

VYUŽITÍ METOD SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE PRO STUDIUM DIVERZITY MIKROBIOMU A REZISTOMU SÝRŮ

Sabina Purkrťová¹, Eva Musilová², Milada Šolcová¹,
Blanka Vrchotová², Šárka Horáčková²

¹ Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

² Ústav mléka, tuků a kosmetiky, VŠCHT Praha

Application of Next-Generation Sequencing for Investigating the Diversity of the Microbiome and Resistome in Cheeses

Abstrakt

Zavedení metod sekvenování nové generace začátkem 21. století způsobilo revoluci v sekvenování. Tyto nové vysoce výkonné metody poskytují rychlý zisk velkého množství sekvenačních dat při poměrně nízkých nákladech. V mikrobiologii tak umožnily studovat diverzitu genomů a transkriptomů na úrovni mikrobiálních kmenů, ale i na úrovni mikrobiálních společenstev daného prostředí, provádět komplexní taxonomické profilování a predikci metabolických drah, objevovat nové geny i nové nekultivatelné druhy. Obsahem tohoto literárního přehledu je stručný popis principů a postupů nejužívanějších metod sekvenování nové generace a prezentace jejich praktické aplikace pro studium diverzity mikrobiomu a rezistomu v sýrech a při výrobě sýrů na příkladech recentních odborných studií. Cílem je ukázat potenciál těchto metod, při správném použití a interpretaci, pro zvýšení potravinové bezpečnosti a udržitelnosti sýrů, charakterizaci sýrů s chráněným označením původu nebo studium kyselinotvorných a nekyselinotvorných kultur.

Klíčová slova: sekvenování nové generace, mikrobiom, rezistom, sýry, mlékárenský průmysl

Abstract

The introduction of next-generation sequencing methods in the early 21st century has revolutionized sequencing technologies. These novel high-throughput methods enable the rapid acquisition of large volumes of sequencing data at relatively low costs. In microbiology, this has facilitated the study of genome and transcriptome diversity at the microbial strain level, as well as at the level of microbial communities within a given environment, enabling comprehensive taxonomic profiling, prediction of metabolic pathways, discovery of novel genes, and identification of previously unculturable species. This literature review provides a brief description of the principles and procedures of the most used next-

generation sequencing methods and the presentation of their application for studying microbiome and resistome diversity in cheeses and during cheese production, based on the recent scientific studies. The aim is to demonstrate the potential of these methods, with proper application and interpretation, for enhancing food safety and sustainability of cheeses, characterizing cheeses with protected designation of origin, or investigation of starter and non-starter cultures.

Keywords: next-generation sequencing, microbiome, resistome, cheeses, dairy industry

Úvod

Obrovským přelomem v sekvenování nukleových kyselin se začátkem 21. století stal nástup technik sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS), někdy též označovaných jako techniky masivně paralelního sekvenování (massively parallel sequencing, MPS) (Goodwin a kol., 2016). Jednotlivé metody NGS se liší v použitém principu sekvenování a tím i dalších parametrech a byly svými dominantními výrobci zaváděny postupně. Společné však mají to, že oproti Sangerovu sekvenování pouze jednoho krátkého úseku ssDNA (maximálně 1200 bp) v jedné kapiláře umožňují při jednom běhu paralelní sekvenaci tisíců až miliónů úseků DNA (u některých metod NGS i RNA) najednou. To učinilo sekvenování nukleových kyselin metodami NGS enormně rychlým při zisku velkého množství sekvenačních dat za jednotku času (označováno jako propustnost), též však výrazně levnějším, a tím i značně dostupnějším.

DNA nebo RNA mohou být izolovány z homogenní populace buněk nebo z daného prostředí (metagenomová DNA) a lze je sekvenovat necíleně nebo cíleně pouze některé jejich úseky. RNA lze sekvenovat přímo nebo až po jejím přepisu reverzní transkripcí do komplementární cDNA (ang. complementary DNA) (Goodwin a kol., 2016). Pro homogenní populaci buněk daného organismu tak lze sekvenovat jeho celý genom (celogenomové sekvenování DNA; ang. whole-genome sequencing, WGS), tento genom sestavit a anotací identifikovat jednotlivé geny a jejich funkce. Sekvenací RNA nebo cDNA lze poté získat informaci o transkriptomu organismu při daných podmínkách. Při aplikaci speciálních postupů lze metodami NGS cíleně sekvenovat i pouze vybrané oblasti, jako například exom (kódující oblast genomu) nebo úseky DNA, na které se vážou proteiny jako transkripční faktory. Vybrané cílené úseky lze též nejdříve amplifikovat pomocí PCR a sekvenovat až PCR amplikony.

Sekvenace metagenomové DNA umožňuje studovat genetiku všech přítomných organismů včetně mikrobiomu daného prostředí. V závislosti na komplexitě společenství lze pro jednotlivé rody, druhy nebo i kmeny sestavit z metagenomických sekvenačních dat jejich souhrnný genom (ang. metagenome-assembled genome, MAG) a anotovat jej (De Filippis a kol., 2024). Ve frag-

mentech metagenomové DNA lze též hledat sekvenční vybraných genů nebo je taxonomicky určit. Pro taxonomické profilování mikrobiomu se používá sekvenace PCR amplikonů taxonomicky významných genů. Sekvenace metagenomové RNA nebo cDNA umožňuje studovat jak transkriptom mikrobiálních společenství, tak taxonomicky profilovat pouze metabolicky aktivní buňky.

Metody NGS tak mají neuvěřitelně široké spektrum komplexních aplikací pro studium genomiky, metagenomiky, transkriptomiky, epigenomiky a metabolomiky v mnoha různých oblastech, jako je mikrobiologie, humánní a veterinární medicína, environmentální vědy nebo forenzní vědy a další. V mikrobiologii tak umožňují sekvenaci celých genomů a mikrobiálních společenství, objevování nových nekultivovatelných druhů prokaryot, objevování nových genů nebo jejich variant, predikci metabolických drah a další (Goodwin a kol., 2016). Nejinak je tomu i v případě studia diverzity mikrobiomu a rezistomu sýrů, kde si metody NGS našly již své pevné místo, jak je zřejmé i z literárních přehledů mapujících rozsah aplikace metod NGS v této oblasti (Mayo a kol., 2014; Kamilari a kol., 2019; Afshari a kol., 2020).

Principy metod sekvenování nové generace

V současné době jsou nejvíce používány čtyři metody NGS, dominantně vždy na platformách jedné konkrétní společnosti. Tři metody patří mezi metody provádějící sekvenování syntézou, a to metoda sekvenování pomocí reverzibilních terminátorů Illumina (Illumina, USA), iontové polovodičové sekvenování Ion Torrent (Thermo Fischer Scientific, USA) a sekvenování s jednou molekulou v reálném čase PacBio (Pacific Biosciences, USA). Čtvrtou metodou je nanopórové sekvenování (Oxford Nanopore Technologies, Spojené království). Jednotlivé metody se liší svými principy a sekvenačními parametry, požadavky na přístrojové a laboratorní vybavení, přípravou vzorků k sekvenaci (příprava knihoven), propustností a náklady na sekvenaci. Jednotlivé platformy jsou vždy dostupné ve více verzích přístrojového vybavení, které se liší v parametrech, jako rozsah sekvenovacích délek, doba běhu nebo propustnost, a tím i v pořizovací ceně přístroje a typu analýz pro svoje optimální využití (Hu a kol., 2021).

Mezi sekvenační parametry patří délka sekvenačních čtení (ang. sequencing reads), přesnost sekvenace, nutnost amplifikace DNA nebo schopnost přímo sekvenovat též RNA (metoda PacBio sekvenování, pro eukaryotickou mRNA též nanopórové sekvenování) (Satam a kol., 2023). Vyšší přesnost mají metody NGS s krátkým čtením (ang. short-read sequencing), které sekvenují úseky do 900 bp a mezi které patří platformy Illumina (délka čtení 150–900 bp, přesnost čtení ~99,9 %) a Ion Torrent (200–600 bp, ~98–99,9 %). Metody NGS s delším čtením (ang. long-read sequencing) sekvenují úseky delší než 10 000 bp a jejich přesnost je o něco nižší, s dalším vývojem platform se však stále zvyšuje. Mezi tyto me-

tody patří platformy PacBio (délka čtení 20–50 kbp, maximálně až 100 kbp; 85,0–99,9 %) a nanopórové sekvenování (10–50 kbp, maximálně až stovky kbp; 85–95 % pro dřívější generace reagentů a průtokových cel, 95–97 % pro poslední generaci reagentů a průtokových cel R10.4).

Platformy sekvenování nové generace pro krátké čtení

Metoda sekvenování pomocí reverzibilních terminátorů byla původně vyvíjena společností Solexa (Spojené království). Solexa se v roce 2007 stala součástí společnosti Illumina (USA), která v roce 2007 uvedla na trh první verzi platformy Genome Analyzer Illumina. V současné době jsou komerčně dostupné verze MiSeq, NextSeq, HiSeq a NovaSeq Illumina. Při této metodě jsou krátké řetězce ssDNA imobilizovány pomocí nukleotidových adaptérů do jednotlivých spotů mikroporézní destičky a poté v daném spotu namnoženy speciální technikou můstkové amplifikace (Hu a kol., 2021). Následně je na všech spotech současně provedena syntéza komplementárních vláken ssDNA postupným přidáváním tzv. reverzibilních terminátorů, fluorescenčně značených specificky modifikovaných deoxynukleotid-trifosfátů (dNTPs), jejichž připojení do nově syntetizovaného řetězce dsDNA je detekováno pomocí fluorescence.

Metoda iontového polovodičového sekvenování (ang. ion semiconductor sequencing) byla původně vyvíjena společností Life Technologies (USA), která v roce 2010 uvedla na trh první z verzí platformy Ion Torrent, a to Ion PGM (Ion Personal Genome Machine). Společnost Life Technologies je od roku 2014 součástí společnosti Thermo Fisher Scientific (USA) a v současné době jsou komerčně dostupné verze Ion S5, Ion S5 XL a Ion GeneStudio S5. Sekvenování probíhá na čipu s miliony mikrojamek, kdy každá mikrojamka obsahuje jeden řetězec ssDNA, který je nejdříve amplifikován pomocí emulzní PCR (Hu a kol., 2021). V jednotlivých cyklech jsou postupně přidávány jednotlivé dNTPs, kdy při jejich zařazení do nově syntetizovaného řetězce dsDNA dojde k uvolnění protonu H⁺, což jako změnu pH detekuje senzor umístěný pod mikrojamkou.

Platformy sekvenování nové generace pro dlouhé čtení

Sekvenování s jednou molekulou v reálném čase SMRT (ang. single-molecule real-time sequencing) se podle výrobce Pacific Biosciences označuje též jako PacBio sekvenování. První verze PacBio RS byla uvedena na trh v roce 2011 a v současné době jsou dostupné další verze Revio a Sequel IIe. Principem této metody je sekvenace dlouhých cirkulárních molekul dsDNA ve speciálních ZMW nanojamkách (ang. zero-mode waveguides; vlnovod s nulovým módem) reakční cely (Hu a kol., 2021). Tyto ZMW nanojamky, kterých reakční cely obsahuje desítky až stovky tisíc, mají průměr několika desítek nm a na svém dně mají ukotvenou jednu molekulu DNA polymerázy, na kterou se naváže jedna cirkulární molekula dsDNA. Následně jsou postupně

přidávány fluorescenčně značené dNTPs, kdy vzhledem ke konstrukci ZMW nanojamky světlo proniká pouze do blízkosti DNA polymerázy a fluorescence je tak detekována pouze při jejich zařazení do nově syntetizovaného dsDNA vlákna.

Metoda nanopórového sekvenování byla uvedena svým vývojcem a dominantním výrobcem Oxford Nanopore Technologies (Spojené království) na trh v roce 2014 ve verzi MinION s první generací průtokových cel R7.0. V současné době jsou k dispozici i další verze GridION a PromethION a průtokové cely nyní již generace R10.4. Při nanopórovém sekvenování probíhá sekvenování průchodem ssDNA řetězce speciálním proteinovým nanopórem (Hu a kol., 2021). Proteinový nanopór je zabudován do syntetické membrány ponořené do elektrolytického roztoku, kterým prochází proud, a vše je umístěné v zařízení označovaném jako průtoková cela (ang. flowcell). Průchod jednotlivých nukleotidů blokuje nanopór, čímž dochází ke změnám ve velikosti elektrického proudu, které jsou detekovány pomocí elektrod umístěných v membráně a jsou charakteristické pro jednotlivé nukleotidy vzhledem k jejich rozdílu ve velikosti a chemické struktuře.

Parametry výběru platformy pro sekvenování nové generace

Cena za přístrojové vybavení závisí na konkrétní verzi použité platformy a pohybuje se obecně v rozsahu 100 000 – 1 000 000 euro s výjimkou platformy MinION pro nanopórové sekvenování, kterou lze pořídit již za 1 000 euro a lze ji používat i v terénu (Hu a kol., 2021). Orientační cenu za sekvenaci 1 Mbp metodami NGS lze odhadnout v řádu jednotek až nižších desítek euro (Hu a kol., 2021; Solcova a kol., 2021), kdy přesná cena záleží na mnoha parametrech, jako organizace sekvenačních běhů, aktuální ceny reagentů k přípravě knihoven a způsob provedení sekvenační zakázky. Volba nejvhodnější metody NGS pak závisí na konkrétním cíli analýzy a požadovaných vlastnostech sekvenačních dat (délka čtení, hloubka sekvenování, přesnost, propustnost), dostupném rozpočtu, laboratorním vybavení a dostatku školeného personálu pro in-house provedení sekvenování nebo jeho provedení specializovanými společnostmi. Často se jednotlivé metody NGS vhodně doplňují. Kombinace metod krátkého a dlouhého čtení umožňuje například sestavení kompletnějšího a přesnějšího genomu, neboť metody dlouhého čtení umožňují sestavit jeho strukturu, zatímco metody krátkého čtení poté přesněji sekvenovat jednotlivé úseky (Satam a kol., 2023).

Protokoly metod sekvenování nové generace pro studium mikrobiomu a rezistomu sýrů

Izolace mikrobiální DNA a RNA ze vzorku

Prvním krokem je izolace mikrobiální DNA nebo RNA ze vzorku. K dispozici je široké spektrum in-house metod nebo komerčně dodávaných souprav, které se liší svou

vhodností pro různé typy matrice vzorku (čisté mikrobiální kultury; vzorky různě upraveného mléka a jiných vstupních surovin, různých typů sýrů, solných lázní, stěrů z prostředí a dalších), spektrem mikroorganismů, pro izolaci jejichž nukleových kyselin jsou vhodné vzhledem k rozdílu ve složení buněčné stěny, pracností, časovou náročností, výtěžkem a čistotou izolované DNA nebo RNA (Kamilari a kol., 2019). Jednotlivé metody se liší v postupech použitých pro dezintegraci mikrobiálních buněk s cílem uvolnit intracelulární DNA a RNA a následných postupech pro extrakci volné DNA nebo RNA. Pro vzorky s vysokým obsahem tuků, proteinů nebo anorganických solí, což je speciálně případ vzorků sýrů nebo vzorků z výroby sýrů, je obvykle nutno provést i speciální předúpravu vzorku pro odstranění těchto složek. Žádná metoda izolace DNA nebo RNA není dosud zavedena jako standardní, při výběru vhodné metody je tak nutno konzultovat dostupnou odbornou literaturu včetně doporučení výrobců platform NGS (Kamilari a kol., 2019). Srovnání účinnosti metod izolace mikrobiální DNA z různých druhů mléka a sýrů se dlouhodobě věnuje mnoho studií. S použitím metod NGS však přibyla i možnost komplexního srovnání přesných taxonomických profilů izolované DNA nebo RNA. Příkladem je studie, kterou provedli Markuskova a kol. (2021) pro stanovení vlivu použitých metod izolace DNA ze sýru Mozzarella na bakteriální 16S rDNA profil při sekvenaci platformou Illumina MiSeq, kdy některé metody vykazovaly vyšší relativní zastoupení gram pozitivních bakterií. Sekvenační data získaná pro stejné vzorky odlišnými metodami izolace DNA je tak třeba srovnávat velmi uvážlivě.

Příprava sekvenační knihovny

Dalším krokem je příprava sekvenační knihovny, což označuje přípravu jednotlivých fragmentů DNA nebo RNA do formy čitelné danou sekvenační platformou, a samotná sekvenace. V závislosti na cíli analýzy a sekvenační platformě zahrnuje příprava knihovny různé kroky, jako přepis RNA do cDNA, amplifikace PCR ampliconů, cílená fragmentace a/nebo separace fragmentů, ligace adaptérů na fragmenty DNA a další (Hu a kol., 2021). Pro taxonomické profilování mikrobiomu se standardně používá gen pro 16S rRNA (délka zhruba 1500 bp) pro prokaryotické mikroorganismy (bakterie a archaea) a oblast ITS (ang. internal transcribed spacer) (450–750 bp) pro mikromycety (kvasinky a plísňe), kdy volba vhodných primerů a délka sekvenovaného úseku může ovlivnit výsledek taxonomického profilování (Mayo a kol., 2014).

Bioinformatická analýza sekvenačních dat

Posledním krokem je bioinformatická analýza sekvenačních dat. Postup bioinformatické analýzy (též označován jako pipeline) závisí na cíli analýzy a skládá se obvykle z několika navazujících úloh (Satam a kol., 2023). Standardně se pro provedení preferuje systém

Linux nebo softwarové balíčky v jazyce Python s knihovnou Biopython. Tyto postupy jsou bezplatně vyvíjeny a sdíleny bioinformatickou komunitou (viz například úložiště github.com), kdy jejich použití předpokládá určité expertní znalosti bioinformatiky. Alternativou jsou software poskytované přímo výrobcí sekvenačních platform nebo online nástroje některých výzkumných center nebo referenčních databází, které uživateli umožňují provádět jednotlivé analýzy s menšími nároky na expertní znalosti. Příkladem jsou platformy Center for Genomic Epidemiology (<https://genepi.food.dtu.dk/>) nebo Galaxy project (<https://usegalaxy.org/>), které lze použít i při pouze základních znalostech o zpracování bioinformatických dat. Pro vizualizace dat se nejčastěji používají softwarové balíčky v jazyce R nebo speciální software.

Zpracování sekvenačních dat zahrnuje převod surových dat ze sekvenátoru na sekvenační čtení, obvykle ve formátu fastq, který obsahuje i informaci o spolehlivosti sekvenace pro jednotlivé nukleotidy, odstranění sekvencí adaptérů a primerů a filtraci z hlediska spolehlivosti sekvenování a délky. Následně jsou sekvenační čtení sestavována do větších celků až na úroveň genomů a MAG a/nebo je provedeno jejich srovnání se sekvencemi v referenčních databázích s cílem je taxonomicky identifikovat nebo detekovat sekvence cílových genů (Hu a kol., 2021). Pro metagenomové analýzy je důležité též odstranění sekvencí kontaminující DNA, což při mikrobiální analýze sýrů jsou sekvence kravské, ovčí nebo lidské DNA včetně mitochondriální DNA, v případě příměsi rostlinných surovin též rostlinné a plastidové DNA. Speciální nástroje poté existují pro korelaci různého počtu kopií genu pro 16S rRNA a pro oblast ITS u různých druhů nebo pro určení úrovně transkripce genů (Hu a kol., 2021). Podrobná schémata postupu pro jednotlivé typy analýz jsou dostupná v příslušné odborné literatuře (Mayo a kol., 2014; Kamilarí a kol., 2019; Afshari a kol., 2020).

Mezi standardní referenční databáze pro sekvence DNA a RNA patří NCBI GenBank (databáze sekvencí s anotací), NCBI RefSeq (databáze referenčních sekvencí), databáze SILVA (databáze referenčních sekvence pro rRNA bakterií, archaeí a eukaryot), databáze pro geny rezistence k antibiotikům (ang. antibiotic resistance gene, ARG) jako MEGARes, CARD, ARG-ANNOT nebo ResFinder a další (Rubiola a kol., 2022a).

Studium mikrobiomu sýrů metodami sekvenování nové generace

Nejčastějším typem vzorků pro analýzu mikrobiomu při výrobě sýrů jsou přímo sýry. Pozornost se však věnuje i analýze mléka a dalších vstupních surovin i vzorkům z prostředí, které přichází se sýry do kontaktu.

Taxonomické profilování mikrobiomu sýrů

Pro taxonomické profilování mikrobiomu sýrů se standardně používá gen pro 16S rRNA pro bakterie a archaea a oblast ITS pro kvasinky a plísňe, i když

v některých případech nemusí být toto taxonomické profilování dostačující. V dostupných studiích jsou používány všechny čtyři výše popsané NGS metody, kdy mezi nejčastěji používané patří platforma Illumina. Některé studie se věnují i srovnání výsledků získaných různými platformami a postupy, kdy například Decadt a kol. (2023; 2025) provedli pro DNA izolovanou z tepelně ošetřeného mléka a vzorků sýrů Gouda v průběhu zrání srovnání vlivu metody sekvenování (sekvenace metagenomové DNA na platformě Illumina NovaSeq a MinION, 16S rDNA na platformě PacBio Sequel) na taxonomické profilování. Všechny metody identifikovaly identické bakteriální druhy, které se však lišily ve své relativní četnosti z důvodu různé míry fragmentace genomů odlišně životaschopných buněk. Sekvenace 16S rDNA tak byla doporučena jako přesnější pro taxonomické profilování metabolicky aktivních buněk. Naopak sekvenování metagenomové DNA umožnilo detekovat i mikromycety a bakteriofágy včetně jejich zastoupení v různých částech sýra a sestavit MAG pro různé bakteriální druhy včetně zákysové a nezákysové kultury. Rubiola a kol. (2022b) srovnali taxonomickou profilaci bakteriomu filtrů z tanků na mléko při sekvenaci 16S rDNA na platformě MinION a Illumina NovaSeq a při sekvenaci metagenomové DNA na platformě Illumina NovaSeq. Sekvenace 16S rDNA se v této studii ukázala jako vhodnější nástroj pro profilování nejvíce četných taxonů, sekvenace metagenomové DNA byla naopak vhodnější pro detekci málo četných taxonů.

Detekce vybraných skupin mikroorganismů (kazící a patogenní mikroorganismy, producenti metabolitů)

Cílem analýzy mikrobiomu sýrů může být detekce zdraví prospěšných nebo naopak patogenních mikroorganismů. Takto použili metody NGS pro studium bakteriomu bryndzy Planý a kol. (2016; 2023), a to jak při sekvenaci metagenomové DNA a 16S rDNA na platformě Illumina MiSeq (2016), tak při sekvenaci delší části rRNA operonu na platformě MinION (2023). Dalším cílem může být detekce mikrobiálních druhů odpovědných za kažení sýrů. Sattin a kol. se (2016a) zaměřili na tepelně odolný mikrobiom sýru ricotta, který vzhledem k postupu výroby a požadavkům na prodloužení trvanlivosti představuje možný zdroj znehodnocení. Sekvenování metagenomové DNA vzorků sýru ricotta v průběhu skladování při použití platformy Illumina MiSeq prokázalo přítomnost velkého množství sporotvorných bakterií, dominantně rodů *Bacillus*, *Paenibacillus* a *Clostridium*, kdy zásadní pro prodloužení trvanlivosti je tak odstranění spor při zpracování surovin. Metody NGS použili Sattin a kol. (2016b) též pro analýzu bakteriomu mléčné syrovátky, která se pro výrobu sýru ricotta používá. Analýza bakteriomu byla provedena sekvenací 16S rDNA amplifikované z DNA i cDNA na platformě Illumina MiSeq, kdy DNA a RNA byly izolované ze vzorků čerstvé a mražené pasterizované mléčné syrovátky. V této studii se povedlo statisticky stanovit a odlišit bakteriom vzorků s defekt-

ními organoleptickými vlastnostmi a korelovat ho s přítomností specifických těkavých látek. Bylo zjištěno, že pro diverzitu bakteriomu živých buněk je přesnější sekvenace 16S rDNA amplikonů cDNA než amplikonů DNA, neboť DNA mrtvých bakteriálních buněk není při pasterizaci degradována a je tedy stále amplifikovatelná. Další variantou pro odlišení živých a mrtvých buněk, i když s určitými limity, je aplikace ethidium monoazidu nebo propidium monoazidu ve vzorku před izolací DNA a její sekvenací metodami NGS (Yap a kol., 2022).

Výsledky analýzy metagenomové DNA lze též korelovat s výskytem metabolitů, což propojuje metagenomiku s metabolomikou. Zhang a kol. (2024) tak studovali změny mikrobiomu ve vzorcích syrového, pasterizovaného a UHT mléka během skladování v chladu při sekvenaci metagenomové DNA platformou Illumina NovaSeq a korelovali je se změnami v produkovaných metabolitech. Výsledky ukázaly, že tyto trendy jsou odlišné pro syrové a tepelně upravené mléko. Mezi hlavní mikroorganismy, které proliferovaly v pasterizovaném mléce a podílely se na produkci metabolitů, patřily rody *Microbacterium*, *Micrococcus* a bakterie třídy *Actinomycetia*. Nejvýraznější korelaci s metabolity spojenými s kažením mléka pak vykazovaly bakteriální rody *Pseudomonas* a *Acinetobacter*, které se proliferovaly méně. Na základě metagenomické analýzy metabolických drah bylo navrženo, že degradace proteinů může souviset s mikrobiální proliferací, zatímco degradace lipidů může souviset s tepelně odolnými enzymy přítomnými v syrovém mléce.

Studium zákysových kultur tradičních a řemeslných sýrů a mikrobiomu potravin s chráněným označením původu

Samostatnou kapitolou je využití metod NGS pro studium nedefinovaných zákysových kultur, používaných pro výrobu mnoha tradičních a řemeslných sýrů. Jejich přesné složení závisí na více faktorech a jeho diverzita významně ovlivňuje kvalitu a vlastnosti sýra, kultivační metody však nemusí umožnit záchyt všech mikrobiálních kmenů. Klistincova a kol. (2025) tak sekvenací 16S rDNA na platformách Illumina MiSeq a MinION stanovili složení bakteriomu čerstvé a fermentované syrovátky, použité jako přírodní zákysová kultura při výrobě bryndzy ze syrového ovčího mléka od různých malých nebo středních výrobců. Detekovali různé druhy rodu *Lactobacillus sensu lato* nebo rodu *Streptococcus*, kdy bakterie mléčného kvašení zvláště v případě fermentované syrovátky účinně potlačovaly růst nežádoucích bakteriálních skupin, jako jsou koliformní bakterie nebo bakterie rodu *Staphylococcus*.

Dalším polem aplikace metod NGS je stanovení složení mikrobiomu u potravin s chráněným označením původu (CHOP), což může zlepšit kontrolu správného používání tohoto označení. Salamandane a kol. (2024) srovnali mikrobiom dvou typů portugalského sýra ze syrového ovčího mléka při sekvenaci metagenomové DNA platformou Illumina NextSeq. Bylo zjištěno, že složení bak-

teriomu se liší nejen mezi sýry s CHOP a bez CHOP, ale také mezi výrobci, zejména pro sýry bez CHOP. Sýry s CHOP též vykazovaly větší bakteriální diverzitu než sýry bez CHOP, což by mohlo souviset s tím, že diverzita spontánně fermentovaných sýrů je významně vyšší u sýrů vyráběných bez přídavku potravinářských konzervantů a zákysových kultur.

Analýza mikrobiomu mlékárenských provozů

Metodami NGS lze studovat i mikrobiom prostředí mlékárenských provozů a detekovat tak niky s perzistentními mikroorganismy způsobujícími například kažení sýrů, nebo naopak detekovat rezidentní mikroorganismy, které se mohou aktivně podílet na fermentaci a zrání sýrů. Giagnoni a kol. (2025) analyzovali stěry povrchů linek na zpracování ovčího sýra na Sardinii. Sekvenace 16S rDNA na platformě Ion GeneStudio S5 identifikovala odlišné složení bakteriálních komunit v pracovních oblastech mytí-zpracování a solení-zrání-skladování, kdy hlavním diskriminačním faktorem byl výskyt bakterií rodu *Halomonas* a čeledi *Halomonadaceae*. De Filippis a kol. (2024) provedli rozsáhlé mapování mikrobiomu v 73 sýrárnách 4 evropských zemí vyrábějících různé typy sýrů. Sekvenací metagenomové DNA izolované ze vzorků sýrů, surovin a stěrů ze sýráren na platformě Illumina NovaSeq zjistili, že sýrárny ukrývají velmi komplexní mikrobiom, s vysokým výskytem genů potenciálně zapojených do rozvoje chuti sýrů, do probiotických aktivit a do odolnosti vůči průchodu gastrointestinálním traktem, což naznačuje potenciál pro jejich přenos do lidského střevního mikrobiomu. Navíc bylo sestaveno více než 6100 MAG včetně MAG potenciálně nových bakteriálních druhů a MAG specificky odpovídajících jednotlivým sýrárnám, což naznačuje možnost využití analýzy mikrobiomu pro sledovatelnost původu sýra. Podobnou závislost složení mikrobiomu na místě původu suroviny zjistili též Horník a kol. (2021) u vzorků syrového mléka z různých farem v Polsku při sekvenaci 16S rDNA na platformě Ion PGM.

Studium rezistomu sýrů metodami sekvenování nové generace

Výskyt bakteriálních kmenů nesoucích ARG představuje v současné době globální hrozbu pro lidské zdraví. Vzhledem ke svému komplexnímu mikrobiomu mohou sýry sloužit jako rezervoár ARG a jejich rezistom, soubor všech ARG, které se nacházejí v sýrech, tak může potenciálně přispívat k šíření ARG prostřednictvím potravinového řetězce. Kritickým faktorem může být například i dlouhodobé zrání některých sýrů, což zvyšuje možnost přenosu ARG horizontálním genetickým transferem (HGT) v sýru a při konzumaci sýrů v syrovém stavu též riziko přenosu bakteriálních kmenů nesoucích ARG na člověka (Florez a kol., 2017). Klíčovým faktorem pro bezpečnost mléčných výrobků je i nepřítomnost ARG získávaných HGT v zákysových kulturách.

ARG lze detekovat přímo v genomech bakteriálních izolátů, což provedli Rozman a kol. (2023) u 103 izolátů bakterií mléčného kvašení a rodu *Bifidobacterium* celogenomovým sekvenováním na platformě Illumina MiSeq. Výskyt ARG byl zjištěn u 17 % kmenů, kdy bylo detekováno 36 různých ARG. Byly též detekovány i nové mobilní genetické elementy nesoucí ARG, což zvyšuje možnost jejich přenosu pomocí HGT. Fenotypová rezistence se s genotypem shodovala v 92 % případů, naopak detekci ARG nemusí vždy odpovídat fenotypová rezistence.

ARG lze dále přímo detekovat v sekvenačních datech metagenomové DNA nebo z ní složených MAG. Rubiola a kol. (2022a) takto analyzovali metagenomovou DNA izolovanou z filtrů pro syrové mléko na platformě Illumina NovaSeq. Detekce ARG ve složených MAG umožnila spolehlivé přiřazení ARG k hostujícím bakteriálním druhům, naopak přímá analýza sekvenačních čtení umožnila navíc detekovat i málo četná ARG. Bylo zjištěno, že většina ARG byla hostována gramnegativními bakteriemi rodů *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Escherichia* a *Pseudomonas*, což poukazuje na roli gramnegativních bakterií jako rezervoárů ARG. De Filippis a kol. (2024) detekovali ARG i v několika MAG izolovaných z povrchů v mlékárenském průmyslu, což ukazuje, že tyto povrchy též představují potenciální hotspot pro šíření antibiotické rezistence.

Metody NGS lze využít i ke sledování změn rezistomu. Kerek a kol. (2024) ve své studii sledovali změny rezistomu syrového mléka a z něho vyrobeného sýru v průběhu zrání při sekvenaci metagenomové DNA platformou Illumina NextSeq. Nejvíce detekovanými ARG byly geny efluxních pump pro rezistenci k fluorochinolonom, byly však detekovány i geny pro beta-laktamázy včetně těch s rozšířeným spektrem rezistence (ang. extended spectrum beta-lactamases, ESBL). U čerstvě vyrobeného sýra bylo množství ARG výrazně nižší než v syrovém mléce, avšak po jednom měsíci zrání již došlo k výraznému nárůstu množství ARG. De Sant'Anna a kol. (2025) zjistili při sekvenaci metagenomové DNA na platformě Illumina HiSeq, že v průběhu zrání byl rezistom sýra z pasterizovaného mléka odlišný od rezistomu sýra ze syrového mléka z hlediska výskytu různých skupin ARG, což korelovalo s odlišným složením bakteriomů a dynamikou jejich změn.

Srovnání metod sekvenování nové generace s jinými metodami

Důležitou otázkou je také srovnatelnost výsledků metod NGS s výsledky získanými kultivačními metodami nebo pomocí PCR. Dreier a kol. (2022) srovnali taxonomické profilování bakteriomu sýrů Raclette du Valais CHOP při sekvenování 16S rDNA na platformě Ion S5 a při absolutní kvantifikaci 16S rDNA významných druhů kvantitativním PCR. Výsledky ukázaly značnou shodu v relativní četnosti testovaných druhů, kdy určité rozdíly byly pozorovány pouze u některých, zvláště méně

četných druhů z důvodu například nižší komplementarity primerů pro amplifikaci 16S rDNA nebo variací v počtu kopií genu pro 16S rRNA. Breitenwieser a kol. (2020) srovnali u vzorků syrového mléka výsledky taxonomického profilování bakteriomu 16S rDNA na platformě Illumina MiSeq a výsledky kultivační analýzy, kdy z každého vzorku bylo izolováno 1500 kolonií, a zjistili, že oba přístupy se vhodně doplňují. Sekvenování odhalilo třikrát vyšší biodiverzitu na úrovni rodu vzhledem k detekci i anaerobních nebo kultivačně náročných druhů. Naopak kultivací byly izolovány i některé rody, které nebyly detekovány sekvenací, kdy nižší relativní zastoupení některých rodů v případě sekvenování může být důsledkem méně účinné lýze buněk a/nebo amplifikace 16S rDNA použitými primery.

Závěr

Využití metod NGS umožňuje podrobnou a komplexní analýzu bakteriomu a rezistomu sýrů ve hloubce a rozsahu nedosažitelnými jinými metodami. I použití jednotlivých typů NGS metod má však svoje určité limity a v závislosti na cíli analýzy je vhodné jednotlivé typy analýz navzájem kombinovat (například sekvenace metagenomové DNA i taxonomicky významných genů), případně je doplnit dalšími metodami. Je zřejmé, že při vhodné aplikaci NGS analýz lze získat nedocenitelný nástroj pro řešení mnoha problémů spojených s výrobou sýrů.

Poděkování

Tato práce byla podpořena grantem Národní agentury pro zemědělský výzkum Ministerstva zemědělství ČR, grant č. QL24010251.

Literatura

- AFSHARI R., PILLIDGE C. J., DIAS D. A. a kol. (2020): Cheesomics: the future pathway to understanding cheese flavour and quality. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 60 (1), s. 33–47.
- BREITENWIESER F., DOLL E. V., CLAVEL T. a kol. (2020): Complementary use of cultivation and high-throughput amplicon sequencing reveals high biodiversity within raw milk microbiota. *Front Microbiol*, 11 (1557), s. 1–12.
- DE FILIPPIS F., VALENTINO V., YAP M. a kol. (2024): Microbiome mapping in dairy industry reveals new species and genes for probiotic and bioprotective activities. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 10 (67), s. 1–16.
- DE SANT'ANNA F. M., CHAKRAWARTI A., HALEY B. J. a kol. (2025): The resistome of pasteurized and raw milk cheeses from the state of Vermont. *Int J Food Microbiol*, 441 (111333), s. 1–12.
- DECADT H., DIAZ-MUNOZ C., VERMOTE L. a kol. (2025): Long-read metagenomics gives a more accurate insight into the microbiota of long-ripened gouda cheeses. *Front Microbiol*, 16, s. 1543079.
- DECADT H., WECKX S., DE VUYST L. (2023): The rotation of primary starter culture mixtures results in batch-to-batch variations during Gouda cheese production. *Front Microbiol*, 14, s. 1–20.
- DREIER M., MEOLA M., BERTHOUD H. a kol. (2022): High-throughput qPCR and 16S rRNA gene amplicon sequencing as complementary methods for the investigation of the cheese microbiota. *BMC Microbiol*, 22 (48), s. 1–18.
- FLOREZ A. B., VAZQUEZ L., MAYO B. (2017): A Functional Metagenomic Analysis of Tetracycline Resistance in Cheese Bacteria. *Front Microbiol*, 8 (907), s. 1–12.

- GIAGNONI L., SALZA S., TONDELLO A. a kol. (2025): DNA metabarcoding for the identification and relative abundance assessment of general and potentially pathogenic bacteria in Sardinian sheep cheese processing environments. *Int J Food Microbiol*, 442 (111353), s. 1–12.
- GOODWIN S., MCPHERSON J. D., MCCOMBIE W. R. (2016): Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*, 17 (6), s. 333–351.
- HORNIK B., CZARNY J., STANINSKA-PIETA J. a kol. (2021): The raw milk microbiota from semi-subsistence farms characteristics by NGS analysis method. *Molecules*, 26 (16), s. 1–12.
- HU T., CHITNIS N., MONOS D. a kol. (2021): Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol*, 82 (11), s. 801–811.
- KAMILARI E., TOMAZOU M., ANTONIADES A. a kol. (2019): High throughput sequencing technologies as a new toolbox for deep analysis, characterization and potentially authentication of protection designation of origin cheeses? *Int J Food Sci*, 2019 (5837301), s. 1–15.
- KEREK A., NEMETH V., SZABO A. a kol. (2024): Monitoring changes in the antimicrobial-resistance gene set (ARG) of raw milk and dairy products in a cattle farm, from production to consumption. *Vet Sci*, 11 (6), s. 1–16.
- KLISTINCOVA N., KORENOVA J., RESKOVA Z. a kol. (2025): Bacterial consortia of ewes' whey in the production of bryndza cheese in Slovakia. *Lett Appl Microbiol*, 78 (4), s. 1–9.
- MARKUSKOVA B., MINAROVICOVA J., VEGHOVA A. a kol. (2021): Impact of DNA extraction methods on 16S rRNA-based profiling of bacterial communities in cheese. *J Microbiol Methods*, 184 (106210), s. 1–10.
- MAYO B., RACHID C. T., ALEGRIA A. a kol. (2014): Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. *Curr Genomics*, 15 (4), s. 293–309.
- PLANÝ M., KUČHTA T., ŠOLTÝS K. a kol. (2016): Metagenomic Analysis of Slovak Bryndza Cheese Using Next-Generation 16S rDNA Amplicon Sequencing. *NBC*, 15 (1), s. 23–34.
- PLANÝ M., SITARČÍK J., PAVLOVIČ J. a kol. (2023): Evaluation of bacterial consortia associated with dairy fermentation by ribosomal RNA (rrn) operon metabarcoding strategy using MinION device. *Food Bioscience*, 51 (102308), s. 1–9.
- ROZMAN V., MOHAR LORBEG P., TREVEN P. a kol. (2023): Genomic insights into antibiotic resistance and mobilome of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Life Sci Alliance*, 6 (4), s. 1–15.
- RUBIOLA S., MACORI G., CHIESA F. a kol. (2022a): Shotgun metagenomic sequencing of bulk tank milk filters reveals the role of Moraxellaceae and Enterobacteriaceae as carriers of antimicrobial resistance genes. *Food Res Int*, 158 (111579), s. 1–11.
- RUBIOLA S., MACORI G., CIVERA T. a kol. (2022b): Comparison between full-length 16S rRNA metabarcoding and whole metagenome sequencing suggests the use of either is suitable for large-scale microbiome studies. *Foodborne Pathog Dis*, 19 (7), s. 495–504.
- SALAMANDANE A., LEECH J., ALMEIDA R. a kol. (2024): Metagenomic analysis of the bacterial microbiome, resistome and virulome distinguishes Portuguese Serra da Estrela PDO cheeses from similar non-PDO cheeses: An exploratory approach. *Food Res Int*, 189 (114556), s. 1–12.
- SATAM H., JOSHI K., MANGROLIA U. a kol. (2023): Next-generation sequencing technology: Current trends and advancements. *Biology (Basel)*, 12 (7), s. 1–25.
- SATTIN E., ANDREANI N. A., CARRARO L. a kol. (2016a): Microbial dynamics during shelf-life of industrial Ricotta cheese and identification of a *Bacillus* strain as a cause of a pink discolouration. *Food Microbiol*, 57, s. 8–15.
- SATTIN E., ANDREANI N. A., CARRARO L. a kol. (2016b): A multi-omics approach to evaluate the quality of milk whey used in ricotta cheese production. *Front Microbiol*, 7 (1272), s. 1–12.
- SOLCOVA M., DEMNEROVA K., PURKRTOVA S. (2021): Application of nanopore sequencing (MinION) for the analysis of bacteriome and resistome of bean sprouts. *Microorganisms*, 9 (5), s. 1–18.
- YAP M., O'SULLIVAN O., O'TOOLE P. W. a kol. (2022): Development of sequencing-based methodologies to distinguish viable from non-viable cells in a bovine milk matrix: A pilot study. *Front Microbiol*, 13 (1036643), s. 1–12.
- ZHANG Y., YU P., TAO F. (2024): Dynamic interplay between microbiota shifts and differential metabolites during dairy processing and storage. *Molecules*, 29 (12), s. 1–20.

Korespondující autor: Ing. Sabina Purkrtová, Ph.D.,
Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola
chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6,
e-mail: Sabina.Purkrtova@vscht.cz

Přijato do tisku: 25. 9. 2025

Lektorováno: 9. 10. 2025

“CO JE ZAJÍMAVÉHO VE VĚDECKÉ LITERATUŘE”

Mléko a mléčné výrobky jsou neustále centrem pozornosti výzkumu. Výběr z vědecké literatury pro toto číslo zahrnuje následující publikace:

Mléčné výrobky s normálním a nízkým obsahem tuku a kardiovaskulární onemocnění: perspektivy pro budoucí dietní doporučení

Benoit Lamarche, Aime Astrup, Robert H. Eckel, Emma Feeney, Ian Givens, Ronald M. Krauss, Philippe Legrand, Renata Micha, Marie-Caroline Michalski, Sabita Soedamah-Muthu, Qi Sun, Frans J. Kok (2025): Regular-fat and low-fat dairy foods and cardiovascular diseases: perspectives for future dietary recommendations. *American Journal of Clinical Nutrition*, 121, (5), s. 956–964.

Většina současných dietních doporučení pro prevenci kardiovaskulárních onemocnění (CVD) doporučuje konzumaci nízkotučných mléčných výrobků namísto mléčných výrobků s normálním obsahem tuku, které jsou jedním ze zdrojů nasycených mastných kyselin (SFA) v potravě. Zde shrnujeme prezentovaná data a diskuse týkající se platnosti těchto doporučení vedené v panelu mezinárodních expertů na výzkum výživy na uzavřeném workshopu na vysoké úrovni na téma „Nasycené tuky v mléčných výrobcích a kardiovaskulární onemocnění“, který se konal v Amsterdamu ve dnech 15.–16. dubna 2024.

Nejnovější důkazy naznačují, že celkově je konzumace mléka, jogurtů a sýrů, bez ohledu na obsah tuku, neutrálně spojena s rizikem kardiovaskulárních onemocnění. Randomizované kontrolované studie také dosud neprokázaly, že by