

- HUA, S.S.T., BECK, J.J., SARREAL, S.B.L., GEE, W. (2014) The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin Research*, s. 1–9.
- JACQUES, N., SARILAR, V., URIEN, C., LOPES, M. R., MORAIS, C. G., UETA-NABARO, A. P. T., (2016): Three novel ascomycetous yeast species of the Kazachstaniacade, *Kazachstania saulgeensis* sp. nov., *Kazachstania serrabonitensis* sp. nov. and *Kazachstania australis* sp. nov. reassignment of *Candida humilis* to *Kazachstania humilis* f.a. comb. nov. and *Candida pseudohumilis* to *Kazachstania pseudohumilis* f.a. comb. nov. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 66, s. 5192–5200.
- LEPŠ, J. A ŠMILAUER, P. (2016): Biostatistika. Nakladatelství Jihočeské university. s.414.
- KAVKOVÁ, M., CIHLÁŘ, J.; DRÁB, V., BÁR, L. (2021): Differentiation of *Penicillium roqueforti* from Closely Related Species Contaminating, Cheeses and Dairy Environment. *Fermentation* 7, s.1–16.
- KAVKOVÁ, M., CIHLÁŘ, J., DRÁB, V.; BAZALOVÁ, O., DLOUHÁ, Z. (2022): The Interactions among Isolates of *Lactiplantibacillus plantarum* and Dairy Yeast Contaminants: Towards Biocontrol Applications. *Fermentation*, 8, s.1–14.
- KOWALSKA, J., KRZYMIŃSKA, J., TYBURSKI, J. (2022): Yeasts as a Potential Biological Agent in Plant Disease Protection and Yield Improvement-A Short Review. *Agriculture*, 12, s. 1–15.
- KURTZMAN, C. P. (2014): Use of gene sequence analyses and genome comparison for yeast systematics. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*, 64, s. 325–332.
- LANE, M.M., MORRISSEY J.P. (2010): *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal biology reviews*, 24, s. 17–26.
- SAMSON, R. A., HOUBRAKEN, J., THRANE, U., FRISVAD, J.C; ANDERSEN, B. (2010): *Food and Indoor Fungi*; CBS KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht, 390 s. ISBN 978-90-70351-82-3.
- MATEVOSYAN, L., BAZUKYAN, I., TRCHOUNIAN, A. (2020): Antifungal and antibacterial effects of newly created lactic acid bacteria associations depending on cultivation media and duration of cultivation. *BMC microbiology*, 102 (19) s.1–8.
- NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 1129/2011 ze dne 11. listopadu 2011, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinářských přídatných látek Unie (2011): Úřední věstník Evropské unie, L295/1.
- ORO, L., FELIZIANI, E., CIANI, M., ROMANAZZI, G., COMITINI, F. (2018): Volatile organic compounds from *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries. *International Journal of Food Microbiology*, 265, s. 18–22.
- PEREZ, M.F., CONTRERAS, L., GARNICA, N.M., FERNANDEZ-ZENOFF, M.V., FAROAS, M.E., SEPULVEDA, M. (2016): Native Killer Yeasts as Biocontrol Agents of Postharvest Fungal Diseases in Lemons. *PLoS ONE* 11(10): e0165590.
- SCHOCH, C. L., SEIFERT, K. A., HUHDORF, S., ROBERT, V., SPOUGE, J. L., LEVESQUE, C. A., CHEN, W. (2012): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, s. 6241–6246.
- STIELOW J. B., LÉVESQUE C. A., SEIFERT K. A., MEYER W., IRINY L., SMITS D., RENFURM R., VERKLEY G. J., GROENEWALD M., CHADULI D., LOMASCOLO A., WELTI S., LESAGE-MEESSEN L., FAVEL A., AL-HATMI A. M., DAMM U., YILMAZ N., HOUBRAKEN J., LOMBARD L., QUAEDVLIEG W., BINDER M., VAAS L. A., VU D., YURKOV A., BEGEROW D., ROEHL O., GUERREIRO M., FONSECA A., SAMERPITAK K., VAN DIPENINGEN A. D., DOLATABADI S., MORENO L. F., CASAREGOLA S., MALLETT S., JACQUES N., ROSCINI L., EGIDI E., BIZET C., GARCIA-HERMOSO D., MARTÍN M. P., DENG S., GROENEWALD J. Z., BOEKHOUT T., DE BEER Z. W., BARNES I., DUONG T. A., WINGFIELD M. J., DE HOOG G. S., CROUS P. W., LEWIS C. T., HAMBLETON S., MOUSSA T. A., AL-ZAHRANI H. S., ALMAGHRABI O. A., LOUIS-SEIZE G., ASSABGUI R., MCCORMICK W., OMER G., DUKIK K., CARDINALI G., EBERHARDT U., DE VRIES M., ROBERT V. (2015): One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia*, 35, 242–263.
- SALAS, M.L., MOURNIER, J., VALENCE, F., COTON, M., THIERRY, A. A COTON, E. (2017): Antifungal microbial agents for food biopreservation – a review. *Microorganisms*, 37 (5), s. 1–29.
- SYROKOU, M.K., PARAMITHIOTIS, S., KANAKIS, C.D., PAPADOPOULOS, G.K., TARANTILIS, P.A., SKANDAMIS, P.N., BOSNEA, L., MATARAGAS, M., DROSINOS, E.H. (2022): Effect of Dough-Related Parameters on the Antimold Activity of *Wickerhamomyces anomalus* Strains and Mold-Free Shelf Life of Bread. *Applied Science*, 12, s.1–12.
- TAY, S-T., LIM, S-L., TAN H-W. (2014): Growth inhibition of *Candida* species by *Wickerhamomyces anomalus* mycocin and a lactone compound of *Aureobasidium pullulans*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 439 (14), s.1–11.
- UDOVICKI, B., AUDENAERT, K., DE SAEGER, S., AND RAJKOVIC, A. (2018): Overview on the Mycotoxins incidence in Serbia in the period 2004-2016. *Toxins*, 10, s. 279.
- URIEN, C., LEGRAND, J., MONTALENT, P., CASAREGOLA, S. A. SICARD, D. (2019): Fungal Species Diversity in French Bread Sourdoughs Made of Organic Wheat Flour. *Frontiers in Microbiology*, 201, s. 1–17.
- VIEIRA, J. (2022): Susceptibility of airborne fungi to the mycocins produced by *Wickerhamomyces anomalus*. *Brazilian Journal of Health Review*, 5, s.19824–19829.
- WANG, Y., WU, J, L.V. M., SHAO, Z., HUNGWE, M., WANG, J., BAI, X., XIE, J., WANG, Y., GENG, W. (2021): Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications, Food Industry. *Frontiers in Bioengineering. Biotechnology*, 9 s.1–19.

Korespondující autor: Ing. Miloslava Kavková, Ph.D.
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,
160 00 Praha 6, e-mail: m.kavkova@vum-tabor.cz,

Přijato dne: 7. 11. 2022
Lektorováno: 27. 11. 2022

MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÉ METODY ZALOŽENÉ NA PCR VYUŽITELNÉ PRO DETEKCI A IDENTIFIKACI MIKROORGA- NISMŮ V MLÉKÁRENSTVÍ

Jaromír Cihlář, Olga Bazalová

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Tábor

PCR-based molecular-genetic methods
suitable for the detection and identification
of microorganisms in the dairy industry

Abstrakt

Identifikace, klasifikace a detekce mikrobiálních organismů je nedílnou součástí úkonů prováděných ve sbírkách, i při výzkumu v potravinářské mikrobiologii. Rychlá detekce a identifikace nežádoucích mikroorganismů, nebo kontrola čistoty používaných mikrobiálních kultur, je zásadní pro udržení kvality a bezpečnosti potravin. Tradiční metody v potravinářské mikrobiologii jsou závislé na kultivaci studovaných

mikroorganismů. Jejich velkou nevýhodou je zejména množství času potřebného pro detekci a identifikaci mikroorganismů v testovaném materiálu, což může být problém obzvláště u potravin s krátkou dobou trvanlivosti, jakými jsou například mléčné výrobky. Proto se při detekci a identifikaci mikroorganismů stále častěji uplatňují molekulárně-genetické metody, z nichž mnohé, v porovnání s tradičními metodami, umožňují rychlou detekci, identifikaci, nebo kontrolu čistoty mikroorganismů v potravinářství. Toto pojednání shrnuje poznatky z oblasti molekulární biologie, konkrétně metod založených na polymerázové řetězové reakci (PCR), vhodných nejen pro rutinní detekci a identifikaci mikroorganismů, ale i pokročilejší taxonomii. Dále se věnuje možnostem a předpokladům jejich využití v mikrobiologických laboratořích mlékárenských provozů.

Klíčová slova: mikrobiální organismy, detekce, identifikace, molekulární genetika, PCR

Abstract

Identification and typing of microbial organisms is an integral part of operations carried out in culture collections and during research in food microbiology laboratories. Rapid detection of contaminating microorganisms, or purity check of the microbial cultures used, is essential for maintaining the quality and safety of food. Traditional methods in food microbiology are dependent on the cultivation of the studied microorganisms. Their big disadvantage is the amount of time required for the detection and identification of microorganisms in the tested material. This can be a problem especially for foods with a short shelf life, such as dairy products. That is why molecular-genetic methods are increasingly being used in the detection and identification of microorganisms, many of which enable rapid detection, identification, or control of the purity of microorganisms in the food industry. This treatise summarizes findings from the field of molecular biology, specifically methods based on the polymerase chain reaction (PCR), suitable not only for routine detection and identification of microorganisms, but also for more advanced taxonomy. The possibilities and prerequisites for their use in microbiological laboratories of dairy operations are discussed.

Key words: microbial organisms, detection, identification, molecular genetics, PCR

Úvod

S mikroorganismy – bakteriemi, kvasinkami a plísněmi – se setkáváme téměř ve všech aspektech našeho života. Jsou známy jak pro své prospěšné, tak i nepříznivé až škodlivé vlastnosti. Proto je rychlá detekce a přesná identifikace a klasifikace mikroorganismů nezbytná v mnoha odvětvích aplikovaného výzkumu a průmyslu, počínaje klinickým prostředím, až po produkci potravin. Dlouhou dobu byly identifikace a klasifikace mikrobiálních

organismů prováděny výhradně na základě fenotypových, nebo biochemických vlastností zkoumaných mikroorganismů. Tato metodika však často vedla k nejistotám, neboť klasické mikrobiologické metody stanovení závisí především na správně nastavených podmínkách kultivace mikroorganismů. Nevhodné kultivační podmínky mohou vést k nepřesnosti ve fenotypové speciaci mikrobiálních kmenů. Z výše uvedeného je patrné, že standardní mikrobiologické postupy jsou velmi časově náročné a na personál provádějící identifikaci kladou vysoké odborné nároky. Fenotypové vlastnosti, ve smyslu morfologických znaků mikroorganismů, lze dále studovat pomocí mikroskopických technik. Základní metody optické mikroskopie umožňují, za předpokladu, že jsou prováděny zkušenými taxonomy, relativně rychlé a přesné určení mikroorganismů, jedná-li se například o vláknité houby. V případě bakterií a kvasinek je pak správné druhové určení často naprosto nemožné. Dalším problémem identifikace mikroorganismů čistě na základě fenotypových, nebo morfologických vlastností spočívá v tom, že stejné, nebo velmi podobné vlastnosti/morfologické znaky mohou nést organismy, které jsou geneticky jen velmi málo podobné. Bylo prokázáno, že klasické metody identifikace a klasifikace mikroorganismů jsou pro zcela správné taxonomické zařazení častokrát nedostatečné (Donelli a kol., 2013) a že je potřebné pozorované vlastnosti dávat do kontextu s genetickou výbavou zkoumaného vzorku.

Koncem dvacátého století začala mikrobiologie těžit z prohlubujících se znalostí v oboru molekulární genetiky. Byť mají klasické metody v mikrobiologických laboratořích stále své pevné místo, molekulárně-genetické techniky nám otevřely do té doby netušené možnosti detekce či identifikace mikroorganismů, a to včetně těch nekultivovatelných. Doposud bylo vyvinuto množství molekulárně-genetických metod vhodných pro detekci, identifikaci a typizaci mikrobiálních organismů. Mnoho z těchto metod, jako např. dříve oblíbená ribotypizace, či gelová elektroforéza v pulzním poli (Olive a Been, 1999), již zastaralo a bylo nahrazeno vhodnějšími, rychlejšími, nebo levnějšími metodami. Většina z nich je založena na některé z variant analýzy mikrobiální deoxyribonukleové kyseliny (DNA) amplifikované pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), různými metodami mapování polymorfismů v homologních sekvencích DNA počínaje a přímým sekvenováním PCR produktů konce (Olive a Been, 1999). Následuje přehled používaných metod analýzy DNA, z nichž každá, ze své podstaty, má své výhody i nevýhody, a tudíž je vhodná pro různá využití, ať již k detekci, identifikaci, nebo k typizaci mikroorganismů v kultuře, nebo zkoumaném vzorku (Sharma a kol., 2020).

Metody analyzující polymorfismy fragmentů DNA

Jednou z prvních čteně užívaných metod je PCR-RFLP (z anglického Restriction Fragment Length Polymorphism), při které restriční enzymy působí na vybra-

nou oblast DNA (většinou část určitého genu), která je v prvním kroku amplifikovaná pomocí PCR. Vzniklé fragmenty jsou následně odděleny elektroforézou na agarózovém gelu a obarveny vhodným interkalačním barvivem. Identifikace zkoumaných mikroorganismů ve vzorku poté spočívá ve vizualizaci a analýze profilu fragmentů/proužků na gelu, které jsou unikátní pro každý mikrobiální kmen, kdy blízké příbuzné kmeny mají profily fragmentů identické nebo velmi podobné, a naopak rozdíly v profilech fragmentů indikují genetickou diverzitu studovaných kmenů. I přes svá negativa spočívající v obtížné interpretovatelnosti generovaných profilů (Olive a Been, 1999) může být tato metoda úspěšně využívána k identifikaci různorodých mikroorganismů (Baffoni a kol., 2013; Diguta a kol., 2011, Pramunaditya a kol., 2022).

Podobnou metodou je AFLP (z anglického Amplified Fragment Length Polymorphism), která detekuje polymorfismy v délce amplifikovaných fragmentů. Na rozdíl od předchozí metody jsou restriční enzymy použity k fragmentaci celé genomové DNA (gDNA) a vzniklé fragmenty jsou pak enzymaticky spojovány se speciálními adaptérovými molekulami DNA. Následuje PCR amplifikace komplexů restričních fragmentů a adaptéru za použití primerů, které jsou komplementární k adaptorovým sekvencím. Díky tomu se amplifikují pouze některé podskupiny restričních fragmentů obsahující komplementární adaptér. K analýze AFLP pak znovu dochází pomocí gelové elektroforézy, čímž je získán profil fragmentů DNA z jediné mikrobiální genomové DNA (Sharma a kol., 2020). Díky adaptérům a k nim komplementárním primerům má tato metoda oproti RFLP výhodu v tom, že ji lze provést i bez předchozí znalosti jakékoliv genomové sekvence studovaného organismu. AFLP lze použít k posouzení genetické diverzity v rámci druhu (typizace) nebo mezi blízkými příbuznými druhy (Paun a Schönswetter, 2012). Proto byla metoda AFLP efektivně využívána pro genotypizaci mikroorganismů patřících do všech tří domén života (de Barros Lopes a kol., 1999, Singh a kol., 2009).

Další metodou identifikace a typizace je RAPD-PCR (z anglického Random amplified polymorphic DNA), při které jsou amplifikovány úseky polymorfnní DNA, které jsou přítomné v genomech všech organismů. Na rozdíl od výše popsanych metod využívá RAPD-PCR krátké primery (8–12 nukleotidů dlouhé) s libovolnými sekvencemi, které se nespecificky vážou na templátovou DNA. Ty následně amplifikují náhodné oblasti templátové DNA za vzniku jedinečného profilu PCR amplikonů. Srovnání vzniklých profilů pak slouží k identifikaci studovaných organismů (Sharma a kol., 2020). Jako templát pro RAPD-PCR může být použita jak izolovaná gDNA, tak i mikrobiální lyzáty, kdy odpadá nutnost izolace gDNA. RAPD-PCR, stejně jako AFLP, nevyžaduje žádnou předchozí znalost sekvence genomu cílového mikroorganismu (Sharma a kol., 2020) a lze ji použít k identifikaci i typizaci rozmanitých mikrobiálních druhů (Abdollahniya a kol., 2018; Reale a kol.,

2013). Vzhledem k použití krátkých náhodných sekvencí primerů a možnosti jejich nespecifického nasedání na templátovou gDNA, má však tato metoda obtížnou reprodukovatelnost výsledků (Olive a Been, 1999).

Řešení výše popsaného problému s reprodukovatelností výsledků do určité míry nabízí Rep-PCR. Tato metoda je založena na přítomnosti velkého množství nekódujících, opakujících se sekvencí DNA v genomech bakterií, archaeí a eukaryot. Rep-PCR využívá speciální primery zacílené na několik těchto opakujících se oblastí a PCR k vytvoření jedinečných DNA profilů jednotlivých mikrobiálních kmenů (Sharma a kol., 2020). Krátká doba analýzy, nízké nároky na vstupní množství DNA určené k analýze a relativně vysoká rozlišovací schopnost metody z ní dělá účinný nástroj pro studium mikrobiální diverzity na druhové až vnitrodruhové úrovni (Gevers a kol., 2001). Mezilaboratorní reprodukovatelnost však může být různou měrou ovlivněna například způsobem extrakce DNA, používanými PCR reagensy, či zvolenými podmínkami gelové elektroforézy (Sharma a kol., 2020). Je tedy potřeba mít tyto aspekty na zřeteli.

Poslední relativně často využívanou metodou analýzy variabilních úseků DNA je DGGE (z anglického Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Tato metoda je založena na separaci DNA fragmentů podobných, nebo stejných délek v denaturačním gradientu na polyakrylamidovém gelu, který obsahuje močovinu, nebo formamid. K analýze se používají hypervariabilní oblasti, nejčastěji v rámci genů pro rRNA, na které je během PCR amplifikace navázána 30–50 bp dlouhá oblast obsahující pouze GC nukleotidy (tak zvaná GC-svorka). Výsledné PCR produkty jsou denaturovány na základě jejich sekvencí, protože na GC bohatý konec není denaturován. DGGE byla použita a ukázala se jako vhodná metoda pro analýzy různých mikrobiálních komunit (Hong a kol., 2016). Vzhledem k tomu, že předchozí kultivace studovaných mikroorganismů není nutná, má velkou výhodu oproti řadě jiných metod. Limitujícím faktorem DGGE je však špatná detekce mikroorganismů, které jsou v komunitě přítomny v nízké koncentraci, a naopak v některých případech může dojít k nadhodnocení mikrobiální diverzity ve zkoumaném vzorku v důsledku přítomnosti bakterií s heterogenními rRNA operony (Sharma a kol., 2020).

Metody analyzující specifické oblasti DNA

Během posledního desetiletí hledali vědci rychlejší a účinnější prostředky mikrobiální detekce a identifikace. Tu umožňují metody využívající kapacitu PCR v reálném čase (Real Time). RT-PCR oproti konvenčním PCR metodám poskytuje mnoho výhod, jako je vyšší citlivost, přesnost a schopnost monitorovat amplifikaci DNA v reálném čase na základě intenzity fluorescence. Tím odpadá nutnost provádění následných detekčních technik (např. elektroforéza na agarózovém gelu, hybridizace a podobně). RT-PCR může být také kvantitativní (Lin a Gänzle, 2014) nebo semikvantitativní za použití hodnoty C_q (číslo cyklu,

při kterém intenzita fluorescence stoupá nad detekovatelnou úroveň). Metoda je použitelná na různé druhy vzorků, byla například použita pro identifikaci bakterií v mléce, které jsou obtížně kultivovatelné (Taponen a kol., 2009).

V posledních letech je také stále oblíbenější metoda detekce jednotlivých druhů, nebo celých skupin mikroorganismů ve vzorcích na základě analýzy křivky tání – High Resolution Melting Analysis (HRM). Při této metodě dochází k postupnému zahřívání a tavení dvoušroubovice DNA, čímž se z ní uvolňuje předem navázané fluorescenční barvivo a dochází k poklesu fluorescence, která je monitorována příslušným přístrojem a vyhodnocována softwarem. Přítomnost heteroduplexu v analyzovaném RT-PCR produktu/amplikonu mění tvar křivky tání, který je charakteristický pro konkrétní záměnu na konkrétní pozici daného amplikonu. Tato metoda se tak stává rychlým, spolehlivým, přesným a nákladově efektivním nástrojem pro genotypizaci mikroorganismů nejen jednotlivě nakultivovaných, ale v některých případech i ve směsných kulturách, či potravinách (Bazalová a kol., 2022). HRM analýza nachází své uplatnění i v různých sbírkách mikroorganismů, kde může sloužit jako rychlá a levná metoda pro kontrolu čistoty při pasážích sbírkových kmenů (Bazalová a Cihlář, 2019).

RT-PCR a HRM analýza poskytují rychlou a přesnou identifikaci a detekci mikrobiálních organismů. Tyto metody však vyžadují náročnou přípravu vzorků, spočívající v extrakci DNA, a pro jejich provádění je potřeba sofistikovaného, a tedy drahého vybavení (RT-PCR termocyklyer). LAMP (z anglického Loop-mediated isothermal amplification; Notomi a kol., 2000) má potenciál stát se levnou alternativou k těmto detekčním metodám. Tato nová metoda amplifikace nukleových kyselin se od klasické PCR odlišuje tím, že cílová sekvence je pomocí Bst DNA polymerázy a 4-6 různých primerů amplifikována za konstantní teploty v rozmezí 60-65 °C takzvanou autocyklickou syntézou DNA. Přítomnost či nepřítomnost detekované DNA se posuzuje vizuálně podle výskytu bílé sraženiny pyrofosforečnanu hořečnatého nebo podle změny barvy po přidání vhodného interkalačního barviva do reakce. Velkou výhodou LAMP je, že je amplifikace prováděna za konstantní teploty, a tudíž eliminuje potřebu drahých termocyklyerů. Zároveň je tato metoda méně citlivá na přítomnost inhibitorů, čímž se zkracuje čas potřebný pro přípravu vzorků. LAMP metoda byla použita a úspěšně testována pro detekci alimentárních patogenů i dalších mikroorganismů způsobující znehodnocení potravin (Niessen a kol., 2013; Yang a kol., 2018). Určitým limitujícím faktorem jsou primery nasedající na různé části amplifikovaného genu, pro jejichž návrh je potřeba použít specializovaný software.

Metody založené na přímém sekvenování DNA

Zásadním problémem většiny výše popsaných metod je, že bez použití vhodných bioinformatických nástrojů lze výsledky jen obtížně porovnat mezi jed-

notlivými laboratořemi, tedy reprodukovatelnost je velmi nízká. Naproti tomu sekvenační metody přinášejí možnost archivace dat ve formě univerzálního genetického kódu. Přímým sekvenováním (zjištěním pořadí nukleotidových bází v molekule DNA) PCR produktů tak získáváme data, sekvence vybraných úseků DNA, umožňující jednoduché sdílení ve formě knihovny či databázi. K identifikaci mikroorganismů pak dochází na základě porovnání získané sekvence se sekvencemi již dostupnými v různých, často on-line, databázích. Rozvoj sekvenačních metod k identifikaci mikroorganismů šel ruku v ruce se vzrůstající dostupností, vyšší kvalitou a klesajícími cenami sekvenačních služeb. Úměrně s rostoucím počtem DNA sekvencí z bakteriálních a houbových izolátů dostupných ve veřejných databázích pak rostla i oblíbenost sekvenačních metod. Rychlá amplifikace vybraných oblastí DNA i z malého množství výchozího materiálu dělá ze sekvenování PCR produktů jednu z nejcitlivějších dostupných technik pro detekci a identifikaci mikrobiálních organismů.

Díky své vysoké evoluční konzervovanosti a z toho plynoucí specifitě pro každý mikrobiální druh se univerzálním markerem pro identifikaci a typizaci všech mikrobiálních organismů rychle staly oblasti kódující ribozomální RNA (16S rRNA u bakterií; ITS region, 18S rRNA a 26S/28S rRNA u kvasinek a plísní) (Johnson a kol., 2019, Schoch a kol., 2012). Standardní postup identifikace je amplifikace vybrané oblasti rRNA pomocí PCR, následovaná sekvenováním a porovnáním získané sekvence s již známými sekvencemi uloženými v on-line, či jinak dostupných databázích. Díky své konzervovanosti jsou oblasti rRNA ve většině případů dostatečné pro identifikaci zkoumaného MO až na druhovou úroveň. V případech, kdy jsou oblasti rRNA identické u dvou blízké příbuzných druhů, přistupuje se k identifikaci na základě jiných konzervovaných genů. Těmi jsou u bakterií například geny pro RNA polymerázu, DNA gyrázu, transkripční faktor Tu, heat shock proteiny a podobně (Maiden a kol., 2013). Alternativně lze sekvenovat více těchto genů najednou a identifikaci blízké příbuzných bakterií provést metodou multilocus sequence typing (MLST; Maiden a kol., 2013), kterou lze studovat genetickou variabilitu mikroorganismů v rámci jednotlivých druhů. Metoda MLST je postavená na principu zvyšování počtu fylogeneticky relevantních dat sekvenováním většího množství variabilních lokusů (genů). Analýze pak předchází tvorba velkých alignmentů, tj. souborů, ve kterých jsou získané sekvence zarovnané za sebou a porovnány se sekvencemi blízkých druhů. Pro snazší interpretaci jsou následně konstruovány fylogenetické stromy, grafické výstupy, znázorňující genetickou příbuznost studovaných bakterií.

U kvasinek pro určení druhu postačují ve většině případů sekvence ITS regionů (úsek jaderné DNA kódující krátké části RNA malé a velké ribozomální podjednotky obsahující vnitřní přepisované distanční sekvence) (Schoch a kol., 2012). U některých druhů kvasinek

(např. *Kazachstania pseudohumilis*) je tento region sice dobře amplifikovatelný, avšak za standardních podmínek zřejmě kvůli sekundární struktuře generovaného PCR produktu, obtížně sekvenovatelný (Kieleczawa, 2006). V takových případech se přistupuje k sekvenování D1/D2 regionu – části 26S rRNA velké ribozomální podjednotky. U vláknitých hub bylo zjištěno, že sekvence oblastí ITS generují nepřesnosti v identifikaci na úrovni druhu, zejména u blíže příbuzných druhů (Kiss, 2012). Vláknité houby/plísňe jsou často nežádoucí kontaminanty potravin. Mimo senzorkého a výživového znehodnocení potravin mohou produkovat toxické či alergenní metabolity. Proto je správná identifikace těchto organismů v potravinách nezbytnou podmínkou pro adekvátní zásah. Pro přesnou identifikaci vláknitých hub jsou pak nejčastějšími alternativními markery geny kódující esenciální buněčné proteiny jako aktin, tubulin, kalmodulin a další (Raja a kol., 2017). Stejně jako v případě bakterií lze pro navýšení fylogeneticky relevantních dat sekvenovat více markerů pro takzvané molekulární barkódování (Raja a kol., 2017). Pro snazší identifikaci, interpretaci a mezilaboratorní kompatibilitu sekvencí houbových organismů laboratoře sekvenují právě tyto standardizované markery/barkódy a díky znalosti těchto sekvencí lze například navrhnout druhově specifické primery. Ty lze použít pro detekci konkrétních druhů v DNA izolované z neznámého vzorku, nebo, v případě sbírkových kmenů, detekovat kontaminaci blíže příbuzným druhem bez nutnosti sekvenovat daný úsek DNA (Kavková a kol., 2021).

Problematika extrakce DNA

Ačkoliv některé z popsaných molekulárních metod umožňují práci s hrubými lyzáty buněk, během všech úkonů předcházejících identifikaci je vždy výhodnější pracovat s nakultivovaným materiálem. Klasické kultivační metody tak mají v mikrobiologických laboratořích stále své pevné místo. Jedním z těchto nezbytných úkonů je extrakce mikrobiální DNA, neboť lyzáty buněk mohou obsahovat mnoho látek a enzymů potenciálně inhibujících amplifikaci pomocí PCR. Extrakce DNA ale prodlužuje čas potřebný k analýze mikrobiálních vzorků a navyšuje výdaje. Existuje mnoho metod extrakce genomové DNA optimalizovaných pro konkrétní typy mikroorganismů, z nichž některé zahrnují práci s toxickými chemikáliemi, a tudíž jsou potenciálně nebezpečné pro osoby, které izolaci DNA provádějí (Baptista a kol., 2021). Na trhu existuje řada komerčních souprav pro extrakci genomové DNA fungujících na různých principech. Většina operuje na principu afinitní chromatografie s realizací v kolonkách s křemíkovým nosičem (silica-gel), případně na principu iontoměničů. Populární jsou také soupravy pro izolaci DNA za využití magnetických mikrokuliček, na které se na principu reverzní adsorpce naváže celková DNA a oddělí se od zbytku buněčných struktur a dalšího obsahu (proteinů apod.). Komerční

kity nabízejí možnost rychlé a pohodlné extrakce mikrobiální DNA, a to dokonce přímo z různých materiálů, včetně potravin, bez nutnosti kultivace jednotlivých mikrobiálních kolonií (Baptista a kol. 2021). V případě, kdy pracujeme s již kultivovanými mikroorganismy, lze za určitých podmínek proces extrakce gDNA vynechat, konkrétně metodou PCR z jediné kolonie (Colony PCR; Bergkessel a Guthrie, 2013). Tato metoda je vhodná pro rychlou identifikaci, kdy bakteriologická klička, použitá k odebrání kolonie bakterií nebo kvasinek, například pro jiná mikrobiologická vyšetření, je opláchnuta ve zkumavce obsahující směs pro PCR reakci. Nabízí také možnosti optimalizace pro konkrétní způsoby použití (Bazalová a Cihlář, 2019). V případě práce s vláknitými houbami se kroku extrakce gDNA nelze vyhnout. Silné buněčné stěny hub vyžadují použití mechanické síly pro uvolnění buněčného obsahu, včetně gDNA. Navíc mnoho hub produkuje různé metabolity a barviva, které mají schopnost inhibovat následné enzymatické procesy včetně PCR. Extrakci houbové DNA pro běžné analýzy lze však provést rychle a nenákladně mechanickým rozrušením biologického materiálu a následným vysolením, například pomocí NaOH (Kavková a kol., 2021).

Závěr

Genotypové metody nám umožnily objevit obrovskou diverzitu dříve neznámých mikrobiálních druhů, a to včetně těch nekultivovatelných, a v neposlední řadě usnadnily i metagenomické studie na velkých a různorodých mikrobiálních komunitách. V dnešní době se v identifikaci a klasifikaci mikroorganismů nejvíce uplatňují sekvenační přístupy, které jsou rychlé, dostatečně citlivé a nabízejí velké možnosti optimalizace. Další genomické metody, které byly stručně popsány v tomto přehledu, mohou být užitečné jako doplňkové metody, například v případech, kdy je nutné rozlišit různé kmeny v rámci jednoho mikrobiálního druhu. Časová náročnost většiny těchto metod spolu s nároky na odbornost a náklady spojených s jejich implementací však komplikují jejich rutinní aplikaci v běžných mikrobiologických laboratořích, nebo sbírkách kultur. Co se týká detekčních technik, velký potenciál v mikrobiologických laboratořích má metoda HRM-PCR, která je rychlá, přesná a nákladově efektivní metodou pro detekci a genotypizaci mikroorganismů. Pro malé provozy a lokální laboratoře se do budoucna jeví jako ideální použití na obsluhu nenáročných metod LAMP, která může být prováděna v obyčejných termoblocích a za nízkých nákladů. Vysoká citlivost, které lze optimalizací dosáhnout, z ní činí potencionálně cenný nástroj pro rychlou diagnostiku alimentárních patogenů i dalších mikroorganismů způsobujících znehodnocení potravin.

Poděkování

Příspěvek vznikl za podpory projektu MZe ČR Země QK1910036 a QK1910024 a Mze-RO1422.

Literatura

- DONELLI G., VUOTTO C., MASTROMARINO P. (2013): Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism. *Microb. Ecol. Health*, 24, s. 1–8.
- OLIVE D.M., BEAN P. (1999): Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.*, 37, s. 1661–9.
- SHARMA A., LEE S., PARK Y.S. (2020): Molecular typing tools for identifying and characterizing lactic acid bacteria: a review. *Food Sci. Biotechnol.*, 29, s. 1301–1318.
- BAFFONI, L., STENICO, V., STRAHSBURGER, E., GAGGIÀ F., DI GIOIA D., MODESTO M., MATTARELLI P., BIAVATI B. (2013): Identification of species belonging to the *Bifidobacterium* genus by PCR-RFLP analysis of a hsp60 gene fragment. *BMC Microbiol.*, 13, s. 149.
- DIGUTA C.F., VINCENT B., GUILLOUX-BENATIER M., ALEXANDRE H., ROUSSEAU S. (2011): PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food Microbiol.*, 28, s. 1145–54.
- PRAMUNADIPTA S., WIDIASTUTI A., WIBOWO A., SUGA H., PRIYATMOJO A. (2022) Development of PCR-RFLP Technique for Identify Several Members of *Fusarium incarnatum-equiseti* Species Complex and *Fusarium fujikuroi* Species Complex. *Plant. Pathol. J.*, 38, s. 254–260.
- PAUN O., SCHÖNSWETTER P. (2012) Amplified fragment length polymorphism: an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic, and epigenetic studies. *Methods. Mol. Biol.*, 862, s. 75–87.
- SINGH S., GOSWAMI P., SINGH R., HELLER K.J. (2009): Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: a review. *LWT – Food Sci. Technol.*, 42, s. 448–457.
- DE BARROS LOPES M., RAINIERI S., HENSCHKE P.A., LANGRIDGE P. (1999): AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, s. 915–24.
- ABDOLLAHNIYA D., HOSSEINI S.M., BAGHBADERANI B.K., MORDADI A., ARABESTANI M.R. (2018): Identification of *Lactobacillus* Species Isolated from Traditional Dairy Products Using RAPD-PCR. *Avicenna J. Clinical Microbiol.*, 5, s. 7–13.
- REALE A., DI RENZO T., SUCCI M., TREMONTE P., COPPOLA R., SORRENTINO E. (2013): Microbiological and Fermentative Properties of Baker's Yeast Starter Used in Breadmaking. *J. Food Sci.*, 78, s. 1224–1231.
- GEVERS D., HUYS G., & SWINGS J. (2001): Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205, s. 31–36.
- NEOH H.M., TAN X.E., SAPRI H.F., TAN T.L. (2019) Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infect. Genet. Evol.*, 74, 103935.
- DUARTE S., CASSIO F., & PASCOAL C. (2012): Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology – Insights from Freshwaters. In Magdeldin S., Gel Electrophoresis – Principles and Basics. *IntechOpen*.
- RANJBAR R., KARAMI A., FARSHAD S., GIAMMANCO G.M., MAMMINA C. (2014): Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *New Microbiol.*, 37, s. 1–15.
- TAPONEN S., SALMIKIVI L., SIMOJOKI H., KOSKINEN M.T., PYÖRÄLÄ S. (2009): Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J. Dairy Sci.*, 92, s. 2610–2617.
- LIN X.B., GÄNZLE M.G. (2014): Quantitative high-resolution melting PCR analysis for monitoring of fermentation microbiota in sourdough. *Int. J. Food Microbiol.*, 186, s. 42–8.
- BAZALOVÁ O., CIHLÁŘ J. (2019): Stanovení druhů mikroorganismů pomocí HRM RT-PCR. *Mlékařské listy*, 176, s. 7–11.
- BAZALOVÁ O., CIHLÁŘ J.Z., DLOUHÁ Z., BÁR L., DRÁB V., KAVKOVÁ M. (2022): Rapid sourdough yeast identification using panfungal PCR combined with high resolution melting analysis. *J. Microbiol. Methods.*, 199, 106522.
- NIESSEN L., LUO J., DENSCHLAG C., VOGEL R.F. (2013) The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants. *Food Microbiol.*, 36, s. 191–206.
- YANG Q., DOMESLE K.J., GE B. (2018) Loop-Mediated Isothermal Amplification for Salmonella Detection in Food and Feed: Current Applications and Future Directions. *Foodborne Pathog. Dis.*, 15, s. 309–331.
- JOHNSON J.S., SPAKOWICZ D.J., HONG BY., PETERSEN L.M., DEMKOWICZ P., CHEN L., LEOPOLD S.R., HANSON B.M., AGRESTA H.O., GERSTEIN M., SODERGREN E. & WEINSTOCK G.M. (2019): Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat. Commun.*, 10, 5029.
- SCHOCH C. L., SEIFERT K. A., HUHNENDORF S., ROBERT V., SPOUGE J. L., LEVESQUE C. A., CHEN W. (2012): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, s. 6241–6246.
- MAIDEN M.C., VAN RENSBURG M.J.J., BRAY J.E., EARLE S.G., FORD S.A., JOLLEY K.A., MCCARTHY N.D. (2014): MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat. Rev. Microbiol.*, 11, s. 728–736.
- KIELECZAWA J. (2006) Fundamentals of sequencing of difficult templates – an overview. *J. Biomol. Tech.*, 17, s. 207–17.
- KISS L. (2012): Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences as species barcodes for Fungi. *PNAS* 109, E1811; author reply E1812.
- RAJA H.A., MILLER A.N., PEARCE C.J., OBERLIES N.H. (2017): Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J. Nat. Prod.*, 80, s. 756–770.
- KAVKOVÁ, M., CIHLÁŘ, J., DRÁB, V., BÁR, L. (2021): Differentiation of *Penicillium roqueforti* from Closely Related Species Contaminating, Cheeses and Dairy Environment. *Fermentation*, 7, s. 1–16.
- BAPTISTA M., CUNHA J., DOMINGUES L. (2021): DNA-based approaches for dairy products authentication: A review and perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 109, s. 386–397.
- BERGKESSEL M., GUTHRIE C. (2013): Colony PCR. *Methods in Enzymology*, 529, s. 299–309.

Korespondující autor:

Mgr. Jaromír Cihlár, Ph.D.

Výzkumný ústav mlékařenský s.r.o.

Soběslavská 841, 390 02 Tábor

e-mail: j.cihlar@vum-tabor.cz

Přijato do tisku: 9. 11. 2022

Lektorováno: 20. 11. 2022