se ukázala být spolehlivá a rychlá pro identifikaci gramnegativních bakterií. Vhodnost této metody byla oceněna především v konzistentním stupni identifikace na úroveň druhu až z 97 %, a to bez ohledu na potravinovou matici či typ kultivačního média (Capocefalo a kol., 2015).

Identifikace pseudomonád pomocí metody sekvenování genu pro 16S rRNA

Jako druhá metoda pro identifikaci neznámých izolátů - pseudomonád byla použita molekulárně-biologická metoda sekvenování úseku genu pro 16S rRNA. Výsledky těchto experimentů jsou uvedeny v Tab. 3. Všechny kmeny pseudomonád byly touto metodou identifikovány na úroveň druhu. V Tab. 3 jsou uvedeny výsledky sekvenování genu pro 16S rRNA o délkách sekvenovaných úseků přibližně 800-1000 nukleotidů v závislosti na konkrétním kmeni pseudomonády. Obecně jsou za spolehlivou identifikaci považovány sekvenované úseky o délkách minimálně 750 nukleotidů. Výsledné sekvence 16S rRNA jednotlivých kmenů byly porovnány v programu MegAlign. Ten také vytvořil na základě podobnosti sekvencí dendrogram, z něhož je patrné rozdělení sledovaných kmenů do dvou skupin. Do první skupiny bylo zařazeno 5 kmenů *Pseudomonas* spp. (O40, O21, 10992-1, O44 a O47) a do druhé skupiny zbylých 8 kmenů *Pseudomonas* spp. (CCM 7517^T, CCM 7517^T, CCM 1974^T, O41, O58, 45-AM-1A, 68-GKCH-0 a 45-GTKM6,5-1B). Na základě uskutečněných experimentů bylo konstatováno, že metoda sekvenování genu pro 16S rRNA u pseudomonád představuje spolehlivou metodu poskytující 100% jednoznačné výsledky.

Srovnání identifikace pseudomonád pomocí metod MALDI-TOF MS a sekvenování genu pro 16S rRNA

V Tab. 3 jsou uvedeny výsledky srovnání identifikace pseudomonád pomocí metody MALDI-TOF MS a metody sekvenování genu pro 16S rRNA. Pomocí obou identifikačních metod bylo z celkem 10 neznámých izolátů shod-

ně identifikováno na úroveň druhu 8 izolátů *Pseudomonas* spp.: *P. koreensis* (O40 a O41), *P. lundensis* (O21), *P. gesardii* (O44), *P. fluorescens* (CCM 2115^T a O47), *P. fragi* (CCM 1974^T a O58), *P. brenneri* (CCM 7517^T a 45-GTKM6,5-1B) a *P. putida* (68-GKCH-0). Ke shodě nedošlo pouze v případě dvou izolátů. Kmen O40 byl pomocí metody MALDI-TOF MS identifikován jak *P. koreensis* a pomocí metody sekvenování genu pro 16S rRNA jako *P. fluorescens* nebo *P. putida*. Kmen 10992-1 byl pomocí metody MALDI-TOF MS identifikován jako kmen ze skupiny *P. fluorescens* group a pomocí metody sekvenování genu pro 16S rRNA jako *P. marginalis* nebo *P. azotoformans*. Na základě získaných výsledků bylo možné uvést, že obě použité metody byly pro identifikaci testovaných pseudomonád na úroveň druhu vhodné. Použité metody se vzájemně doplňovaly na základě svých pozitiv a odlišovaly na základě svých negativ. Mezi výhody moderní a relativně nové metody MALDI-TOF MS lze uvést její vysokou přesnost, aplikovatelnost pro široké spektrum bakterií/mikroorganismů, relativní rychlost (provedení samotné analýzy je uskutečněno v řádu minut), robustnost a ekonomickou efektivitu. Naopak, za nevýhodu této metody může být považován fakt, že v některých případech se vyšetření neobejde bez dalších konfirmačních vyšetření či použití jiné identifikační metody. Metoda sekvenování genu pro 16S rRNA je v současné době považována za jednu ze základních metod identifikace bakterií. U této metody lze jako nespornou výhodu uvést poskytnutí 100 % jednoznačných a spolehlivých výsledků, dále její relativní rychlost, neb je možné výsledky - o jakou bakterii/mikroorganismus se jedná - získat už během 24 h. Nevýhodou této metody je fakt, že u některých bakteriálních rodů je gen pro 16S rRNA fylogeneticky velmi podobný a počet záměn na úseku dlouhém 1500 nukleotidů je velmi malý, na základě čehož je pak obtížné odlišit od sebe jednotlivé varianty. Pro uživatele je při volbě identifikační metody nutno také zvážit, jaká je její dostupnost a finanční náročnost.

Základní charakterizace identifikovaných pseudomonád

Makroskopie pseudomonád

Testované pseudomonády byly kultivovány na agaru TSA a následně u nich byla vizuálně sledována morfologie narostlých kolonií. Kolonie pseudomonád měly běžovou barvu, místy až žlutě-běžovou či bíle-běžovou krémovou barvu. Byly lesklé, občas s lehce matným povrchem. Okraje kolonií byly hladké a pravidelné. Kolonie všech pseudomonád si byly makroskopicky relativně dosti podobné.

Mikroskopie pseudomonád

Testované pseudomonády byly mikroskopicky vyšetřeny za pomoci optického video-mikroskopu s integrovanou kamerou s využitím techniky předchozího barvení buněk podle Grama (ČSN EN ISO 7218, 2008). Všechny pozorované kmeny pseudomonád byly tvořeny menšími,

gramnegativními, nesporulujícími, tyčinkami o průměrné šířce 1,0-1,5 μm a délce 1,0-4,0 μm , což se shodovalo s literárními údaji (Palleri a Doudoroff, 1972).

Růstová aktivita pseudomonád

Růstová aktivita testovaných pseudomonád, tj. stanovení jejich počtu plotnovou metodou na agaru TSA, byla zjišťována po jejich předchozích jednorázových kultivacích v bujónu TSB za optimálních růstových podmínek. Všechny pseudomonády dosahovaly po kultivacích počtů v rozmezí řádů 10^8 - 10^9 KTJ·ml⁻¹. Výsledky představovaly průměr ze dvou skutečněných měření. Zjištěné vysoké počty buněk prokázaly, že pro růst pseudomonád byl použitý bujón TSB vhodný, a to v kombinaci s jejich optimální růstovou teplotou 30 °C a aerobními kultivačními podmínkami.

Tolerance pseudomonád k různým kultivačním teplotám

Tolerance testovaných pseudomonád ke zvoleným kultivačním teplotám 4 °C a 30 °C byla zjišťována po jejich jednorázových kultivacích v bujónu TSB s následným zjištěním jejich počtů (KTJ·ml⁻¹) plotnovou metodou na agaru TSA. Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou schopny růst v širokém rozmezí teplot od 4 °C až do 45 °C. Z toho důvodu byly pro zjištění tolerance pseudomonád k různým teplotám vybrány dvě teploty. Jednak jejich optimální teplota růstu 30 °C, jednak nízká kultivační teplota 4 °C mající vazbu na skladování potravinářských výrobků při chladírenských teplotách. Na základě experimentů bylo konstatováno, že všechny kmeny pseudomonád byly schopny růstu v bujónu TSB při obou teplotách 4 °C i 30 °C, což korelovalo s publikovanými literárními daty (Caldera a kol., 2015). Pokud byly pseudomonády kultivovány při nízké teplotě 4 °C, jejich počet se pohyboval

v rozmezí řádů 10^6 - 10^7 KTJ·ml⁻¹; tyto relativně vysoké počty byly shledány zajímavými, neb nebyly predikovány. Pokud byly pseudomonády kultivovány při optimální růstové teplotě 30 °C, jejich počet byl standardně vysoký a pohyboval se v rozmezí řádů 10^8 - 10^9 KTJ·ml⁻¹.

Tolerance pseudomonád k různým hodnotám pH

Pro testování tolerance pseudomonád k různým hodnotám pH byly zvoleny hodnoty 4,0; 5,0 a 7,0. Kultivace pseudomonád probíhaly v bujónu TSB o třech různých hodnotách pH a jejich počty byly následně zjištěny plotnovou metodou na agaru TSA. Z výsledků vyplynulo, že pseudomonády hůře snášely nižší hodnoty pH, a že v prostředí o pH 4,0 vůbec nerostly. V bujónu TSB o pH 5,0 se nižší počty pseudomonád pohybovaly v rozmezí řádů 10^4 - 10^6 KTJ·ml⁻¹. V bujónu TSB o pH 7,0 se vysoké počty pseudomonád pohybovaly v rozmezí řádů 10^8 - 10^9 KTJ·ml⁻¹. Pro případné budoucí experimenty se nabízí možnost testovat růst pseudomonád v prostředí o pH např. mezi hodnotami 4,0 a 5,0 z toho důvodu, že pseudomonády v prostředí o pH 4,0 už nerostly a v prostředí o pH 5,0 narůstaly do průměrně vysokých počtů. Literární údaje uvádějí, že optimální hodnoty pH pro růst bakterií rodu *Pseudomonas* se pohybují v rozmezí hodnot 7,0-7,5 (Thomas a kol., 1994).

Tolerance pseudomonád k různým koncentracím NaCl

Pro testování tolerance pseudomonád k různým koncentracím NaCl byly vybrány hodnoty 0 a 8 %. Pseudomonády byly kultivovány v bujónu TSB bez i s přidávkem NaCl a jejich počty byly následně zjištěny plotnovou metodou na agaru TSA. Bylo zjištěno, že pseudomonády rostly jak v bujónu TSB bez přidávku NaCl, tak i v bujónu TSB s přidávkem NaCl (8 %). V bujónu TSB bez NaCl se vyšší počty pseudomonád pohybovaly v rozmezí řádů 10^8 - 10^9 KTJ·ml⁻¹

a v bujónu TSB s NaCl o koncentraci 8 % dosahovaly nižších počtů v rozmezí řádů 10^5 - 10^6 KTJ·ml⁻¹. Literární zdroj (Egamberdieva a kol., 2015) uvádí, že bakterie rodu *Pseudomonas* rostou v prostředí o koncentraci až NaCl 5 %. Na základě naší zjištěných experimentů bylo zjištěno, že pseudomonády byly schopné růstu i v prostředí s NaCl o koncentraci 8 %. Tato skutečnost by mohla být vysvětlena mj. tím, že testované pseudomonády mohly být adaptovány na vyšší koncentrace NaCl, neboť byly izolovány z prostředí průmyslových mlékárenských závodů, z nichž některé vyrábějí výrobky s vyšším obsahem NaCl (např. sýry; solné nálevy). Do budoucna by bylo zajímavé testovat toleranci pseudomonád i k vyšším koncentracím NaCl (např. 10 % a 15 %).

Resistence pseudomonád k různým antibiotikům

Výsledky stanovení resistance pseudomonád k vybraným antibiotikům jsou uvedeny v Tab. 4

Tab. 4 Resistance / citlivost pseudomonád k různým antibiotikům

| Označení kmene / izolátu | Druh kmene / izolátu | Kmen / izolát citlivý k uvedenému antibiotiku | Kmen / izolát resistentní k uvedenému antibiotiku |
|--------------------------|---|---|---|
| CCM 2115 ^T | <i>P. fluorescens</i> | CN, CIP, CT | CTX, MEM |
| CCM 7517 ^T | <i>P. brenneri</i> | CN, CIP, CT | CTX, MEM |
| CCM 1974 ^T | <i>P. fragi</i> | CN, CIP, CT, CTX, MEM | - |
| 040 | <i>P. koreensis</i> / <i>P. fluorescens</i> / <i>P. putida</i> | CN, CIP, CT, MEM | CTX |
| 021 | <i>P. lundensis</i> | CN, CIP, CT, CTX, MEM | - |
| 041 | <i>P. koreensis</i> | CN, CIP, MEM | CTX |
| 10992-1 | <i>P. fluorescens</i> group / <i>P. marginalis</i> / <i>P. azotoformans</i> | CN, CIP | CT, CTX, MEM |
| 044 | <i>P. gessardii</i> | CN, CIP, CT | CTX, MEM |
| 047 | <i>P. fluorescens</i> | CN, CIP, CT, MEM | CTX |
| 058 | <i>P. fragi</i> | CN, CIP, CT, CTX, MEM | - |
| 45-AM-1A | <i>P. brenneri</i> | CN, CIP, CT | CTX, MEM |
| 68-GKCH-0 | <i>P. putida</i> | CN, CIP, CT | CTX, MEM |
| 45-GTKM6,5-1B | <i>P. brenneri</i> | CN, CIP, CT | CTX, MEM |

CN... gentamicin (10 μg), CIP... ciprofloxacin (5 μg), CT... kolistin (10 μg), CTX... cefotaxim (30 μg), MEM... meropenem (10 μg).

a byly vyhodnoceny podle protokolu CLSI z roku 2012 (CLSI, 2017). Z Tab. 4 vyplývá, že kmeny *P. fragi* (CCM 1974 T O58) a *P. lundensis* O21 byly citlivé ke všem testovaným antibiotikům. Kmeny *P. koreensis* (O40 a O41) a *P. fluorescens* group O47 byly citlivé ke čtyřem testovaným antibiotikům (gentamicinu, ciprofloxacinu, kolistinu a meropenemu) a zároveň byly resistantní k antibiotiku cefotaximu. Kmeny *P. fluorescens* CCM 2115 T, *P. brenneri* (CCM 7517 T, 45-AM-1A a 45-GTKM6,5-1B), *P. gessardii* O44 a *P. putida* 68-GKCH-0 byly citlivé ke třem antibiotikům (gentamicinu, ciprofloxacinu a kolistinu); resistantní byly ke dvěma antibiotikům (cefotaximu a meropenemu). Kmen *P. fluorescens* group 10992-1 se ukázal být kmenem nejvíce resistantním k testovaným antibiotikům; citlivý byl pouze ke dvěma antibiotikům (gentamicinu a ciprofloxacinu). Vědecká práce (Neidhardt a kol., 2004) poukázala na přirozenou resistenci pseudomonád k penicilinu a jemu podobným antibiotikům. Zároveň zde bylo uvedeno, že jsou pseudomonády naopak citlivé např. k ciprofloxacinu, což potvrdily i námi zjištěné experimentální výsledky.

Závěr

Závěrem je možné konstatovat, že pomocí obou použitých identifikačních metod, tj. metody MALDI-TOF MS s krokem extrakce a metody sekvenování genu pro 16S rRNA, došlo u 8 z 10 neznámých průmyslových izolátů *Pseudomonas* spp. ke shodné identifikaci na úroveň druhu.

Pro identifikaci pseudomonád byly obě metody shledány jako vhodné, a to díky doplňujícím se výhodám, navzdory existujícím nevýhodám. Mezi hlavní výhody metody MALDI-TOF MS patří relativní rychlost, vysoká přesnost, širokospektrální aplikovatelnost a robustnost. Nevýhodou je častá nutnost porovnání výsledků s jinou identifikační metodou - v našem případě s metodou sekvenování genu pro 16S rRNA. Mezi hlavní výhody metody sekvenování genu pro 16S rRNA patří především 100% jednoznačnost a spolehlivost výsledků, a také relativní rychlost. Naopak, k jejím negativům je možné řadit skutečnost, týkající se značné fylogenetické podobnosti genu kódujícího 16S rRNA u některých bakteriálních rodů, která omezuje odlišit od sebe jednotlivé varianty.

Výsledky této práce mohou být aplikovány při jednorázovém i screeningovém zajišťování zdravotní bezpečnosti, technologické nerizikovitosti a požadované jakosti vyráběných potravinářských surovin a výrobků, zejména mlékařských, při cílené eliminaci bakterií rodu *Pseudomonas*.

Poděkování

Tato práce byla podpořena Ministerstvem zemědělství, Národní agenturou pro zemědělský výzkum, projektem QJ1210300 - Systémy jistění kvality a bezpečnosti mlékařských výrobků vhodnými metodami aplikovatelnými v praxi (2012-2016, MZE/QJ), v programu QJ - Komplexní udržitelné systémy v zemědělství 2012-2018 "KUS" (2012-2018).

Literatura

- ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W., LIPMAN D.J.; 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **1990**, vol. 215, pp. 403-410.
- ANONYMOUS. MALDI Biotyper CA Systém Technické materiály společnosti Bruker Divisions. Staženo z <http://www.bruker.com/products/mass-spectrometryandseparations/maldi-biotyper-ca-system/service-support.html> (staženo dne 20. 3. 2017).
- BIOMÉRIEUX, INC. Identification system for *Enterobacteriaceae* and other non-fastidious Gram-negative rods. Api® 20 E, 07584D-GB-2002/10. Staženo z: <http://faculty.fiu.edu/~makemson /MCB3020Lab/API20eInstructions.pdf> (staženo dne 20. 3. 2017).
- CALDERA L., FRANZETTI L., VAN COILLIE E., DE VOS P., STRANGIER P., DE BLOCK J., HEYNDRIKX M. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. *Food Microbiology* **2015**, vol. 54, p. 142-153.
- CAPOCEFALO M., RIDLEY E. V., TRANFIELD E.Y., THOMPSON K.C. MALDI-TOF MS: a rapid microbiological confirmation technique for food and water analysis. In: *Molecular Microbial Diagnostic Methods* (Cook, D'Agostino, Thompson, eds.), p. 185-220. Academic Press, York, **2015**.
- CARRASCOSA C., MILLÁN R., JABER J.R., LUPIOLA P., DEL ROSARIO-QUINTANA C., MAURICIO C., SANJUÁN E. Blue pigment in fresh cheese produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control* **2015**, vol. 54, p. 95-102.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI Publishers 2012 Antimicrobial Susceptibility Testing Standards. Staženo z: <http://clsi.org/blog/2012/01/13/clsi-publishes-2012-antimicrobial-susceptibility-testing-standards/> (staženo dne 20. 3. 2017).
- ČSN EN ISO 7218 (560103). Mikrobiologie potravin a krmiv - Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení, p. 65. Praha: Český normalizační institut **2008**.
- EDWARDS U., ROGALL T., BÖCKER H., EMDE M., BÖTTGER E. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal DNA. *Nucleic Acids Research* **1989**, vol. 17, issue 19, pp. 7843-7853.
- EGAMBERDIEVA D., JABBOROVA D., HASHEM A. *Pseudomonas* induces salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*) and resistance to *Fusarium* root rot through the modulation of indole-3-acetic acid. *Saudi Journal of Biological Science* **2015**, vol. 22, issue 6, p. 773-779.
- HANCOCK R.E.W. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *The Infectious Diseases Society of America* **1998**, vol. 27, issue 1, p. 93-99.
- HOCHÉL I. Metody detekce a charakterizace *Campylobacter* sp. *Chemické listy* **2009**, vol. 103, p. 814-822.
- HOSSAIN Z. Bacteria: *Pseudomonas*. *Encyclopedia of Food Safety* **2014**, vol. 1, p. 490-500.
- CHEN T.R., WEI Q.K., CHEN Y.J. *Pseudomonas* spp. and *Hafnia alvei* growth in UHT milk at cold storage. *Food Control* **2011**, vol 22, issue 5, p. 697-701.
- LANE D.J., PACE B., OLSEN G.J., STAHL D.A., SOGIN M.L., PACE N.R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1985**, vol. 82, issue 20, pp. 6955-6959.
- LIAO C., KUNG H., HSU, G., LU P., LIU Y., CHEN C., SUN W., JANG T., CHIANG P. Activities of tigecycline against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Taiwan: broth microdilution method vs. disk diffusion method. *International Journal of Infectious Diseases* **2008**, vol. 12, issue 1, p. 406.
- LINDSAY D., HILL B., VENTER P. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry as a confirmation procedure in internationally recognised standard test methods for *Cronobacter sakazakii*. *International Dairy Journal* **2014**, vol. 39, issue 2, p. 276-283.
- MARCHAND S., VANDRIESCHE G., COOREVITS A., COUDIJZER K., DE JONGHE V., DEWETTINCK K., DE VOS P., DEVREESE B., HEYNDRIKX M., DE BLOCK J. Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. *International Journal of Food Microbiology* **2009**, vol. 133, issue 1-2, p. 68-77.
- NEIDHARDT F.C., CHAMPOUX J.J., DREW W.L., FLORDE J.J. Bacterial Processes. In: *Sherris Medical Microbiology an Introduction to Infectious Diseases* (Ryan K.J., Ray C.G., eds.), p. 42-43. The McGraw-Hill Companies, Inc, New York, **2004**.

- NC-IUB, Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences, Recommendations 1984. *Biochemical Journal* **1985**, vol. 229, pp. 281-286.
- PALLERONI N.J., DOUDOROFF M. Some properties and taxonomic subdivisions of the genus *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology* **1972**, vol. 10, p. 73-100.
- PALLERONI N.J. The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In: CORNELIS P. (ed.). *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Norfolk, **2008**, p. 1-19.
- PALLERONI N. J. The *Pseudomonas* story. *Environmental Microbiology* **2010**, vol. 12, issue 6, p. 1377-1383.
- PEIX A., RAMÍREZ-BAHENA M., VELÁZQUEZ E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution* **2009**, vol. 9, issue 6, p. 1132-1147.
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1977**, vol. 74, issue 12, p. 5463-5467.
- STROHALM M., KAVAN D., NOVÁK P., VOLNÝ M., HAVLÍČEK V. mMass 3: a cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. *Analytical Chemistry* **2010**, vol. 82, p. 4648-4651.
- ŠVIRÁKOVÁ E., MÜHLHANSOVÁ A., NĚMEČKOVÁ I., JUNKOVÁ P., PURKRTOVÁ S., JELÍNKOVÁ M., FELSBERG J. Identifikace technologicky rizikových bakterií rodu *Acinetobacter*. *Mlékařské listy - Zpravodaj* **2015**, vol. 150, p. XIV-XX.
- THOMAS K. L., LLOYD D., BODDY L. Effects of oxygen, pH and nitrate concentration on denitrification by *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiology Letters* **1994**, vol. 118, issue 1-2, p. 181-186.
- TURNER S., PRYER K.M., MIAO V.P.W., PALMER J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA. *Journal of Eucaryotic Microbiology* **1999**, vol. 46, issue 4, pp. 327-338.
- ZAGO A., CHUGANI S. *Pseudomonas*. In: SCHAECHTER, M. (ed.). *Encyclopedia of Microbiology*, 3rd ed., vol. 1, p. 245-326. Elsevier, San Diego, CA, USA, **2009**.

Korespondenční autor:

Ing. Eva Šviráková, Ph.D., Ústav konzervace potravin,
Fakulta potravinářské a biochemické technologie,
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Technická 3/5, 166 28 Praha 6 - Dejvice, Česká republika,
e-mail: eva.svirakova@vscht.cz

Přijato do tisku: 13. 3. 2017

Lektorováno: 1. 4. 2017

POKyny PRO AUTORY - MLÉKAŘSKÉ LISTY - ZPRAVODAJ

Všeobecné informace o časopise

Časopis je vydáván v tištěné podobě od r. 1990. Periodicita je 6x ročně. Časopis je řízen redakční radou. Zaměření. Časopis se orientuje na mlékárenství. Uveřejňuje výsledky výzkumu, informuje o novinkách v mlékárenství, o legislativě, o odborných konferencích a seminářích, uvádí zprávy o mlékárenském průmyslu ČR, o činnosti Českomoravského svazu mlékárenského (ČMSM) a Mezinárodní mlékařské federace (IDF) a jejího Národního komitétu a informace ze škol a mlékáren.

Cílem je informovat široké spektrum mlékárenských pracovníků ve výzkumu, odborných školách i praxi o novinkách a výsledcích z oboru.

Důležitým faktorem je rychlost a aktuálnost informací i finanční soběstačnost (časopis není sponzorován).

Zvýšený zájem výzkumných ústavů a vysokých škol o publikování odborných článků vyvolal potřebu rozšíření rozsahu časopisu a tedy i zvýšení nákladů. Z tohoto důvodu a možnosti zachování co nejkratších lhůt zveřejnění po recenzním řízení bylo od roku 2010 zavedeno zpoplatnění ve výši 500 Kč za publikování jedné standardní strany rukopisu.

Pro odborné články publikované v časopise *Mlékařské listy-zpravodaj* v rubrice Věda, výzkum bylo zavedeno od č. 75 v r. 2003 recenzní řízení. V roce 2008 byl časopis zařazen Radou vlády pro vědu a výzkum do seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik vydávaných v ČR.

Časopis je citován v mezinárodní databázi Food Science and Technology Abstracts a v České zemědělské a potravinářské bibliografii.

Pokyny pro autory recenzovaných článků

Redakce přijímá po předchozí dohodě články, které odpovídají odbornému profilu časopisu v češtině (eventuelně ve slovenštině) v elektronické podobě. Příspěvek nemůže být ve stejné formě předán k publikování v jiném časopise.

Zaslané práce jsou posuzovány redakční radou a poté předány k vyjádření oponentů. Na základě oponentského posudku rozhodne redakce, zda článek bude vydán v původním znění nebo předán autorům k doplnění, přepracování, eventuelně k vyřazení.

Prioritou zaměření odborných článků je prezentace výsledků výzkumu, které by mohly mít význam pro mlékárenský průmysl.

Zpracování rukopisu

Články mají standardní členění: název, jména autorů (pracoviště), vlastní text, seznam literatury.

Název by měl být stručný a výstižný (30 - 60 znaků včetně mezer), v češtině a angličtině.

Souhrn (abstrakt) uvedený v češtině a angličtině (10 - 12 řádků). **Klíčová slova** nutná uvést v češtině a angličtině.

Vlastní text by měl vzhledem k charakteru odborné práce obsahovat (obvyklé členění): úvod, materiál a metodiku, vlastní výsledky a závěr. Text je zapotřebí rozdělit mezititulky, odstavce týkající se materiálu a metodiky je potřeba přiměřeně zredukovat.

Aby byl text srozumitelný (i pro širší okruh čtenářů) je třeba respektovat maximální stručnost a jasnost sdělení.

Není přípustná dokumentace stejných výsledků jak v tabulkách, tak i v grafech. **Jména autorů** je nutné uvádět celá, včetně pracoviště.

Seznam literatury se řídí normou ČSN ISO 690 a ČSN 690-2 a Pokyny pro citování v časopise *Mlékařské listy - zpravodaj*. Sestavuje se abecedně a redakce doporučuje maximální počet 15 vybraných nejdůležitějších literárních odkazů ve formě úplných citací.

Technické požadavky

Rozsah článku je maximálně 8 stran (15 000 znaků včetně mezer) standardního rukopisu včetně obrázků, grafů, tabulek a seznamu literatury. Vyšší rozsah lze domluvit s redakcí individuálně v případě, že text je klíčový pro mlékárenský obor.

Nejvhodnější je text poslat v textovém editoru MS Word s minimálním formátováním. Nepoužívat různé druhy písma a podbarvení. Článek je možné v přiměřené míře doplnit tabulkami, grafy, schémata. Obrázky a fotky je třeba dodat v tiskové kvalitě (minimálně 300 Dpi).

Grafy, obrázky a schémata je třeba zaslat samostatně v původním formátu (např. Excelu), obrázky jako samostatné soubory (nikoliv vložené do textu). U fotografií je třeba uvést jméno autora. Rovněž velké tabulky nelze prakticky otisknout.

Vnitřek časopisu je černobílý s možností přidání jedné modré specifické barvy v různých odstínech. Proto barevné grafy nelze reprodukovat.

Redakce si vyhrazuje právo při nedodržení pokynů příspěvek vrátit a až po úpravě zařadit do oponentního řízení.

Datum: 20. ledna 2012

Kontakt: Redakce časopisu *Mlékařské listy*

VÚM, Ke Dvoru 12 a, 160 00 Praha 6 - Vokovice, Tel. 235 354 551-2, e-mail: mlekarke.listy@milcom-as.cz